Yüksek Lisans Tezi
Zehra Büsra AZİZOĞLU
Bivoloıi Anabilim Dalı
2017

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

Bacillus CİNSİNE AİT YEREL BAKTERİ İZOLATLARINDA KİTİNAZ GENLERİNİN TARANMASI VE BU İZOLATLARIN ANTİFUNGAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Zehra Büşra AZİZOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Yüksek Lisans Tezi

Ekim 2017
KAYSERİ

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

Bacillus CİNSİNE AİT YEREL BAKTERİ İZOLATLARINDA KİTİNAZ GENLERİNİN TARANMASI VE BU İZOLATLARIN ANTİFUNGAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Zehra Büşra AZİZOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Yüksek Lisans Tezi

Ekim 2017
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.



Zehra Büşra AZİZOĞLU

YÖNERGEYE UYGUNLUK

***Bacillus* Cinsine Ait Yerel Bakteri İzolatlarında Kitinaz Genlerinin Taranması ve Bu İzolatların Antifungal Aktivitelerinin Araştırılması** adlı Yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Danışmanı

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ danışmanlığında **Zehra Büşra AZİZOĞLU** tarafından hazırlanan "***Bacillus* Cinsine Ait Yerel Bakteri İzolatlarında Kitinaz Genlerinin Taranması ve Bu İzolatların Antifungal Aktivitelerinin Araştırılması**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

12/10/2017

JÜRİ:

Danışman	:	Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ
Üye	:	Prof. Dr. Aydın TUNÇBİLEK
Üye	:	Yrd. Doç. Dr. Aysun ADAN

ONAY:
Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 24/10/2017 tarih ve 2017/46-12 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

26/10/2017

Prof. Dr. Mehmet AKKURT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, bana her konuda yardımcı olan ve değerli fikirleriyle yol gösteren ve akademik hayatım boyunca kendisini örnek almaktan onur duyacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ' a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Semih YILMAZ, Doç. Dr. Salih KARABÖRKLÜ, Doç. Dr. Mikail AKBULUT ve Dr. Rıdvan TEMİZGÜL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan kitin temini için Adana Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Öğretim üyesi Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ' e teşekkür ederim.

Tezimin farklı aşamalarında, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Şerife KURUOĞLU' na ve Dr. Uğur AZİZOĞLU' na teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim ve öğretim hayatım boyunca bana güvenen, inanan ve her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve kıymetli eşime saygı ve şükranlarımı sunarım.

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Kayseri, Ekim 2017

Bacillus CİNSİNE AİT YEREL BAKTERİ İZOLATLARINDA KİTİNAZ GENLERİNİN TARANMASI VE BU İZOLATLARIN ANTİFUNGAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Ekim 2017

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ÖZET

Bu çalışmada, *Bacillus* cinsine ait 270 yerel bakteri izolatı kitinaz geninin varlığı açısından PCR ile taranmış ve kitinaz içeren 66 izolat belirlenmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda böcek öldürücü aktivitesinin yüksek olduğu bilinen ve kitinaz geni taşıdığı belirlenen 9 *Bacillus thuringiensis* izolatı ve 2 standart suşun bitki patojeni *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* ve *Aspergillus niger* üzerindeki antagonistik etkileri belirlenmiştir. 9 yerel *Bt* izolatı ve 2 standart suş kolloidal kitinli ortamda yetiştirilmiş ve kültür süpernatantından kısmi saflaştırma ile kitinaz enzimi elde edilmiştir. SDS-PAGE analizinde 39.71, 41.39, 91.66 ve 110-113 kDa arasında değişen farklı moleküler ağırlıkta kitinaz enzimleri tespit edilmiştir. İzolatların bitki patojeni funguslar (*F. oxysporum* ve *V. dahliae*) ve küf mantarı (*A. niger*) üzerindeki antagonistik etkisini belirlemek amacıyla çift kültür testi yöntemi kullanılmış ve radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) hesaplanmıştır. *F. oxysporum*'a karşı 2 (SY33.3, SY65.1B) izolatın, *A. niger*'e karşı 4 (SY33.3, SY25.1, SY49.1, SY65.1B) izolatın ve *V. dahliae*'ye karşı ise 5 (SY33.3, U1-6, SY25.1, SY49.1, SY65.1B) izolatın etkili olduğu ve fungus gelişimini engelledikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, SY33.3 ve SY65.1B izolatlarının üç bitki patojeni fungusa karşı antagonistik aktivite göstererek fungus gelişimini engellediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, kitinaz, bitki patojeni fungus, antagonistik aktivite.

SCREENING OF CHITINASE GENES FROM LOCAL BACILLUS ISOLATES AND TESTING THEIR ANTIFUNGAL ACTIVITY

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M. Sc. Thesis, October 2017

Supervisors: Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

ABSTRACT

In this study, 270 local *Bacillus* isolates were screened by PCR for the presence of chitinase gene. Of all the tested isolates 66 were containing chitinase genes. Antifungal activity of 9 *Bacillus thuringiensis* isolates and 2 standard strains, which had previously been determined to have high insecticidal activity, were tested on plant pathogens *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* and *Aspergillus niger*. 9 local *Bt* isolates and 2 standard strains were grown in colloidal chitin and the chitinase enzyme was obtained by partial purification from the culture supernatant. SDS-PAGE analysis revealed that the molecular weights of the chitinase enzymes of the *Bt* isolates were determined as 39.71, 41.39, 91.66 and 110-113 kDa. In order to determine the antagonistic effects of the isolates on plant pathogen fungi the double culture test method was used and the percentages of radial growth inhibition (PIRG) were calculated. Respectively 2 (SY33.3, SY65.1B), 4 (SY33.3, SY25.1, SY49.1, SY65.1B) and 5 (SY33.3, U1-6, SY25.1, SY49.1, SY65.1B) isolates were found to be effective on *F. oxysporum, A. niger* and *V. dahliae* and inhibited fungal growth. In conclusion, isolates SY33.3 and SY65.1B were found to be effective against all tested fungi.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, chitinase, plant pathogen fungus, antagonistic activity.

İÇİNDEKİLER

Bacillus CİNSİNE AİT YEREL BAKTERİ İZOLATLARINDA KİTİNAZ GENLERİNİN TARANMASI VE BU İZOLATLARIN ANTİFUNGAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sayfa

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

GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. _Bacillus thuringiensis_'in Genel Özellikleri 3
1.1.1. _Bacillus thuringiensis_'in Tarihçesi 3
1.1.2. _Bacillus thuringiensis_'in Sınıflandırılması 4
1.1.3. _Bacillus thuringiensis_'in Mikrobiyolojik Özellikleri 4
1.1.4. _Bacillus thuringiensis_'in Habitatı 5
1.1.5. _Bacillus thuringiensis_'in Hayat Döngüsü 6
1.1.6. _Bacillus thuringiensis_'in Biyokontroldeki Yeri 7

1.2. Funguslar **8**
1.2.1. Bitki Patojeni Funguslar **8**
1.2.1.1. *Fusarium oxysporum* **9**
1.2.1.2. *Verticillium dahliae* **10**
1.2.1.3. *Aspergillus niger* **11**
1.3. Kitin **13**
1.3.1 Kitinin Yapısı ve Tarihçesi **13**
1.3.2. Ekonomik Yaklaşım **14**
1.3.3. Kitinin Kullanım Alanları **14**
1.4. Kitinaz **14**
1.4.1. Enzim Yapısı **14**
1.4.2. Enzimin Fonksiyonu **15**
1.4.3. Çeşitli Kitinazlar **16**
1.4.3.1. Bitki Kitinazları **16**
1.4.3.2. Böcek Kitinazları **16**
1.4.3.3. Memeli Kitinazları **16**
1.4.3.4. Fungus Kitinazları **16**
1.4.3.5. Bakteriyel Kitinazlar **17**
1.4.4. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları **17**
1.4.4.1. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları ve Çevre **18**
1.4.5. Kitinaz Enziminin Kullanım Alanları **18**

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal **19**
2.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Suşları **19**
2.1.2. Oligonükleotid Primerler **19**
2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri **20**
2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler **20**
2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler **21**
2.1.6. Kitinaz Enziminin Eldesinde Kullanılan Çözeltiler **21**
2.1.7. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi **21**

2.1.8. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler 21
2.1.8.1. Gümüş Boyama Çözeltileri 22
2.1.9. Çalışmada Kullanılan Funguslar 22
2.1.9.1. Bitki Patojeni Funguslar 22
2.1.9.2. Küf Mantarı 22
2.2. Yöntem 23
2.2.1. *Bacillus sp.* İzolatlarının Çoğaltılması 23
2.2.2. *Bacillus sp.* İzolatlarından Total DNA İzolasyonu 23
2.2.3. PCR Yöntemi ile Kitinaz (*chi*) Geni Taşıyan İzolatların Belirlenmesi 23
2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi 25
2.2.5. Kolloidal Kitinin Hazırlanması 25
2.2.6. Kitinaz Enziminin Üretimi 25
2.2.7. Etanol Presipitasyonu ile Kitinaz Enziminin Eldesi 26
2.2.8. İzolatların CHDA Besiyerinde Kitinaz Aktivitesinin Saptanması 26
2.2.9. Bradford Yöntemi ile Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi 26
2.2.10. SDS-PAGE Analizi 27
2.2.10.1. SDS-PAGE Jellerin Boyanması 28
2.2.11. İzolatların Bitki Patojeni Funguslar ve Küf Mantarı Üzerindeki Etkisi 28
2.2.12. İstatistiksel Analiz 29

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. PCR Yöntemi ile Kitinaz (*chi*) Geni Taşıyan İzolatların Belirlenmesi 30
3.2. İzolatların CHDA Besiyerinde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi 41
3.3. Bradford Yöntemi ile Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi 42
3.4. SDS-PAGE Analizi 43
3.5. İzolatların Bitki Patojeni Funguslar ve Küf Mantarı Üzerindeki Antagonistik Etkisi 45
3.5.1. *Bt* İzolatlarının Fusarium oxysporum Üzerindeki Antagonistik Etkisi 45
3.5.2. *Bt* İzolatlarının Verticillium dahliae Üzerindeki Antagonistik Etkisi 46

3.5.3. *Bt* İzolatlarının *Aspergillus niger* Üzerindeki Antagonistik Etkisi 48

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. TARTIŞMA 50
4.2. SONUÇ ve ÖNERİLER..... 55

KAYNAKLAR 57
ÖZGEÇMİŞ..... 71

KISALTMALAR VE SİMGELER

%	Yüzde
ºC	Derece santigrad
bç	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumin
Bt	*Bacillus thuringiensis*
ChBD	Kitin bağlama domaini
CHDA	Chitinase-detection agar
chi	Kitinaz geni
Cry	Kristal protein
cry	Kriptik gen
dH_2O	Distile su
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribo aükleik asit
dk	Dakika
ES	Erime sıcaklığı
F	Forward (ileri)
FORL	Fusarium kök boğazı çürüklüğü
FOL	Fusarium solgunluğu
g	Güç
gr	Gram
GlcNAc	Kitin N-acetylglukozamin
GlcNAc2	N-asetil glukozamin dimeri
HCl	Hidroklorik asit
ICP	İnsektisidal kristal protein
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
L	Litre
mA	Mili amper
MEA	Malt Ekstrakt Agar
mg	Mili gram
µl	Mikro litre

µg	Mikro gram
M	Molarite
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
ml	Mili litre
mM	Mili molar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Patates Dekstroz Agar
PIRG	Radyal büyümenin inhibisyonu yüzdesi
R	Reverse (geri)
rpm	Devir sayısı
r-RNA	Ribozomal ribo nükleik asit
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SY	Semih Yılmaz
β	Beta
α	Alfa
U	Ünite
TAE	Tris-asetik asit
TEMED	Tetra metil etilen diamin
Tris-EDTA	Tris etilen diamintetra asetik asit

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Kullanılan primer çiftleri ve özellikleri 19
Tablo 3.1. Kitinaz (*chi*) geni taşıyan izolatlar 31
Tablo 3.2. İzolatların PCR ve SDS-PAGE bant büyüklükleri 44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. *Bt*'nin genel yapısı 5
Şekil 1.2. *Bt*'nin koloni morfolojisi 5
Şekil 1.3. Cry protein elektron mikroskop görüntüsü 5
Şekil 1.4. *Bt*'nin habitatları 6
Şekil 1.5. *Bt*'nin hayat döngüsü 7
Şekil 1.6. *F. oxysporum*'un misellerinin görünüşü 10
Şekil 1.7. *V. dahliae*'nin misellerinin görünüşü 10
Şekil 1.8. *A. niger*'in misellerinin görünüşü 11
Şekil 1.9. Kitinin kimyasal yapısı ve konformasyonları 13
Şekil 1.10. Kitinaz enziminin üç boyutlu yapısı 14
Şekil 1.11. Kitinin hidrolizi 15
Şekil 2.1. Enzimin filtre edilmesi 26
Şekil 3.1. Kontrol suşu ve izolatların primer 1 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 31
Şekil 3.2. Kontrol suşu ve izolatların primer 2 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 33
Şekil 3.3. Kontrol suşu ve izolatların primer 3 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 34
Şekil 3.4. Kontrol suşu ve izolatların primer 4 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 36
Şekil 3.5. Kontrol suşu ve izolatların primer 5 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 37
Şekil 3.6. Kontrol suşu ve izolatların primer 6 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 39
Şekil 3.7. Kontrol suşu ve izolatların primer 7 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü 40
Şekil 3.8. Kontrol suşu ve izolatların CHDA besiyeri üzerindeki hidroliz zonu oluşumu 42
Şekil 3.9. Enzim konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart eğri grafiği 42
Şekil 3.10. İzolatların enzim konsantrasyonları 43
Şekil 3.11. Kontrol suşu ve izolatların SDS-PAGE görüntüsü 44

Şekil 3.12. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *F. oxysporum* üzerindeki antagonistik etkisi 45
Şekil 3.13. İzolatların *F. oxysporum* üzerindeki % PIRG değerleri 46
Şekil 3.14. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *V. dahliae* üzerindeki antagonistik etkisi 47
Şekil 3.15. İzolatların *V. dahliae* üzerindeki % PIRG değerleri 47
Şekil 3.16. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *A. niger* üzerindeki antagonistik etkisi 48
Şekil 3.17. İzolatların *A. niger* üzerindeki % PIRG değerleri..... 49

GİRİŞ

Birçok bitki türü bulunduğu ortamda patojen mikroorganizma saldırılarına maruz kalarak hastalanmakta ve bu yüzden gelişim geriliği, ürün kayıpları ve bitki ölümü meydana gelmektedir. Tüm dünyada üretilen bitkisel ürünlerin yaklaşık % 10'u bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklar yüzünden kaybedilmektedir [1]. Bu tip hastalıklarla mücadele için çok sayıda kimyasal madde üretilmiş ve yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Bu kimyasallar çok etkili olmalarına ve çabuk sonuç vermelerine rağmen birçok problemi de beraberinde getirmektedir. Örneğin bu kimyasallar toprak ve yeraltı sularını kirletmekte ve besin zinciri yoluyla canlıların doku ve organlarında birikerek onların sağlığını olumsuz etkilemektedir [2, 3]. 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.

Fungus 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 fungus hücre duvarı antifungal proteinlerin birçoğu için bir hedef teşkil eder. Bu antifungal proteinler hücre ölümüne yol açan kitinaz ve glukanaz enzimlerini içerirler [4]. Kitinazlar bakteri, fungus ve yüksek yapılı bitkiler gibi birçok organizmada bulunur ve farklı rollere sahiptir [5]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen kitinazın ise bitki patojeni funguslar için biyokontrol ajanı olarak görev yaptığı rapor edilmiştir. *Bacillus thuringiensis subsp., kenyea, pakistani, colmeneri, canadiensis, entomocidus, kurstaki, israelensis* ve *konkukian'*ın farklı suşlarından en az 38 kitinaz genin gen bankasında bulunduğu görülmektedir.

Bunlardan büyük bir kısmı Çin ve Meksika'da diğer kısmı da ABD, Mısır, Türkiye, Tayland, Hindistan, Pakistan, Tunus ve Kore gibi ülkelerde çalışılmıştır [6]. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) kitinazlarının çoğu yüksek oranda (% 93-99) 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 biyopolimerleri parçalarlar [7]. *Bt* kitinazları doğada önemli bir role sahip olup, karides atıklarının parçalanması, Cry toksinlerinin insektisidal aktivitesinin arttırılması ve bitki patojeni funguslarla mücadele amacıyla kullanılabilir. *Bt* kitinaz ve proteaz salgılayarak sinerjistik olarak karides atıklarının parçalanmasında kullanılmaktadır. Parçalanmış karides atıkları eczacılık, tıp, gıda, su arıtma, pigment ekstraksiyonu, besiyerleri, hayvan gıdası formülasyonu ve topraktaki nematod popülâsyonun azaltılmasında kullanılmaktadır [8]. Buna ilaveten *Bt* kitinazlarının peritrofik zarı sindirerek Cry proteinlerinin böcek öldürücü aktivitesini arttırdığı, *Fusarium spp.* ve *Sclerotium rolfsii* gibi bitki patojeni fungus türlerine karşı da inhibitör aktivitesinin olduğu gösterilmiştir [9].

Bu çalışmada yerel kaynaklı 270 *Bacillus* cinsine ait izolatlarda kitinaz (*chi*) geni taranarak yerel izolatların gen frekansı belirlenmiş ve geni taşıdığı belirlenen izolatların bitki patojeni funguslar üzerindeki antagonistik etkileri araştırılmıştır. Yapılan tarama ve etkinlik denemeleri sonucunda üzerinde deneme yaptığımız üç önemli fungus zararlısını kontrol etmek için etkin suşların belirlenmesi çalışmanın kıymetini arttıracaktır. Ayrıca bu çalışma, yerel kaynaklı biyo-pestisit geliştirilmesi ve üretilmesi için ileriki çalışmalara değerli bilgiler sunması yönüyle de özgün değer taşımaktadır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. *Bacillus thuringiensis*'in Genel Özellikleri

1.1.1. *Bacillus thuringiensis*'in Tarihçesi

Bacillus thuringiensis ilk defa 1901 yılında Japon bilim adamı Shigetane Ishiwata tarafından, sotto (ani çöküş) hastalığına yakalanmış ölü *Bombix mori* ipek böceklerinde hastalığın sebebini araştırırken izole edilmiştir. Bu hastalık Japonya ve çevresinde çok sayıda ipek böceğinin kaybına neden olmuş ve bu nedenle bakteri *Bacillus sotto* olarak adlandırılmıştır.

Berliner ise 1911 yılında Almanya'nın Thuringia eyaletinde bir un fabrikasında un güvesi (*Ephestia kuehniella*) ölüm nedenini araştırırken bu bakteriyi yeniden keşfetmiş ve *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) olarak isimlendirmiştir [10]. Berliner daha sonraki yaptığı çalışmalarda endosporun yanında bulunan kapsül cisimciklerini keşfetmiş ve bunlara restkorper adını vermiştir [11, 12].

Aoki ve Chigasaki 1916 yılında *Bt*'in sporlanmış kültürlerinin böcekler üzerinde toksik etkisinin olduğunu bulmuşlardır [13]. Mattes aynı cisimcikleri inceleyerek bu cisimciklerin böcek öldürücü aktivitesini ortaya koymuştur [14]. Christopher Hannay 1953 yılında bu cisimciklere parasporal kristaller adını vermiş, Philip Fitz-James ve Hannay 1955 yılında, bu toksik parasporal kristallerin protein yapılı olduğunu keşfetmişlerdir [15, 16].

Fransa'da un güvesini kontrol etmek için *Bt*, Sporine dayalı ilk ticari böcek ilacı üretilmiştir. ABD'de ise ticari olarak *Bt* ilk olarak 1958'de üretilmiştir [17].

1.1.2. *Bacillus thuringiensis'*in Sınıflandırılması

*Bacillus thuringiensis'*in sistematiği;

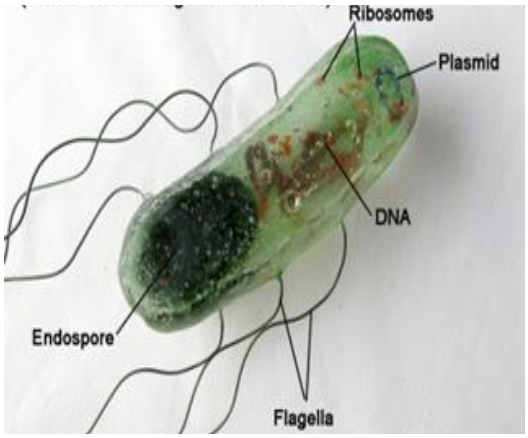
Üst alem : Bacteria
Alem : Eubacteri
Şube : Firmicutes
Sınıf : Bacilli
Takım : Bacillales
Familya : Bacillaceae
Cins : *Bacillus*
Tür : *Bacillus thuringiensis*

Bt, Bacillaceae familyasına ait olup *Bacillus cereus* ile yakından ilişkilidir. Korunan gen bölgelerinin DNA dizileme çalışmaları, bu iki bakterinin tek bir türe ait olduklarını gösterir. Bu nedenle *Bt* türlerinin sınıflandırılması zordur. *Bt* suşları, spor oluşumu sırasında parasporal kristal inklüzyonlar oluşturur ve bu özellikleri ile *B. cereus, B. anthracis* ve *B. mycoides*'den ayırt edilir [18]. *Bt* suşlarının sınıflamasında H antijenleri serotiplendirmesi de kullanılmıştır. Ancak serotip içindeki izolatlar herzaman aynı insektisidal aktivite ve biyokimyasal özelliği göstermemiştir [19, 20]. Höfte ve Whiteley (1989), *Bt* kristal proteinlerini yapısal aminoasit dizilimine göre Cry proteinleri olarak isimlendirmişlerdir [21, 22].

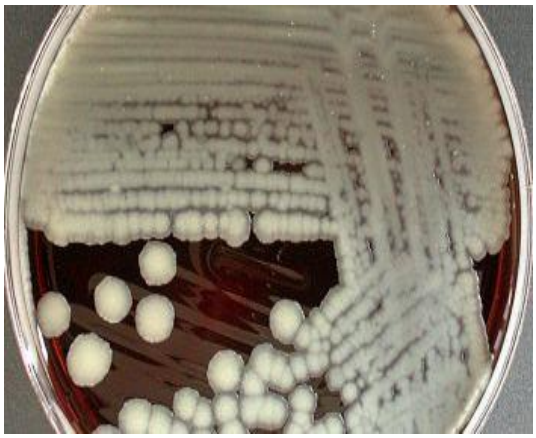
1.1.3. *Bacillus thuringiensis'*in Mikrobiyolojik Özellikleri

Bt, gram pozitif, aerob veya fakültatif anaerob, hareketli, spor oluşturan ve toprakta çok sık rastlanan bir bakteridir. Vejetatif hücrelerinin eni 1 µm, boyu 5 µm uzunluğunda olup, kısa kamçılara sahiptir (Şekil 1.1) [23]. Besiyerlerinde beyaz, pütürlü koloniler oluştururlar (Şekil 1.2) ve 30-37°C sıcaklık ile pH 7'de kolayca ürerler [24]. *Bt* suşları uygun olmayan şartlarda spor oluştururlar. Büyüme grafiğinin durağan fazında insektisidal kristal proteinleri (ICP) üretirler [25, 26].

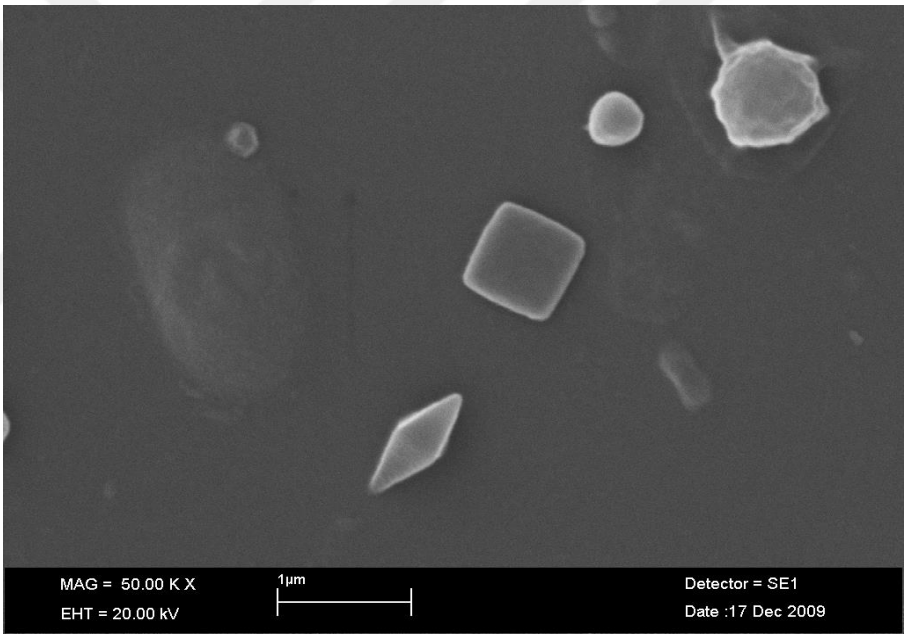
Kristal proteinlerin morfolojileri, büyüklükleri ve sayıları değişkenlik gösterir (Şekil 1.3). Cry1 proteinlerinde bipiramidal kristaller, Cry2 proteinlerinde kübik kristaller, Cry4 ve Cyt proteinlerinde şekilsiz ve birleşik kristaller, Cry3 proteinlerinde yassı kare şeklindeki kristaller ve Cry4d proteinlerinde çubuk şekilli kristaller olmak üzere beş farklı kristal morfolojisi belirlenmiştir [29, 30].



Şekil 1.1. *Bt*'nin genel yapısı [27].



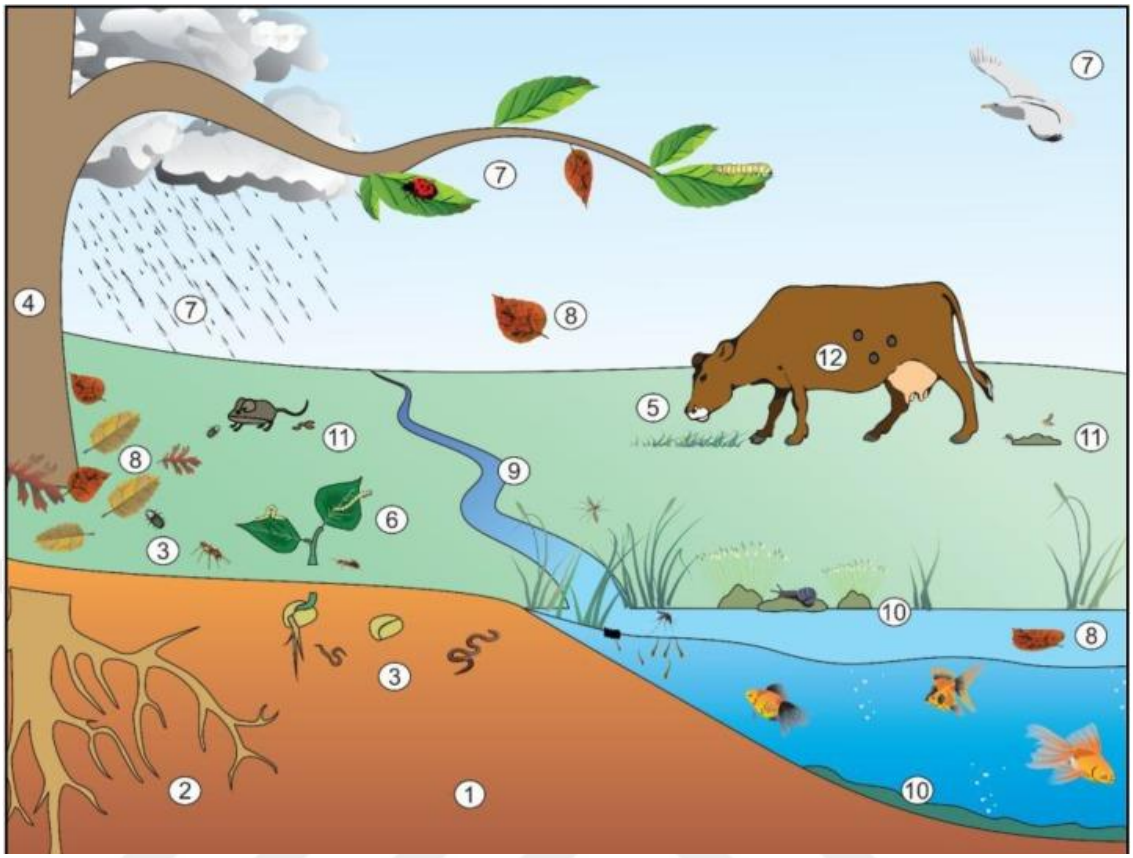
Şekil 1.2. *Bt*'nin koloni morfolojisi [28].



Şekil 1.3. Cry protein elektron mikroskop görüntüsü [31].

1.1.4. *Bacillus thuringiensis*'in Habitatı

Bt toprak, rizosfer, böcek ve halkalı solucan, bitkiler, çayır-mera, kuş ve memeli dışkıları, yaprak yüzeyleri, sucul ekosistemler ve hayvanların gastrointestinal kanallarında bulunabilen entomopatojen bir bakteridir (Şekil 1.4) [32].

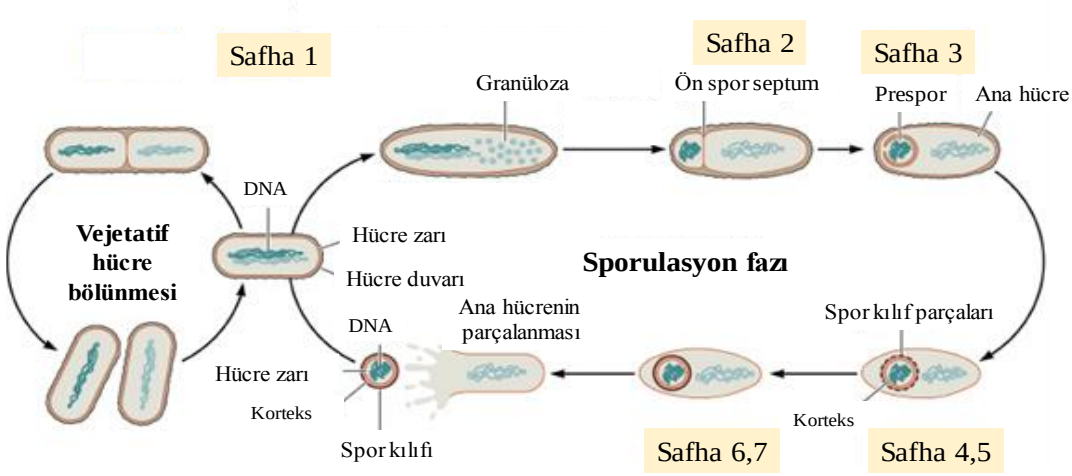


Şekil 1.4. *Bt*'nin habitatları [32]. (1. Toprak 2. Rizosfer, 3. Böcek ve halkalı solucan 4. Bitkiler, 5. Çayır-mera, 7 ve 11. Kuş ve memeli dışkıları, 8. Yaprak yüzeyleri, 10. Sucul ekosistemler, 12. Hayvanların gastrointestinal kanalları).

1.1.5. *Bacillus thuringiensis*'in Hayat Döngüsü

Bt'nin yaşam döngüsü, vejetatif hücre bölünmesi ve spor oluşumu olarak iki faza ayrılır. Sporlanma ise aksiyel filament oluşumu, ön spor septum oluşumu, yutulma (parasporal kristallerin ilk oluştuğu evre), ekzosporium, primordial hücre çeperi oluşumu, korteks oluşumu ve spor olgunlaşması aşamalarından oluşur (Şekil 1.5) [33, 34].

Uygun koşullarda spor çimlenerek vejetatif hücreyi oluşturur. Vejetatif hücre düz veya hafifçe kavisli, yuvarlak uçlu geniş çubuk şeklindedir ve plazma zarının ortasından ikiye bölünerek çoğalır. Aşırı sıcaklık ve besin kıtlığı gibi elverişsiz ortamlarda sporlanır ve endospor oluşturur. Sporlanma sırasında bol miktarda parasporal inklüzyonlar meydana getirirler. Bu inklüzyonlar hedef böceklere karşı oldukça toksik etki gösterirler [35, 36].



Şekil 1.5. *Bt*'nin hayat döngüsü [37].

1.1.6. *Bacillus thuringiensis*'in Biyolojik Mücadeledeki Yeri

Bt, yaygın olarak kullanılan böcek patojenidir. Pek çok insektisitten farklı olarak, türe özgü bir böcek öldürücü ürün ürettiği için yararlı böcekler üzerinde toksik etki göstermez. İnsan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etkileri yoktur. Pestisitlere göre daha güvenlidir. Sporlu olmalarından dolayı ticari formülasyonları kolay üretilir ve olumsuz koşullara dayanıklıdır [38, 39]. *Bt* toksinlerinin biyolojik olarak tamamen parçalanabilirliği diğer avantajlarındandır. Bununla birlikte *Bt*'nin pek çok avantajları yanında bazı dezavantajları da vardır [22]. Bunlar;

- *Bt* spreyi bitkinin bütün yüzeyine tamamen uygulanamaz.
- Bitki dokularının içerisindeki zararlılara ulaşamaz.
- *Bt*, güneş ışığına duyarlıdır, UV ışıklarına maruz kaldığında veya aşırı suya maruz kaldığında etkisiz hale geçerek yüzeyden akıp gider.
- İnsektisit olarak, etkili olması için *B. thuringiensis*'in böcek sindirim sistemine geçmesi gerekir. Bu durum *Bt*'ye duyarlı zararlılara karşı etkisini sınırlar.
- *Bt* bazlı ürünler diğer insektisitlere kıyasla daha kısa raf ömrüne sahiptir.
- Sıvı formülasyonlar kuru formülasyonlardan daha hızlı bozulabilir.

1.2. Funguslar

Funguslar aerop ve ökaryotik mikroorganizmalardır. Besinleri organik maddeleri absorbsiyonla alırlar. Çoğu organik maddeyi karbon kaynağı olarak kullanırlar. Ayrıca basit bir karbonhidrat olan glikozu da kolaylıkla parçalayabilirler. Bu nedenle

besiyerlerinde hep glikoz kullanılır. Mantarlar düşük pH ve yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Genellikle geniş pH (2-9), 10-35^{o}C sıcaklık ve geniş nem aralığında ürerler. Funguslar hif olarak adlandırılan filamentlere sahiptir ve hücrelerin etrafında kitin içeren uzun karbonhidrat polimerlerinden oluşan bir hücre çeperi bulunur. Çoğu saprofit olmakla birlikte heterotrofik olanları da vardır. İnsan, hayvan ve bitkilerde parazit olarak yaşayanları vardır. Ayrıca bitkisel atıklarda, sulak ortamlarda ve toprak gibi geniş habitatlarda da yaşarlar [40].

Funguslar kendi aralarında küfler (filamentli funguslar), mayalar ve mantarlar olmak üzere 3 guruba ayrılır. Küfler doğada yaygın olarak bulunur. Her bir filamente hif, hif kümelerine ise misel denir. Hifler havada uçabilir ve bu şekilde sporlarını dağıtır. Bu sporlara konidia denir. Renkleri beyaz, siyah, yeşil, mavi, kırmızı, sarı ve kahverengi olabilir. Mantarlar büyük yapılı ve filamentli Basidiomycetes'lerdendir. Genellikle yağmur sonrasında yeraltında gelişmeye başlarlar. Daha sonra gelişimleri ilerledikçe toprakta yüzeyinde görünür hale gelirler [41].

Fungusların laboratuvar ortamında yetiştirilmeleri için Malt Ekstrakt Agar (MEA), Patates Dekstroz Agar (PDA), Sabouraud Glukoz Agar ve Rose Bengal-Streptomycin Agar (RB) gibi besiyerleri kullanılır [40].

1.2.1. Bitki Patojeni Funguslar

Patojenik funguslar asitçe zengin olan ürünlerde ve nemli ortamda gelişen, soğuğa karşı toleransları olan en önemli enfeksiyöz ajanlardan biridir. Bitkilerde hasat sonrasında taşıma ve depolama süreci dahil olmak üzere tüm gelişim aşamalarında değişikliğe neden olarak önemli kayıplara sebep olurlar. Bitkinin doğrudan beslenmesini etkileyerek zarar verebilecekleri gibi sekonder metobolitler olan mikotoksinleri üreterek de kayıplara neden olurlar. Ürettikleri mikotoksin ve alerjenler tüketicilerde toksik ve alerjik rahatsızlıklara da neden olurlar [42].

Bitkileri funguslardan korumanın en önemli yolu fungisit kullanmaktır. Ancak funguslara karşı kullanılan çoğu sentetik fungusitler etkili ve hızlı sonuç vermelerine rağmen çevre ve insan sağlığı acısından olumsuz etkilere sahiptir. Bazı sentetik fungusitler biyolojik olarak parçalanmaz. Toprakta, bitkide ve suda birikerek insan sağlığını tehdit eder [43, 44]. Funguslar bitkilerde yaprak lekelerine, yanıklara, gövde

ve dal kanserlerine, geriye doğru ölüme, kök, gövde ve sap çürüklüklerine, yumuşak çürüklüğe, yaprak kıvırcıklığına, kök uruna ve antraknoza neden olurlar [45].

1.2.1.1. *Fusarium oxysporum*

Fusarium türleri daha çok bitkilerde oluşturdukları solgunluk ve yanıklık hastalığıyla bilinirler. Ancak insanlarda doğrudan enfeksiyona neden olarak nekroza yol açabilirler [46, 47].

Fusarium türleri esas olarak toprakta yaşar ve üremeleri için optimum 5-7 pH ve 24-32ºC sıcaklıklar gereklidir. Ancak asidik pH'larda da üreme gösterdikleri ve 8ºC gibi düşük sıcaklıklarda bile mikotoksin üretebildikleri belirtilmiştir [48, 49]. *Fusarium* türlerinin hücre duvarının α-1,3-glukan, β-1,3-glukan, glikoprotein tabakaları ve kitinden oluştuğu bildirilmiştir [50, 51].

Fusarium taksonomik olarak; Ascomycota bölümü, Sordariomycetidae sınıfı ve Hypocreales takımında yer alır ve 20'den fazla türü vardır [52, 53]. En çok bilinen türleri ise *Fusarium solani, F. oxysporum* ve *F. chlamydosporum*' dur. Bazı *Fusarium* türleri (*F. avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, F. equiseti*) bitki türü ayırt etmeksizin hastalık yaparken, bazıları cinse, türe ve çeşide özgüdür. Örneğin *F. coeruleum, F. eumartii ve F. sambucinum* patateste, *F. buharicum* pamukta ve *F. xyllarioides* kahvede etki gösterir [54].

Fusarium oxysporum, Fusarium solgunluğuna neden olan ve dünya çapında ciddi ekonomik kayıp oluşturan önemli bir bitki patojenidir. Ülkemizde ise bu patojen, Akdeniz Bölgesi'nde domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda kök ve kök boğazı çürüklüğü (FORL) ile Fusarium solgunluğu (FOL) gibi semptomlara neden olarak ekonomik kayıp oluştururlar. Mersin ve Adana illerinde domates seralarında Kasım 2007 ve Nisan 2008 ayları arasında yapılan çalışmalarda FORL ve FOL hastalıklarının patojenite şiddeti ve hastalık çıkışı sırasıyla % 43.3, 20.4 ve % 35.1, 18.8 olarak belirlenmiştir [55]. *F. oxysporum* laboratuvar ortamında yetiştirildiğinde besiyerinde miselleri önce beyaz görünür daha sonra *F. oxysporum*'un çeşidine göre mordan koyu pembeye dönüşebilir (Şekil 1.6) [56].

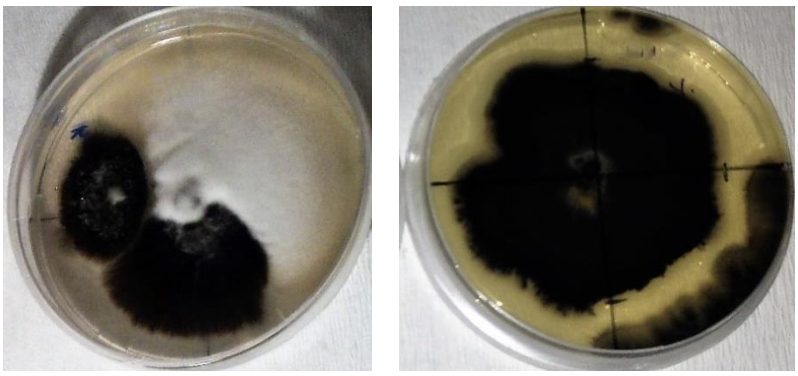


Şekil 1.6. *F. oxysporum*'un misellerinin görünüşü.

Fusarium solgunluğunun konak bitki çeşidi oldukça geniştir. Karanfil, patates, domates, fasulye, kabakgiller (hıyar, karpuz, kabak ve kavun gibi) şekerpancarı, yerfıstığı, yonca, patlıcan, çilek ve çeşitli süs bitkileri gibi ekonomik açıdan önemi olan tarım ürünlerinde yıkıcı hastalıklara neden olurlar [57]. Orta Amerika'da [58] uluslararası muz ticaretini tahrip ederek yaklaşık 400 milyon dolar (ABD 2000 yılı değerine göre 2.3 milyar dolar)'lık kayıplara neden olmuştur [59].

1.2.1.2. *Verticillium dahliae*

Verticillium cinsi, dünyada tarım ürünlerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bitki patojeni fungusların bir grubunu oluşturur [60]. İlk kez Melouk (1816) tarafından tanımlanmıştır. Cinsin *V. dahliae, V. albo-atrum, V. nubilum* ve *V. tricorpus* gibi türleri patojeniktir. En yaygın tür olan *V. dahliae,* Verticillium solgunluğu hastalığına neden olan bir bitki patojenidir [61]. Bu patojen olumsuz koşullara dayanmasını ve konukçu bitkiler arasında yayılmasını kolaylaştıran mikroskleroti oluşturur (Şekil 1.7). Mikroskleroti petri içerisinde koyu kahverengi veya siyah renkli, kalın duvarlı, çoğunlukla 30-60 μm çapında, şişkin globüler hücrelerden oluşur [62].



Şekil 1.7. *V. dahliae*'nin misellerinin görünüşü.

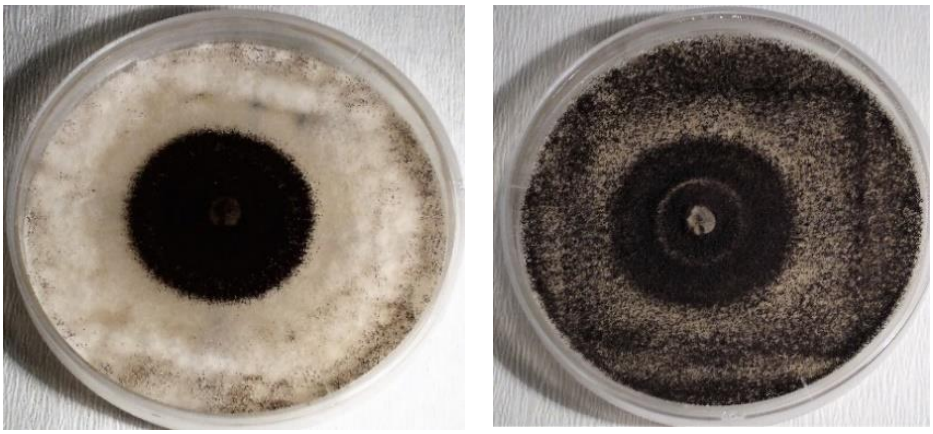
V. dahliae'nin sebep olduğu hastalık ürünlerde % 50'den fazla kayba neden olur. Hastalık ürünün kalitesini ve verimini büyük ölçüde azaltır ve hatta bazen hiç ürün almadan bitkilerin ölümüne sebep olur [63].

V. dahliae'nin optimum sıcaklığı 21-27ºC iken, yazın bu sıcaklık 30-35ºC'ye çıkabilmektedir. Ayrıca ağır killi, nemli, azot ve organik maddece zengin topraklarda *Verticillium* gelişiminin arttığı bilinmektedir [64]. *V. dahliae*, fide köklerinin kabuk dokusunda renk değişikliği ve yumuşamaya neden olarak fide kök çürüklüğü oluşturur. Ayrıca bitkinin alt saplarında kahverengi leke, yapraklarda sararma, kuruma, pörsüme ve vasküler solgunluğa neden olur [65, 66].

Verticillium solgunluğu hastalığının semptomları, *V. dahliae*'nın farklı ırklarında değişiklik göstermektedir. Bazı ırklarda yapraklar bitki üzerinde kuruyup esmerleşir ve dalda asılı kalırken, bazı ırklar yaprakların dökülmesine neden olarak bitkinin yapraksız kalmasını sağlar [67]. *V. dahliae*'nin, 4 farklı kıtadan gelen 14 familyada hastalık yaptığı belirtilmiştir [68]. Patojenin sebzeleri, meyveleri, lifli ürünleri ve yabancı otları içeren birçok konukçusu vardır [69]. Başta pamuk olmak üzere susam, ayçiçeği, bamya, domates, biber, patlıcan, börülce, fasulye, patates, yer fıstığı, kavun, maydanoz, şeftali, kayısı, zeytin, karanfil, horoz ibiği ve pire otu gibi bitkileri etkiler [70].

1.2.1.3. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger, toprakta, çöp ve çürüyen bitki materyalleri üzerinde bulunan, kahverengiden siyaha değişen sporlar oluşturan, filamentsi bir küftür (Şekil 1.8) [71]. Miseli gençken beyazdır ve siyah koloniler oluşturması ile karakterize edilir ve koloninin rengine göre tür teşhisi yapılır.



Şekil 1.8. *A. niger*'in misellerinin görünüşü.

Aspergillus, Fungi aleminde, Ascomycota filumu, Eurotiomycetes sınıfı, Eurotailes alt sınıfı, Trichocomaceae soyunda yer alan bir türdür. *A. glaucus, A. flavus, A. fumigatus* ve *A. niger* en yaygın türleridir. *A. flavus, A. fumigatus ve A. niger* insanda ve hayvanlarda aspergilloz hastalığına neden olur [72, 73].

A. niger için minimum yetişme sıcaklığı 6-8°C, maksimum ise 45-47°C'dir. Organizma optimum olarak 35-37°C sıcaklıkta gelişir [74]. Ayrıca *A. niger* 1.4-9.8 gibi geniş bir pH aralığında gelişebilir ve bu sayede sıcak ve nemli bölgelerde geniş bir yayılım gösterir [71].

Salgıladığı amilaz enzimleriyle nişasta gibi polisakkaritleri de kullanabilir. Bu yüzden ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmalarında sıkça görülür. Şekerli meyve suları ve peynirde yaşarlar. Nemli duvarlar ve banyo gibi besin maddelerinin düşük olduğu ortamlarda da büyüyebilirler [75, 76]. Gıda bozulmalarına neden olan en yaygın küf olarak bilinen *A. niger* yemeklik soğan, sarımsak, depodaki portakal, yer fıstığı, kuru erik, nohut gibi ürünlerde siyah çürüklük hastalığına neden olan bir patojendir [77]. Tohumun çimlenmesini, fide çıkışını ve tohumun canlılığını azaltır ve ayrıca depolanan yumrularda yumru çürüklüğüne neden olur [78-81].

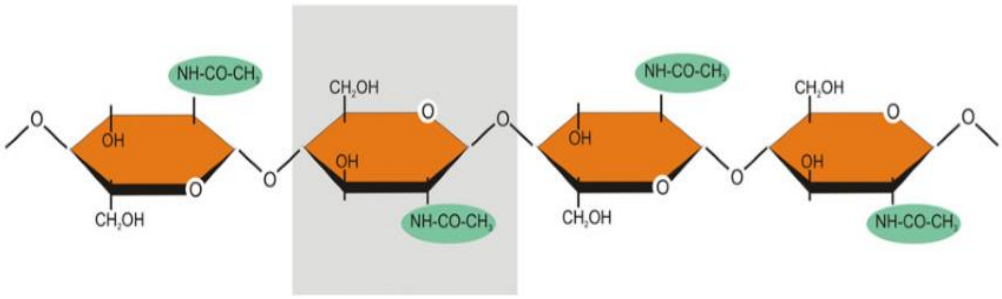
1.3. Kitin

1.3.1 Kitinin Yapısı ve Tarihçesi

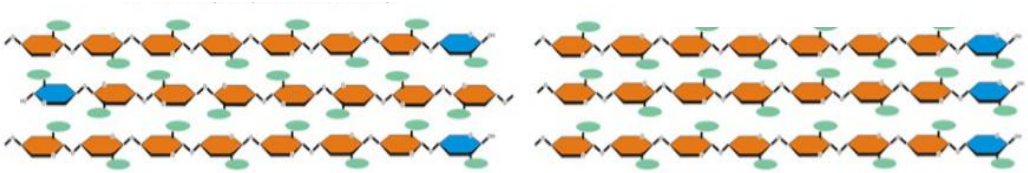
Kitin, N-asetilglukozamin monomerlerinin (GlcNAc) β-1,4 bağıyla bağlanması ile oluşmuş bir polisakkarittir. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci biyopolimerdir [82]. Kitin formlarının uzun düz zincirlerden oluşmuş bir yapıda olması ile selüloza benzer, fakat yapısında selülozdan farklı olarak hidroksil grupları yerine asetilasyona uğramış amino grupları bulunur (Şekil 1.9.a) [41, 83, 84].

Kitin α, β ve γ olmak üzere üç farklı kristal formda bulunur. Alfa yapısı, antiparalel zincir yapısındadır ve doğada en fazla bulunan form olduğundan dolayı kitin olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.9.b). Yengeç ve karides kabuklarında, küf, maya ve böceklerde bulunur. Beta formunun, su ve organik çözücülere karşı ilgisi yüksek olup paralel moleküler dizilişe sahiptir. Doğada daha az görülmekte olup, mürekkep balığının kollarında, kalamar iğnesi, sübye iç kabuğunda bulunur (Şekil 1.9.c) [85-88].

a. Kitinin Kimyasal Yapısı



b. α Kitin **c.** β Kitin



Şekil 1.9. Kitinin kimyasal yapısı ve konformasyonları [89].

Gama formu, paralel ve antiparalel yapıların karışımı olarak böceklerin kozalarında ve geyik böceklerinin kabuklarında bulunmaktadır.

1.3.2. Ekonomik Yaklaşım

Kitin ABD ve Japonya'daki konserve fabrikalarının, yengeç ve karides atıkları ile Norveç, Meksika ve Şili gibi birçok ülkede deniz kabuklusu atığından elde edilir. Hindistan, Balıkçılık Teknolojisi Enstitüsünün kitin ve kitosan ile ilgili yaptığı araştırmada kuru karidesin % 23 kitin içerdiği belirlenmiş ve bu araştırmaya göre Hindistan'da ortalama kitinsel katı atık miktarının 60,000 ile 80,000 ton arasında değiştiği bildirilmiştir. Kitin ve kitosan ticari olarak, Hindistan, Japonya, Polonya, Norveç ve Avustralya'da yapılmaktadır [90].

1.3.3. Kitinin Kullanım Alanları

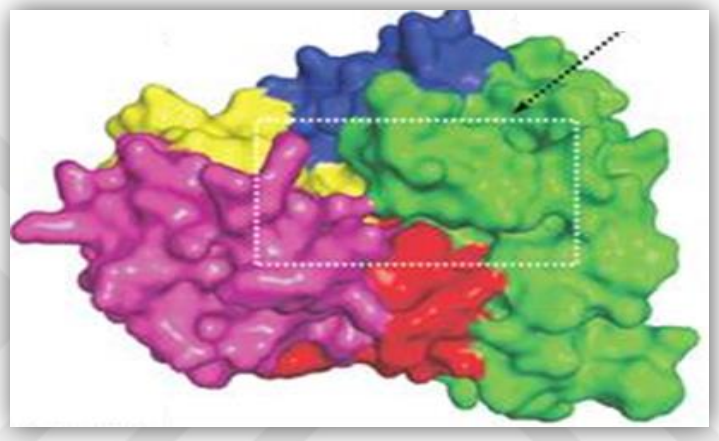
Kitin ve türevleri medikal ve gıda alanları başta olmak üzere birçok alanlarda kullanılır. Suların arıtma, gıda sanayii (gıda katkı maddesi olarak, lezzet arttırıcı ve renk koruyucu olarak; yağ emilimini azaltıcı ve zayıflama ürünü olarak), meyve kaplama, gübre üretimi, medikal (diş tedavisi, biyomedikal ve farmasötikal ürünlerde hedefe yönelik

ilaç tasarımlarında), kozmetik (kişisel bakım ürünleri), kâğıt ve tekstil sanayisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [87, 90, 91].

1.4. Kitinaz

1.4.1. Enzimin Yapısı

Kitinazlar, yaklaşık 20 ile 90 kDa arasında değişen moleküler büyüklüğe sahip glikozil hidrolazlardır (Şekil 1.10) [92, 93].



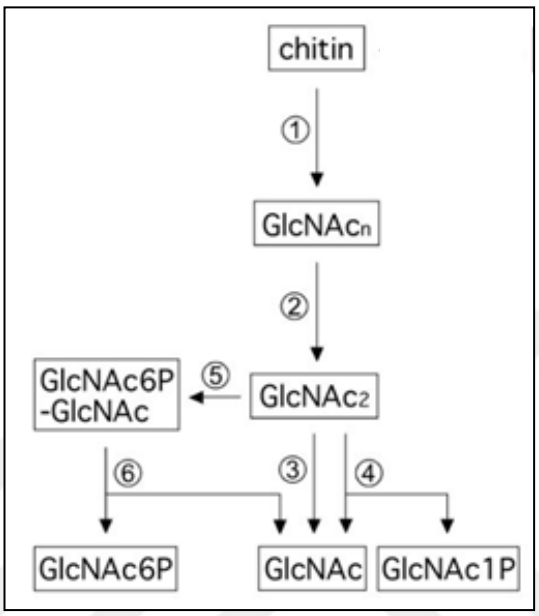
Şekil 1.10. Kitinaz enziminin üç boyutlu yapısı [94].

Kitinazlar endo ve ekzo-kitinazlar olarak iki alt gruba ayrılır. Endo-kinitazlar, kitin polimerlerinin iç kısımdaki β-1,4 glikozidik bağlarını rastgele ayırarak N-asetilglukozamin (GlcNAc) multimerlerini oluştururlar [95, 96]. Ekzo-kitinazlar ise kitobiosidazlar ve β-glukozaminidazlar olmak üzere 2 alt kategoriye ayrılır [97]. β-glukozaminidazlar, N-asetilglikozamin monomerlerini kitinden çıkarır ve bu durumda kitobiaz da kitobiozu (GlcNAc2) N-asetilglikozamin monomerlerine (GlcNAc) hidroliz eder [95]. Endo-kitinaz, ekzo-kitinaz, β-N-asetilglukozaminidaz ve kitobiazların, kitin ve türevlerini parçaladıkları bilinmektedir [84].

1.4.2. Enzimin Fonksiyonu

Kitin endo ve ekzo-kitinazların birlikte uygulanması ile glukozamin dimerlerine (GlcNAc2) indirgenir (1 ve 2). Daha sonra β-N-asetilglukozaminidaz (GlcNAcase) GlcNAc2 ünitelerini N-asetilglikozamin monomerlerine (GlcNAc) hidroliz eder veya kitooligosakkaritlerin indirgenmeyen uçlarını GlcNAc formuna dönüştürür (3). Bazı organizmalar GlcNAc2'yi GlcNAc2 fosforilaz ile GlcNAc ve GlcNAc-1-fosfata

indirgerler (4) veya dimeri bir GlcNAc2 fosfotransferaz sistemi ile GlcNAc-6-fosfat-GlcNAc yapısına dönüştürürler (5). Bunu takiben 6-fosfo-glukozaminidaz (6) ile GlcNAc ve GlcNAc-6-fosfat parçalanır (Şekil 1.11) [98-101].



Şekil 1.11. Kitinin hidrolizi [101].

1.4.3. Çeşitli Kitinazlar

Fungus hücre duvarı, fungus hücresinin kuru ağırlığının yaklaşık % 20-30'unu oluşturur. Bu yapı hücreyi fiziksel hasarlara karşı korur ve hücreye şeklini verir. Fungus hücre duvarında kitin içeriği % 3'ten % 60'a kadar değişiklik göstermektedir. *Aspergillus* cinsine ait türlerin hücre duvarı kitin-glukan kompleksi ile karakterize edilmektedir. Kitin ve β-1,3-glukandan oluşan iskelet tabakasıyla birlikte fungus hücre duvarı antifungal proteinlerin birçoğu için bir hedef teşkil eder. Bu antifungal proteinler hücre ölümüne yol açan kitinaz ve glukanaz enzimlerini içerirler [4]. Kitinazlar bakteri, fungus ve yüksek yapılı bitkiler gibi birçok organizmada bulunur ve farklı rollere sahiptir [5].

1.4.3.1. Bitki Kitinazları

Bitki kitinazları bitki sapları, tohumlar, çiçekler ve yumrularda bulunur. Bitki kitinazları büyümenin ilk gelişimi sırasında tespit edilebilir [93].

1.4.3.2. Böcek Kitinazları

Böcek kitinazları kendi parazitlerine karşı savunucu rol oynarlar ve enzim üretimi larvaların dönüşümü sırasında hormonlar tarafından düzenlenir. Allosaminidin böcek kitinazlarının inhibitörüdür [102].

1.4.3.3. Memeli Kitinazları

Memeli kitinazları enzimatik aktiviteye sahip olmayan kitinaz benzeri proteinlere ve enzimatik olarak aktif gerçek kitinazlara dönüşebilen glikozil hidrolazların GH18 grubuna aittir [103]. Kitotriosidaz tanımlanan ilk memeli kitinazdır. Enzimin yapısındaki glutamik asit, kitin içindeki β-1,4 glikozidik bağının hidrolize edilmesi için gereken protonu sağlar [104].

1.4.3.4. Fungus Kitinazları

Fungus kitinazları morfogenetik, otolitik, beslenme ve parazitik rolleri içeren önemli fizyolojik ve biyolojik rollere sahiptir. Örneğin, maya *Saccharomyces cerevisiae*'deki kitinaz geninin bozulması (CTS1) hücreyi etkilerken, kitozanaz ve kitinazın işlevsel ekspresyonunun mayada (*Schizosaccharomyces pombe*) morfogenezisi etkilediği bildirilmiştir [105].

1.4.3.5. Bakteriyel Kitinazlar

Bakteriler kitinaz enzimini kitini parçalamak, enerji elde etmek ve çevredeki kitini geri dönüştürmek için kullanırlar [106]. Bakteriyal kitinazlar, genellikle kitin bağlanma domaini (CBD) başta olmak üzere birden fazla domainden oluşmuştur. Bakteriyel kitinazlarda, kitin bağlayıcı etki enzimin amino veya karboksil ucunda bulunur [107].

Bakteriyel kitinazlar böcek ve fungus patojenlerine karşı etkilidir. *Streptomyces, Alteromonas, Escherchia, Bacillus* ve *Aeromonas* başta olmak üzere birçok bakteri kitinaz üretme kabiliyetine sahiptir. Kitinaz üreten bakteriler, toprak, deniz kabukluları, bahçe ve park atıkları ile sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir. [108-110].

Gram negatif bakteriler arasında en iyi bilinen kitinaz üreticileri *Aeromonas, Chromobacterium, Photobacterium, Pseudomonas, Serratia, Vibrio* ve kaganlaştırıcı bakteriler *Chitinophaga, Cytophaga*, ve *Lasobacter*'dir. Gram pozitif bakteriler arasında

Arthrobacter, Nocardia, Streptomyces ve spor oluşturan *Bacillus* ve *Clostridium* en iyi bilinen kitinaz üreticileridir [111].

Kitin mantar hücre duvarı ve böcek dış iskeletinin en önemli bileşenidir. Bu yüzden bazı kitinolitik bakteriler çeşitli bitki patojeni fungus ve böcek zararlılarının biyolojik kontrolünde kullanılır [111]. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin pek çoğu önemli araştırma konusu haline gelmiştir. Endüstri alanında kullanılan pek çok mikrobiyal enzim *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlenir. *Bacillus* türleri tarafından üretilen kitinaz ise birçok bitki fungusunu kontrol etmede kullanılır [112].

1.4.4. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları

Şimdiye kadar *Bacillus thuringisensis*'in çeşitli suşlarından (*Bt kenyea*, *pakistani*, *colmeneri*, *canadiensis*, *entomocidus*, *kurstaki*, *israelensis* ve *konkukian*) tespit edilen 38 tane kitinaz geni gen bankasında yer almaktadır. Bunlardan % 58'i Çin'de % 18'i Meksika'da diğer kısmı da ABD, Mısır, Türkiye, Tayland, Hindistan, Pakistan, Tunus ve Kore gibi ülkelerden klonlanmıştır [6]. *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 bölgeler benzerlik gösterirken *B. circulans* Chi41, *B. subtilis* Chi, *Serratia marcescens* Chi ve *Enterobacter agglomerans* ChiA gibi diğer bakteri kitinazlarının katalitik bölgeleriyle daha az benzerlik gösterir. *Bt* kitinazlarının kitin bağlanma bölgeleri % 99 oranında birbirine benzerlik gösterir ve 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 korunmuş olup doğrudan kitin bağladığı düşünülmektedir. Buna ilave olarak ChiA74 gibi endo-kitinazlar iki tane fibronektin benzeri bölge içerir. Bu bölgeler substrat bağlamada etkili korunmuş aromatik amino asit içerir [111, 113-115].

1.4.4.1. *Bacillus thuringiensis* Kitinazları ve Çevre

Karides gibi kabuklu deniz ürünleri restoranlarda geleneksel bir yiyecektir. Fakat bunların baş ve dış iskelet gibi yenilmeyen atıkları bu canlının hacimce % 56-60'na karşılık gelmektedir. Bu atıklar kitin, protein ve mineral atıklarından oluşmaktadır. *Bt* bir dizi kitinaz ve proteaz salgılamakta ve bunların sinerjistik aktivitesi karides atıklarının parçalanmasında kullanılmaktadır. Parçalanmış karides atıkları eczacılık, tıp, gıda, su arıtma, pigment ekstraksiyonu, besiyerleri, hayvan gıdası formülasyonu, toprakta nematod popülasyonun azaltılması ve tek hücre protein üretiminde kullanılmaktadır [8].

1.4.5. Kitinaz Enziminin Kullanım Alanları

Kitin böceklerin ve deniz canlılarının çoğunun dış iskeletini oluşturur. Deniz kabuklularının ölmesi sonucu sert ve sağlam yapıdaki kitin okyanus ve deniz diplerine dolmaktadır. *Vibrio furnisii*'nin üretmiş olduğu kitinazın deniz ve okyanuslardaki kitini glikoz ve amonyağa dönüştürerek biyolojik arıtıma katkı sağladığı belirtilmiştir [116]. Kitinaz üreten mikroorganizmaların biyolojik mücadelede kullanılmaları kitinazı kodlayan genlerinin bitkilere transgen olarak aktarılması ve bitkiye bulaştırılmaları şeklinde gerçekleştirilir [117,118].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Bakteri Suşları

Bu çalışmada toplam 270 adet *Bacillus sp.* izolatı kullanılmış ve çalışmalar Erciyes Üniversitesi Biyolojik Mücadele Laboratuvarında yürütülmüştür. Kontrol olarak HD-1 ve HD-73 standart suşları kullanılmıştır.

2.1.2. Oligonükleotid Primerler

Bacillus sp. izolatlarının kitinaz geni taşıyıp taşımadıklarını belirlemek için spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. *Kullanılan primer çiftleri ve özellikleri.

Primer	Dizi	Ürün boyutu	ES (ºC)
Primer 1 F Primer 1 R	5'- ACGCCATATGCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATAC-3' 5'-AAGTCGACGCGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTAT-3' [119]	2.5 kb	56
Primer 2 F Primer 2 R	5'- GAC GAC GAC AAG ATG GATGTTAAACAGGTTCAA- 3' 5'- GA GGA GAA GCC CGG TTA TTATTTTTGCAAGGAAAG- 3' [120]	1.083 kb	58
Primer 3 F Primer 3 R	5'-GACGACGACAAGATGCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATAC-3' [119] 5'-GAGGAGAAGCCCGGTTACGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTATC-3'	3 kb	55
Primer 4 F Primer 4 R	5'- GAC GAC GAC AAG ATG AAGCTTTTTCCTCCCATACCAA-3' 5'- GAGGAGAAGCCCGGTTAGATGTTTTAATTTTAGACGAACGGAC-3' [121]	3.1 kb	58
Primer 5 F Primer 5 R	5'-CATATGATGGTCATGAGGTCTC-3' 5'-GTCGACCTATTTCGCTAATGACG-3' [122]	2.1 kb	50
Primer 6 F Primer 6 R	5'-CATATGTTTCCTCCCATACCAACCT-3' 5'-GTCGACAAGCCTTTCCTAACAGGTGA-3' [123]	2.5 kb	55
Primer 7 F Primer 7 R	5'-CATATGCTAGACAACTTTTTGTATAGGAGTGTTCATATG-3' 5'-GTCGACCGATTGATGAGGGCTAATTATAGTTTTACTTTG-3' [124]	1.129 kb	56

F: Forward R: Reverse kb: Kilobaz ES: Erime sıcaklığı

***** Çalışmada kullanılan primer çiftleri, belirtilen kaynaklardan alınarak bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri

Bakterilerin yetiştirilmesi amacıyla aşağıda belirtilen besiyerleri kullanılmıştır.

Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri (pH 6.8±2): 10 gr kazein hidrolizat, 5 gr maya özütü ve 5 gr NaCI 1 lt distile suda eritilmiştir. Manyetik karıştırıcıda tamamen çözüldükten sonra 121^{o}C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Luria Bertani (LB) Agar besiyeri (pH 6.8±2): 10 gr kazein hidrolizat, 5 gr maya özütü, 5 gr NaCI ve 15 gr agar 1 lt distile suda eritilmiştir. Manyetik karıştırıcıda tamamen çözüldükten sonra 121^{o}C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Patates dekstroz agar (Potato Dextrose Agar): 39 gr patates dekstroz agar 1 lt distile suda eritilmiştir. Manyetik karıştırıcıda tamamen çözüldükten sonra 121^{o}C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

Kitinli LB Besiyeri: 5 gr maya, 10 gr tripton, 5 gr NaCI ve 10 gr Koloidal Kitin (1M NaOH tamponunda çözülerek) 1 lt distile suda eritilmiştir (pH 7.0±2) 121ºC'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir [125].

M9 besiyeri: 0.65 gr Na_2HPO_4, 1.5 gr KH_2PO_4, 0.25 gr NaCl, 0.5 gr NH4Cl, 0.12 gr $MgSO_4$, 0.005 gr $CaCl_2$, 10 gr Tripton ve 5 gr maya özütü 1 lt distile suda çözülerek otoklavda 121ºC'de 15 dk steril edilmiştir [125].

CHDA besi yeri (Chitinase-detection agar): 1 lt M9 besiyerine 10 gr koloidal kitin ve 20 gr agar ilave edilip çözülerek (pH: 6.5±2) otoklavda 121ºC'de 15 dk steril edilmiştir [125].

2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- 10X Taq DNA polimeraz tamponu $(NH_4)_2SO_4$, % 0.1'lik tween 20
- $MgCI_2$ (25 mM)
- dNTPmix (10 mM)
- Taq DNA polimeraz (5 u/µl)
- Oligonükleotid primerler (Tablo 2.1)

2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz (% 0.05, % 1)
- Tris-asetik asit EDTA (TAE) tamponu, pH 8.0±2 (50x/litre): 242 gr trizma bazı, 57.1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0±2).
- Etidyum bromür (10 mg/ml).

2.1.6. Kitinaz Enziminin Eldesinde Kullanılan Çözeltiler

- % 96'lık Etanol
- 0.1 M Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0±2): 13.8 gr monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) tartılıp 100 ml distile suda çözülerek 1 M NaH_2PO_4 çözeltisi ve 14.2 gr dibazik sodyum fosfat (Na_2HPO_4) tartılıp 100 ml distile suda çözülerek 1 M Na_2HPO_4 çözeltisi hazırlanmıştır. 39 ml 1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden ve 61 ml 1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden olacak şekilde 100 ml 1 M Sodyum fosfat tamponu hazırlanmıştır. 1 M Sodyum fosfat ana stoğundan 25 ml alınıp üzerine 225 ml distile su eklenerek 250 ml 0.1 M Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0±2) hazırlanmıştır [126].

2.1.7. Bradford Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- Coomassie brillant blue G-250 boyası
- % 95 Etanol
- % 85 H_3PO_4

2.1.8. SDS-PAGE Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

• **Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (% 30 T, % 2.7 Cbis):** 30 gr akrilamid, 0.8 gr bis tartılarak 100 ml olacak şekilde distile suda çözülmüştür. 0.22 μm'lik filtreden süzdürerek +4^{o}C de saklanmıştır.

• **4X Ayırma jeli tamponu (1.5 M tris, pH 8.8±2):** 18.15 gr tris distile su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Konsantre HCI ile pH ayarlanıp filtre edilerek +4^{o}C de saklanmıştır.

• **8X Yükleme jeli tamponu (1 M tris, pH 6.8±2):** 12 gr tris distile su ile çözdülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Konsantre HCI ile pH ayarlanıp filtre edilerek +4^{o}C de saklanmıştır.

• **% 10'luk SDS:** 10 gr SDS 100 ml distile suda çözdürülerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

• **% 10'luk amonyum persülfat (APS):** 1 ml distile suda 0.1 gr amonyum persülfat çözülmüştür. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

• **TEMED (tetra metil etilen diamin):** +4^{o}C'de saklanmıştır.

• **Ayırma jeli yüzey çözeltisi (0.375 M tris, %0.1 SDS, pH 8.8±2):** 25 ml 1.5 M tris ve 1 ml % 10'luk SDS distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

• **2X Örnek uygulama tamponu:** 4 ml % 10'luk SDS, 2 ml gliserol, 1.2 ml 1 M tris 2.8 ml suda çözülerek pH 6.8±2'e ayarlanmış ve 0.001 gr bromfenol mavisi eklenerek oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanım esnasında 100 µl 2X stok örnek uygulama tamponuna 90 µl su ve10 µl β-merkaptoetanol eklenerek hazırlanmıştır.

• **10X Tank tamponu**: 30.3 gr Tris ve 144.2 gr Glisin 800 ml distile su da çözülerek pH 8.3±2'e ayarlanmış ve son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanım esnasında 1/10 oranında sulandırılmıştır.

2.1.8.1. Gümüş Boyama Çözeltileri

• **Formaldehitli fiksatif çözeltisi:** 400 ml metanol ve 0.5 ml % 37'lik formaldehit distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

• **% 0.1 Gümüş nitrat**: 50 ml distile suda 10 gr $AgNO_3$ çözülerek % 20'lik stok çözelti hazırlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Kullanım esnasında % 0.1'lik $AgNO_3$ çözeltisi hazırlanıp boyama işlemi yapılmıştır.

• **Tiyosülfatlı görüntü oluşturma (developing) çözeltisi:** 30 gr Na_2CO_3 ve 20 ml 0.2 gr/l sodyum tiyosülfat çözeltisi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Kullanımdan önce her 100 ml'ye 50 µl % 37'lik formaldehit eklenmiştir.

• **2.3 M sitrik asit:** 22.1 gr sitrik asit tartılarak distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

2.1.9. Çalışmada Kullanılan Funguslar

2.1.9.1. Bitki Patojeni Funguslar

- *Fusarium oxysporum*
- *Verticillium dahliae*

2.1.9.2. Küf Mantarı

- *Aspergillus niger*

2.2. Yöntem

2.2.1. *Bacillus sp.* İzolatlarının Çoğaltılması

Bacillus sp. izolatlarının -80°C'de ependorf tüplerde saklanan stok kültürü, çoğaltma işlemi yapılmak üzere önce -20ºC'ye alınmış, bir süre burada tutulduktan sonra 4ºC'de bekletilmiş ve çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında bulunan stok kültürden yaklaşık 100 µl alınarak sıvı LB besiyerine ekilmiştir. Ekim işlemi yapılan besiyeri 30ºC'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde bir gece çoğalan bakteri kültüründen 10 µl alınarak LB agar besiyerine ekilmiş ve bir gece 30°C'de inkübe edilmiştir.

2.2.2. *Bacillus sp.* İzolatlarından Total DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Bravo et al., [127] önerdiği metoda göre yapılmıştır. Standart suşlar ve izolatlar LB besiyerinde 30ºC'de bir gece inkübe edildikten sonra bakteriler 1000x*g*'de 2 dk sanrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pellet üzerine 400 µl steril distile su ilave edilerek vorteksle çözdürülmüş 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 10 sn süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant steril tüplere alınarak PCR işlemlerinde kullanılmıştır.

2.2.3. PCR Yöntemi ile Kitinaz (*chi*) Geni Taşıyan İzolatların Belirlenmesi

Bakterilerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra Tablo 2.1'de verilen primer çiftleri 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 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler thermocycler cihazında reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primerler ve basamaklar;

- Primer 1 F -5'ACGCCATATGCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATAC-3'
  R -5'-AAGTCGACGCGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTAT-3'

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

- Primer 2 F -5'- GACGACGACAAG ATG GATGTTAAACAGGTTCAA- 3'
  R -5'- GAGGAGAAGCCCGGTTATTATTTTTGCAAGGAAAG- 3'

95 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	1 dk.	35 döngü
58 ºC	1.30 dk.	
72 ºC	1.30 dk.	
72 ºC	10 dk.	Son uzama aşaması

- Primer 3 F -5'GACGACGACAAGATGCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATAC-3'
  R -5'-GAGGAGAAGCCCGGTTACGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTATC-3'

94 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	1 dk.	30 döngü
55ºC	1 dk.	
72 ºC	4 dk.	
72 ºC	7 dk.	Son uzama aşaması

- Primer 4 F -5'- GACGACGACAAGATGAAGCTTTTTCCTCCCATACCAA-3'
  R -5'-GAGGAGAAGCCCGGTTAGATGTTTTAATTTTAGACGAACGGAC-3'

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

- Primer 5 F -5'-CATATGATGGTCATGAGGTCTC-3'
  R -5'-GTCGACCTATTTCGCTAATGACG-3'

95 ºC	5 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	2 dk.	30 döngü
50ºC	2 dk.	
72 ºC	1.30 dk.	
72 ºC	12 dk.	Son uzama aşaması

- Primer 6 F -5'-CATATGTTTCCTCCCATACCAACCT-3'
  R -5'-GTCGACAAGCCTTTCCTAACAGGTGA-3'

94 ºC	3 dk.	Başlangıç denatürasyon aşaması
94 ºC	1 dk.	30 döngü
55ºC	1 dk.	
72 ºC	2 dk.	
72 ºC	10 dk.	Son uzama aşaması

- Primer 7 F -5'-CATATGCTAGACAACTTTTTGTATAGGAGTGTTCATATG-3'
  R -5'-GTCGACCGATTGATGAGGGCTAATTATAGTTTTACTTTG-3'

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

2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

PCR reaksiyonundan sonra elde edilen PCR ürünleri + 4^{o}C'de saklanmış ve daha sonra bu ürünlerden 15 µl alınıp 1xTAE'de hazırlanmış % 1'lik (gr/ml) agaroz jelde, 80 V'da 1 saat yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında (Vilbez Lourmat-Image) görüntülenmiş ve Fermentas marka DNA moleküler ağırlık markerı kullanılarak bant büyüklükleri belirlenmiştir.

2.2.5. Kolloidal Kitinin Hazırlanması

Çalışmada kulanılan kitin (Sigma) Adana Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

5 gr toz halindeki kitin, 60 ml konsantre HCl'e yavaşça ilave edilerek, yeteri kadar karıştırıldıktan sonra bir gece +4ºC'de 300 rpm'de çalkalamalı inkübatörde çalkalanmıştır. Karışıma 2 L % 95'lik soğuk etanol ilave edilmiş ve bir gece 25ºC'de bekletilmiştir. Oluşan çökelti 20 dk +4ºC'de 5000x*g*'de santrifüj edilerek bir araya toplanmıştır. Koloidal kitin steril distile su ile nötral (pH 7.0±2) oluncaya kadar +4ºC'de 5000x*g*'de 20 dk yıkanmıştır. % 5'lik kolloidal kitin solüsyonu hazırlanarak kullanılıncaya kadar +4ºC'de saklanmıştır.

2.2.6. Kitinaz Enziminin Üretimi

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren 66 izolat içerisinden, önceki çalışmalarda böcek öldürücü aktivitesi yüksek olduğu bilinen 9 *Bacillus thuringiensis* izolatı ve 2 standart suş seçilerek kitinaz enzimi üretiminde kullanılmıştır. Bu izolatların stok kültürü kitinaz enzimi üretmek için 5 ml % 1 kolloidal kitin içeren LB besiyerine inoküle edilmiş ve 37ºC'de 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilerek yetiştirilmiştir.

Kültür, 2 L hacimli erlenmayerde 500 ml % 1 kolloidal kitin içeren M9 besiyerine inoküle edilmiş ve 3 gün 37ºC'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. [128].

2.2.7. Etanol Presipitasyonu ile Kitinaz Enziminin Eldesi

3 günlük bakteri kültürü +4ºC'de 15000x*g*'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantta bulunan ekstraselüler kitinaz enzimi steril tüplere aktarılmıştır. [128]. Süpernatant Whatman no.5 filtre kâğıdı ile süzülerek (Şekil 2.1) üzerine hacminin % 70'i oranında % 96'lık soğuk etanol eklenmiş ve -33ºC'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra enzimi sıvı fazdan geri kazanmak için çözelti +4ºC'de 10,000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çökelti, 0.1 M sodyum fosfat (pH 7.0±2) tamponunda çözülmüş kullanılıncaya kadar +4ºC'de saklanmıştır [129, 130].



Şekil 2.1. Enzimin filtre edilmesi.

2.2.8. İzolatların CHDA Besiyerinde Kitinaz Aktivitesinin Saptanması

CHDA besiyeri üzerinde açılan kuyucuğa, kısmı saflaştırılmış enzim karışımından 1 ml eklenerek 37ºC'de 2 gün bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda izolatların CHDA besiyeri üzerindeki hidroliz zonu oluşumu gözlemlenmiştir [131].

2.2.9. Bradford Yöntemi ile Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerdeki enzim miktarını belirlemek için Bradford yöntemi kullanılmıştır [132]. 25 gr Coomassie brillant blue G-250 boyası 12.5 ml % 95 etanolda çözdürülüp 25 ml % 85

H_3PO_4 eklenerek son hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra boya 5 kez sulandırılmış ve Whatman no.1 filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanmıştır. 5, 10, 15, 20 ve 25 µl'lik standart BSA çözeltisine (1 mg/ml) 5 ml boya eklenerek 595 nm'de absorbans ölçümü yapılmış ve kör olarak 1 ml distile su kullanılmıştır. Enzim örneklerinde ise 490 µl su içerisine 10 µl protein (enzim) eklenerek üzerine 5 ml bradford boyası ilave edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dk bekletilmiştir ve 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart eğri grafiği hazırlandıktan sonra örneklerin enzim derişimi belirlenmiştir.

2.2.10. SDS-PAGE Analizi

Enzim tayini amacıyla örneklere SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) jel elektroforezi yapılmıştır. % 10-12'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. Ayırma jeli (% 12'lik) çözeltileri 50 ml'lik erlen içerisinde 13.2 ml distile su, 16 ml % 30 akrilamid karışımı, 10 ml tris (1.5 M, pH 8.8±2), 0.4 ml % 10'luk SDS, 0.4 ml % 10'luk amonyum persülfat, 0.016 ml TEMED olacak şekilde 40 ml olarak hazırlandıktan sonra cam tablalar arasına pastör pipeti ile tarak dişlerine 1 cm kalana kadar dökülmüştür. Düz bir yüzey elde etmek ve oksijenle teması kesmek amacıyla ayırma jeli üzerine 2 mm kadar suyla doyurulmuş izopropanol ilave edilmiştir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra (30 dk) izopropanol dökülerek jelin yüzeyi deiyonize suyla iki defa yıkanmış ve kurutma kâğıdı ile kurulanmıştır. Yükleme jeli (% 5) çözeltileri 50 ml'lik erlen içerisinde 6.8 ml distile su 1.7 ml % 30 akrilamid karışımı, 1.25 ml tris (1 M, pH 6.8±2), 0.1 ml % 10'luk SDS, 0.1 ml % 10'luk amonyum persülfat ve 0.01 ml TEMED olacak şekilde karıştırıldıktan sonra, polimerize olan ayırma jeli üzerine dökülmüş ve ardından tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi gerçekleştikten sonra (30 dk) tarak yavaşça çıkarılmış ve polimerize olmayan akrilamidin temizlenmesi için kanallar distile su ile iyice yıkanmıştır. Cam tablalar elektroforez cihazına yerleştirildikten sonra üst ve alt bölmelere Tris-Glisin elektroforez tamponu dökülmüştür [31, 133].

Örnek uygulama tamponu ile birebir oranında karıştırılan protein örnekleri 95^oC'de 10 dk bekletildikten sonra her bir örnekten 30 µl alınarak kanallara yüklenmiştir. Örnekler yükleme jelini geçene kadar elektroforez cihazı 15 mA'de çalıştırılmış, geçtikten sonra

da 25 mA'e çıkarılarak 6 saat yürütülmüştür. Daha sonra cam tablaların arası dikkatlice açılarak boyama işlemine geçilmiştir [31, 136].

2.2.10.1. Jellerin Boyanması

Jellerin boyanması plastik bir kap içerisine 250 ml formaldehit fiksatif çözeltisi eklenmiş ve içerisine bırakılan jel hafif hızda 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Ardından fiksatif dökülerek iki kez 10'ar dk saf su ile hafif çalkalanarak yıkanmıştır. Su uzaklaştırıldıktan sonra 250 ml sodyum tiyosülfat çözeltisi içerisinde 1-2 dk bekletildikten sonra iki defa saf su ile yıkanmıştır. Jel son yıkamadan sonra 250 ml gümüş nitrat çözeltisinde düşük hızda çalkalanarak 20 dk bekletilmiştir. Saf su ile yıkandıktan sonra taze hazırlanmış tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana kadar hafif hızda çalkalanmıştır. Ardından 12 ml 2.3 M sitrik asit eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve jel saf su ile iyice yıkanarak jelin fotoğrafı çekilmişdir [31]. SDS-PAGE analizinde marker olarak Fermantes marka (SM 0661 fermantes) protein markerı kullanılmıştır [132].

2.2.11. İzolatların Bitki Patojeni Funguslar ve Küf Mantarı Üzerindeki Antagonistik Etkisi

İzolatların bitki patojeni funguslar (*Fusarium oxysporum* ve *Verticillium dahliae*) ve küf mantarı (*Aspergillus niger*) üzerindeki antagonistik etkisini belirlemek için çift kültür testi yöntemi kullanılmıştır. Fungusların 7 günlük kültüründen 5 mm çapında bir agar diski alınmış ve daha sonra PDA besiyeri içeren 9 cm'lik bir petrinin ortasına yerleştirilmiştir. 48 saat 25°C'de inkübe edilmiştir. 11 yerel izolatın 48 saatlik kolloidal kitin içeren Nutrient agarda yetiştirilen kültürün saf kolonilerinden öze ucuyla bir miktar bakteri alınarak aynı plaka üzerinde patojen diskten 3 cm uzağına çizgi ekim yapılmış ve 7 gün inkübasyona bırakılmıştır [128]. Etrafına bakteri ekimi yapılmayan, PDA besiyerine inoküle edilen fungus kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir fungus türü için denemeler 9'ar kez tekrarlanmıştır. Antagonistik özellikler, antagonistik koloni yönündeki patojen kolonisinin yarıçapının ölçülmesiyle belirlenmiş ve kontrol petrisinde inhibe edilmemiş patojen kolonisinin yarıçapı ile ilişkili radyal büyümenin inhibisyonu yüzdesi (PIRG) olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır [134].

$$PIRG = R1-R2/R1*100$$

PIRG: Radyal büyümenin inhibisyonu yüzdesi

R1: Kontroldeki radyal büyüme

R2: İzolat uygulama sonrası radyal büyüme

2.2.12. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS for Windows version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA)'ne tabi tutulmuştur.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. PCR Yöntemi ile Kitinaz (*chi*) Geni Taşıyan İzolatların Belirlenmesi

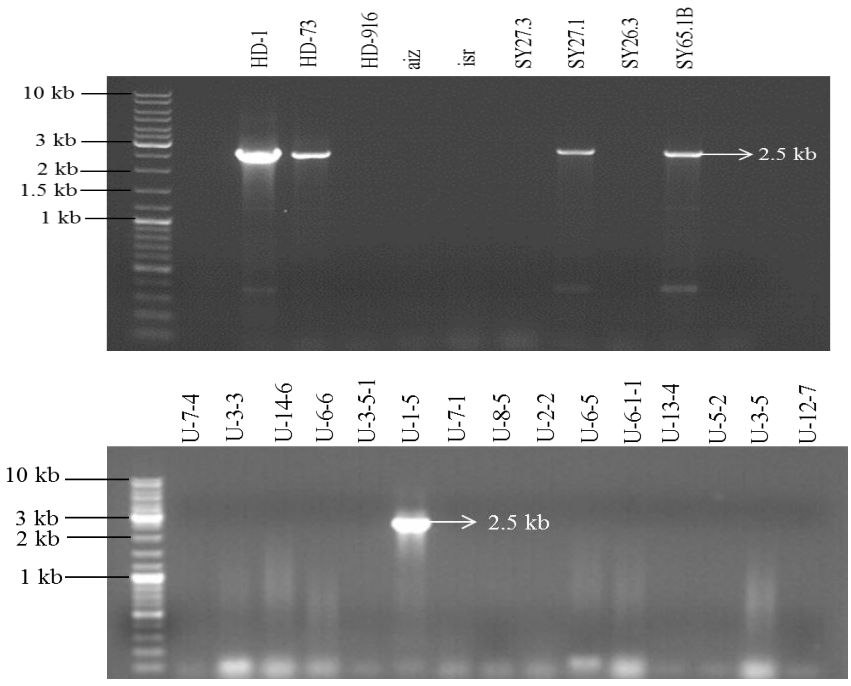
Bravo'nun [127] önerdiği metoda göre *Bacillus* cinsine ait toplam 270 izolattan DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra 270 izolatın total DNA'ları ile Tablo 2.1'de verilen primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve çalışılan 270 izolatın % 24.4'ünün (66 izolat) pozitif bant verdiği belirlenmiştir. Pozitif bant veren 66 izolatta primerlerle elde edilen oran en yüksek primer 1 ile yapılan PCR işlemi sonucunda % 15.5 (42) ve en düşük primer 6 ile yapılan PCR işlemi sonucunda % 1.8 (5) olarak bulunmuştur (Tablo 3.1).

- Primer 1 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 42 izolatın yaklaşık olarak 2.5 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.1).
- Primer 2 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 9 izolatın yaklaşık olarak 1.083 kb büy üklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.2).
- Primer 3 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 27 izolatın yaklaşık olarak 3 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.3).

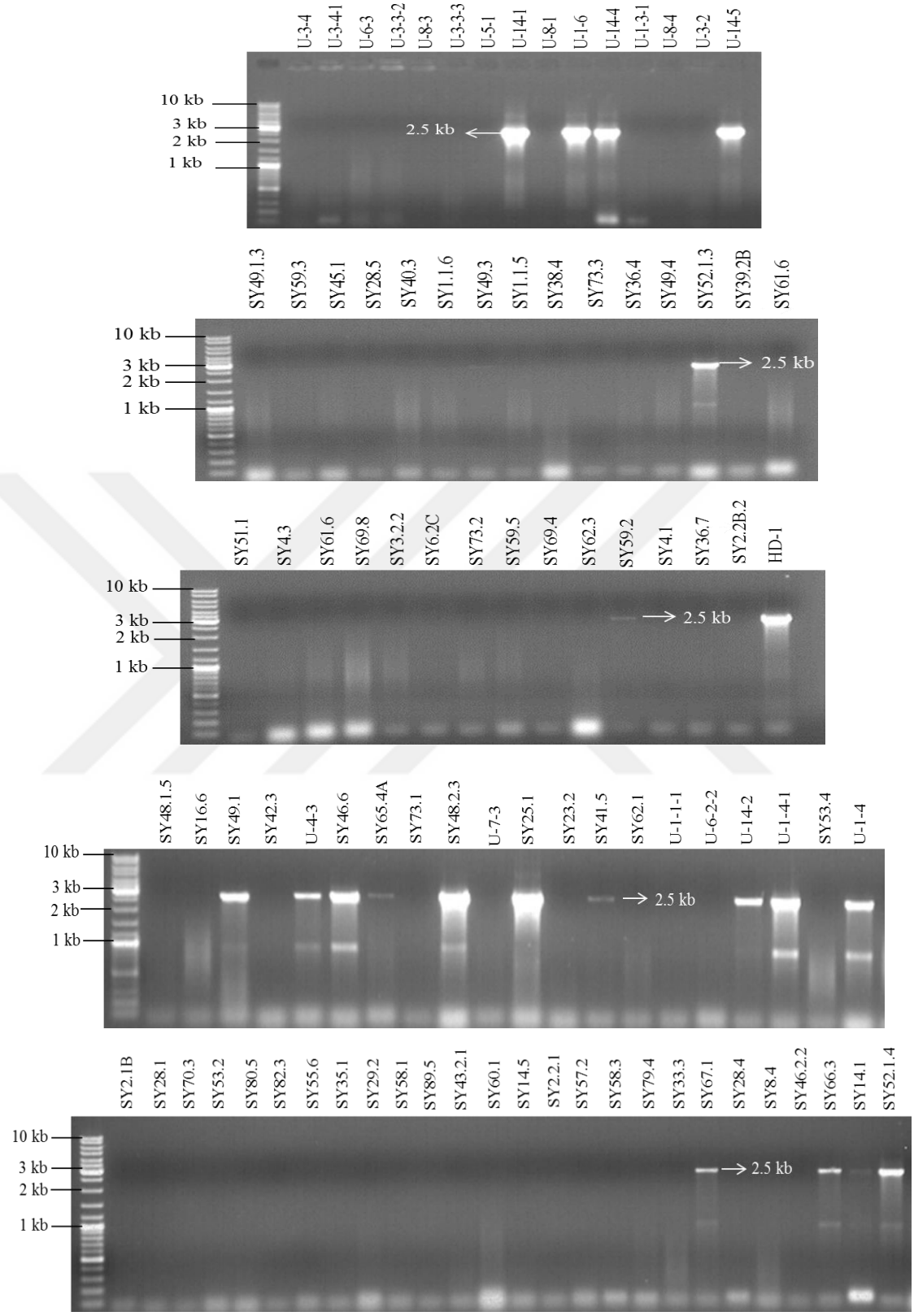
- Primer 4 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 19 izolatın yaklaşık olarak 3.1 kb büyüklüğünde bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.4).

Tablo 3.1. Kitinaz (*chi*) geni taşıyan izolatlar.

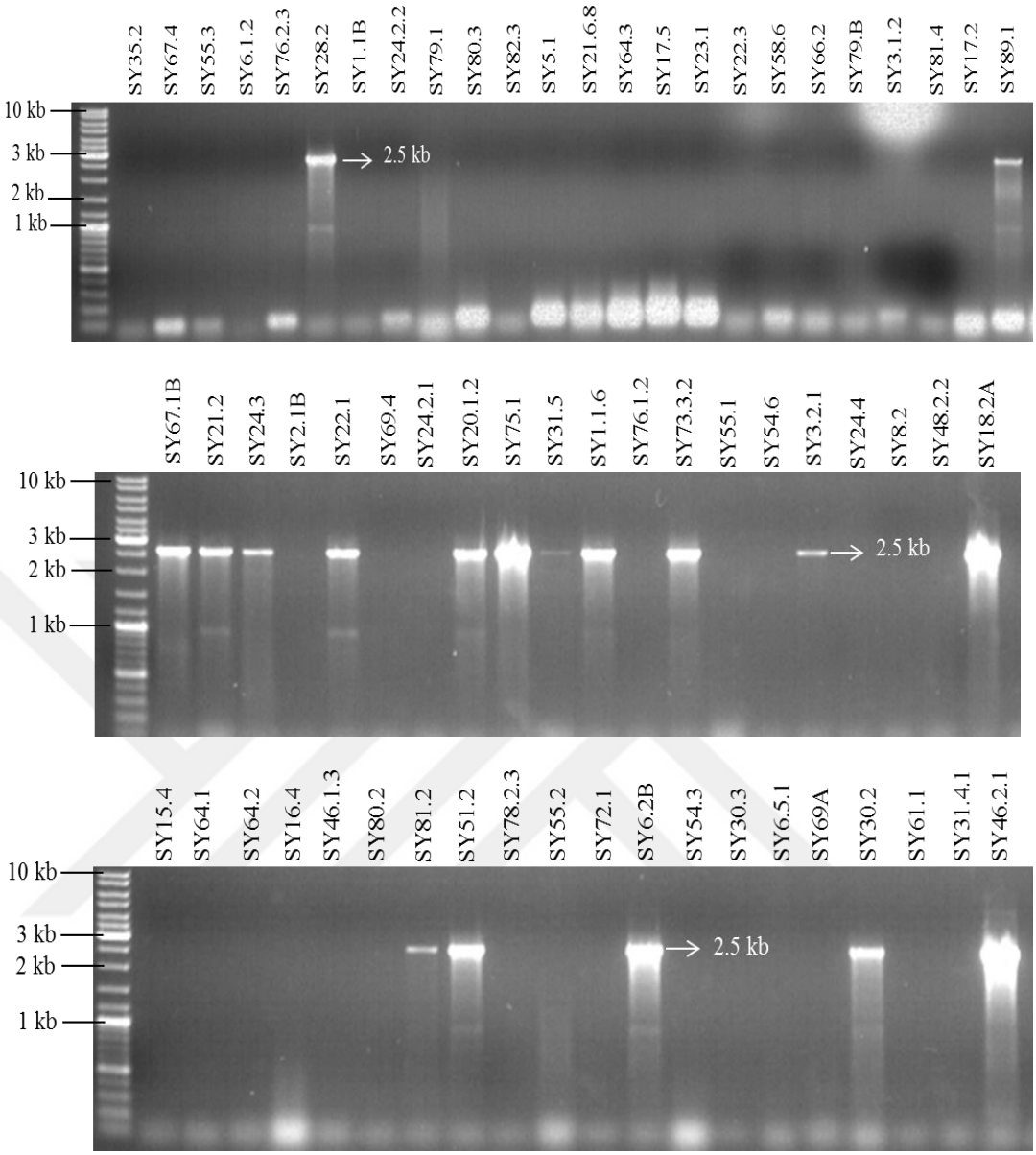
Kitinaz geni	İzolatlar						İzolat sayısı (n)	Primerlerle elde edilen oran (%)
Primer 1	HD-1 SY49.1 SY67.1 SY89.1 SY75.1 SY6.2B U1-6	HD-73 SY46.6 SY66.3 SY21.2 SY31.5 SY30.2 U14-4	SY27.1 SY25.1 SY14.1 SY24.3 SY51.2 SY81.2 U14-5	SY65.1B SY65.4A SY52.1.4 SY20.1.2 SY73.3.2 SY46.2.1 U1-4-1	SY52.1.3 SY48.2.3 SY67.1B SY1.1.6 SY3.2.1 SY18.2A U14-2	SY59.2 SY41.5 SY28.2 SY22.1 U1-5 U14-1 U4-3	42	15.5
Primer 2	HD-1 U14-5	HD-73 U14-1	SY27.1 U14-4	SY65.1.B	U1-5	U1-6	9	3.3
Primer 3	HD-1 SY33.3 SY41.5 U1-5 U14-2	SY27.1 SY14.1 SY52.1.4 U14-1 U1-4	SY49.1 SY46.6 SY6.2B U1-6 U14-1	SY51.2 SY65.4A SY46.2.1 U14-4	SY52.1.3 SY48.2.3 SY18.2A U14-5	SY59.2 SY25.1 SY73.3.2 U4-3	27	10
Primer 4	SY46.6 SY25.1 SY6.2B	SY89.2 SY75.1 SY17.2	SY55.3 SY51.2 SY46.2.1	SY48.2.3 SY52.1.4 SY76.2.3	SY66.3 SY73.3.2 U14-2	SY14.1 SY18.2A U1-4-1 U1-4	19	7
Primer 5	HD-1 SY25.1 SY75.1 SY69.8	HD-73 SY66.3 SY51-2 U14-2	SY27.1 SY17.2 SY6.2B U1-4	SY65.1B SY52.1.4 SY3.2.1 U1-4-1	SY46.6 SY21.2 SY18.2A	SY48.2.3 SY73.3.2 SY52.1.4.5	22	8.1
Primer 6	HD-1	HD-73	SY48.2.3	U14-4	U14-2		5	1.8
Primer 7	HD-1 SY25.1 SY17.2 U14-4 U14-2 U9-1	SY65.1B SY78.2A U7-1 U14-5 U1-4-1 U2-3-1	SY49.1 SY42.2 U8-5 U3-5 U1-4 U2-1	SY59.2 SY49.3 U1-5 U10-1 U4-2 U6-3	SY46.6 SY55.3 U14-1 U7-3 U8-2 U5-1	SY48.2.3 SY76.2.3 U1-6 U3-1 U12-2 U6-2-3	36	13.3



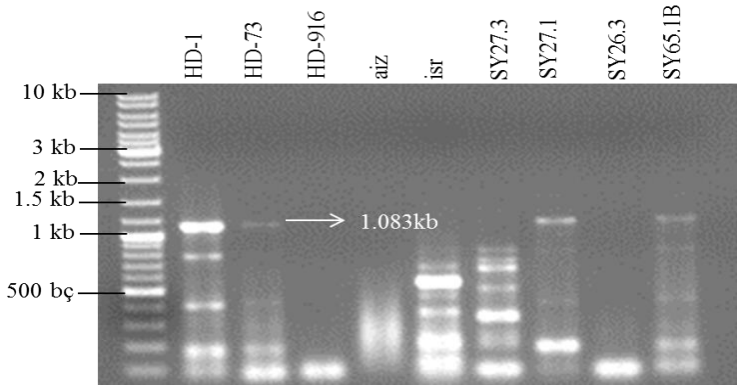
Şekil 3.1. Kontrol suşu ve izolatların primer 1 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.



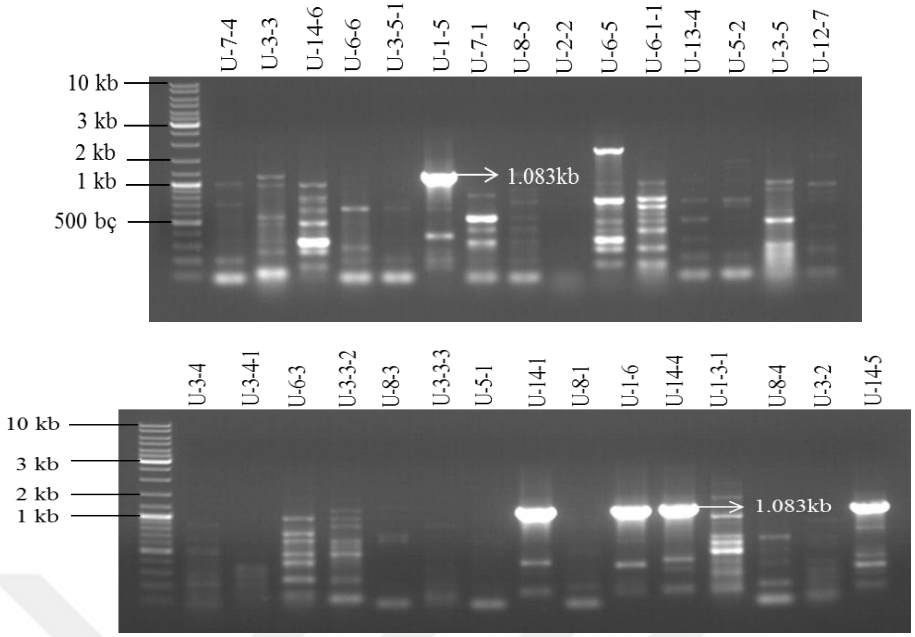
Şekil 3.1. Kontrol suşu ve izolatların primer 1 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).



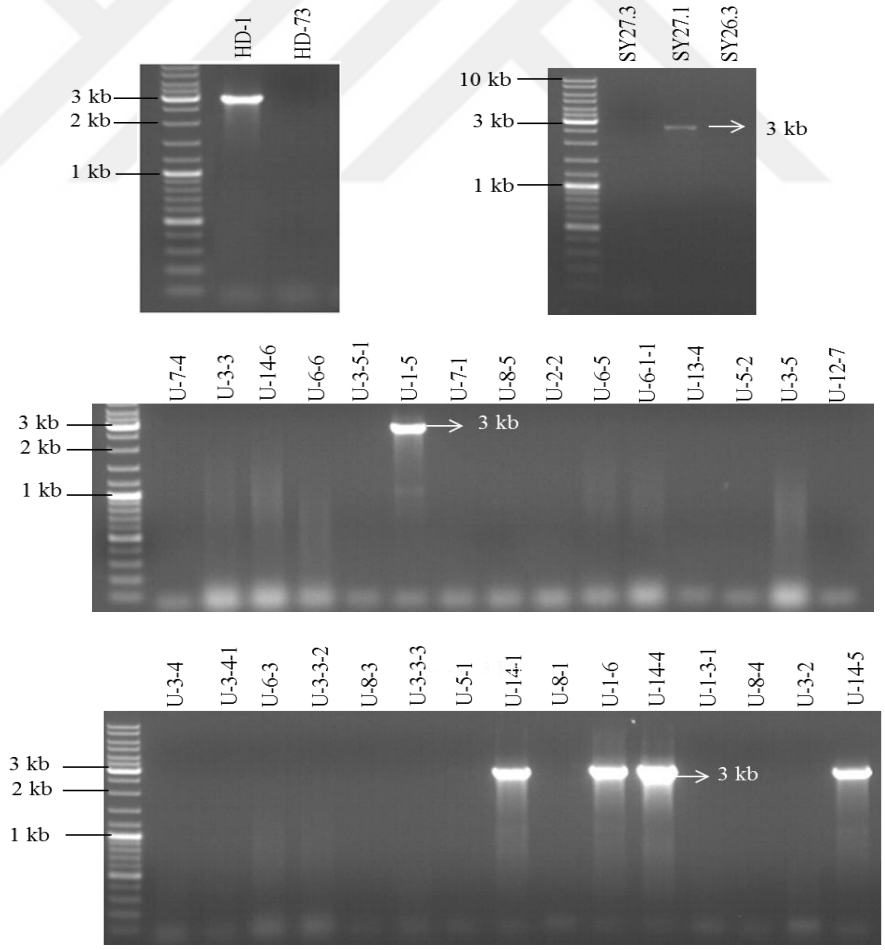
Şekil 3.1. Kontrol suşu ve izolatların primer 1 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).



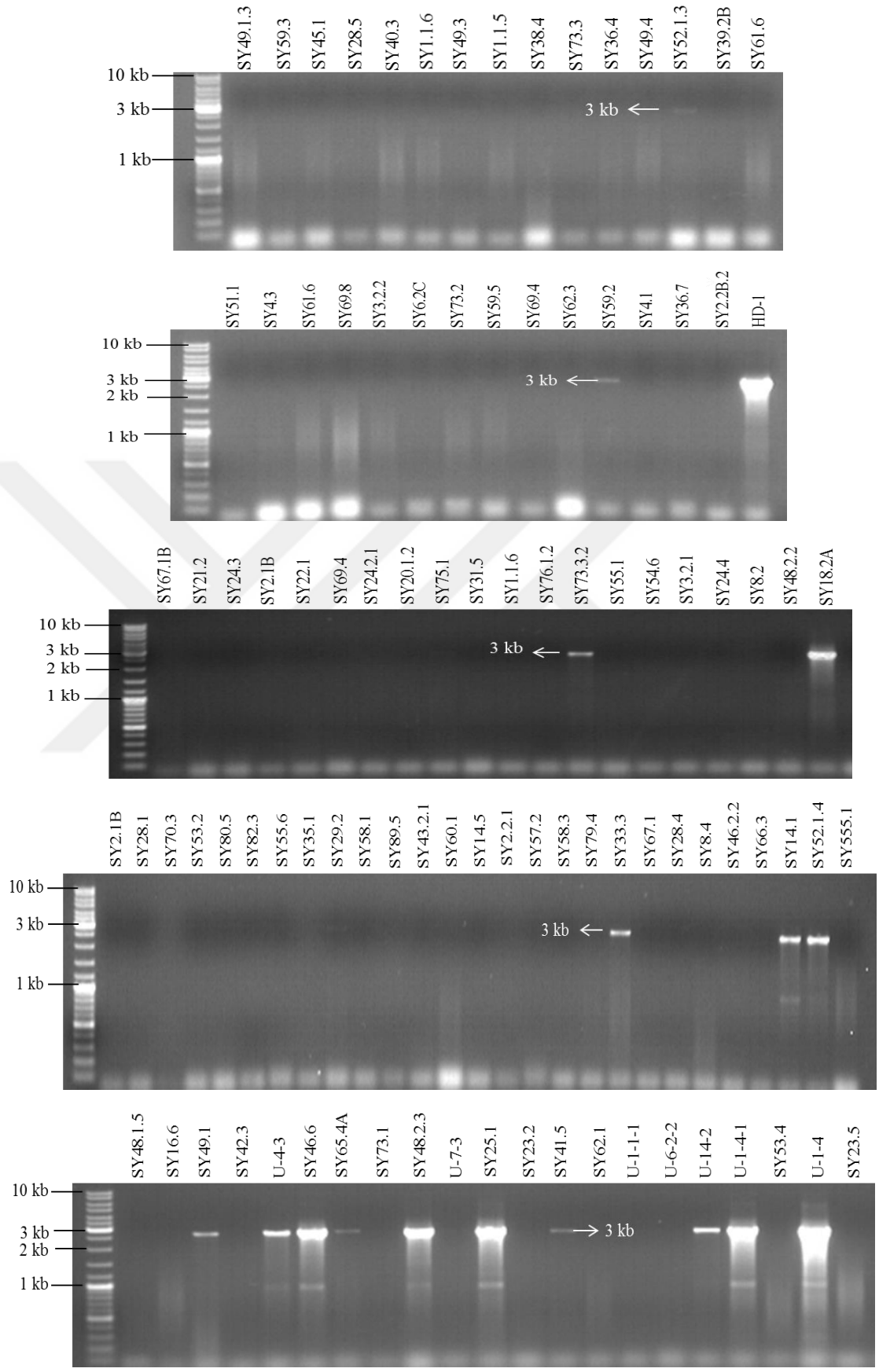
Şekil 3.2. Kontrol suşu ve izolatların primer 2 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.



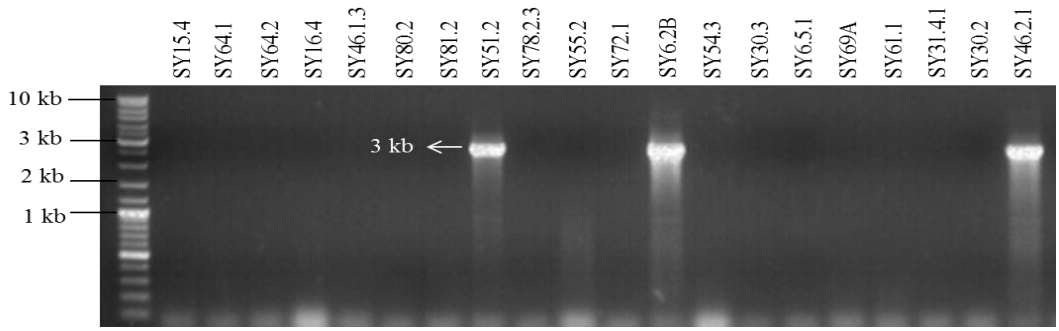
Şekil 3.2. Kontrol suşu ve izolatların primer 2 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).



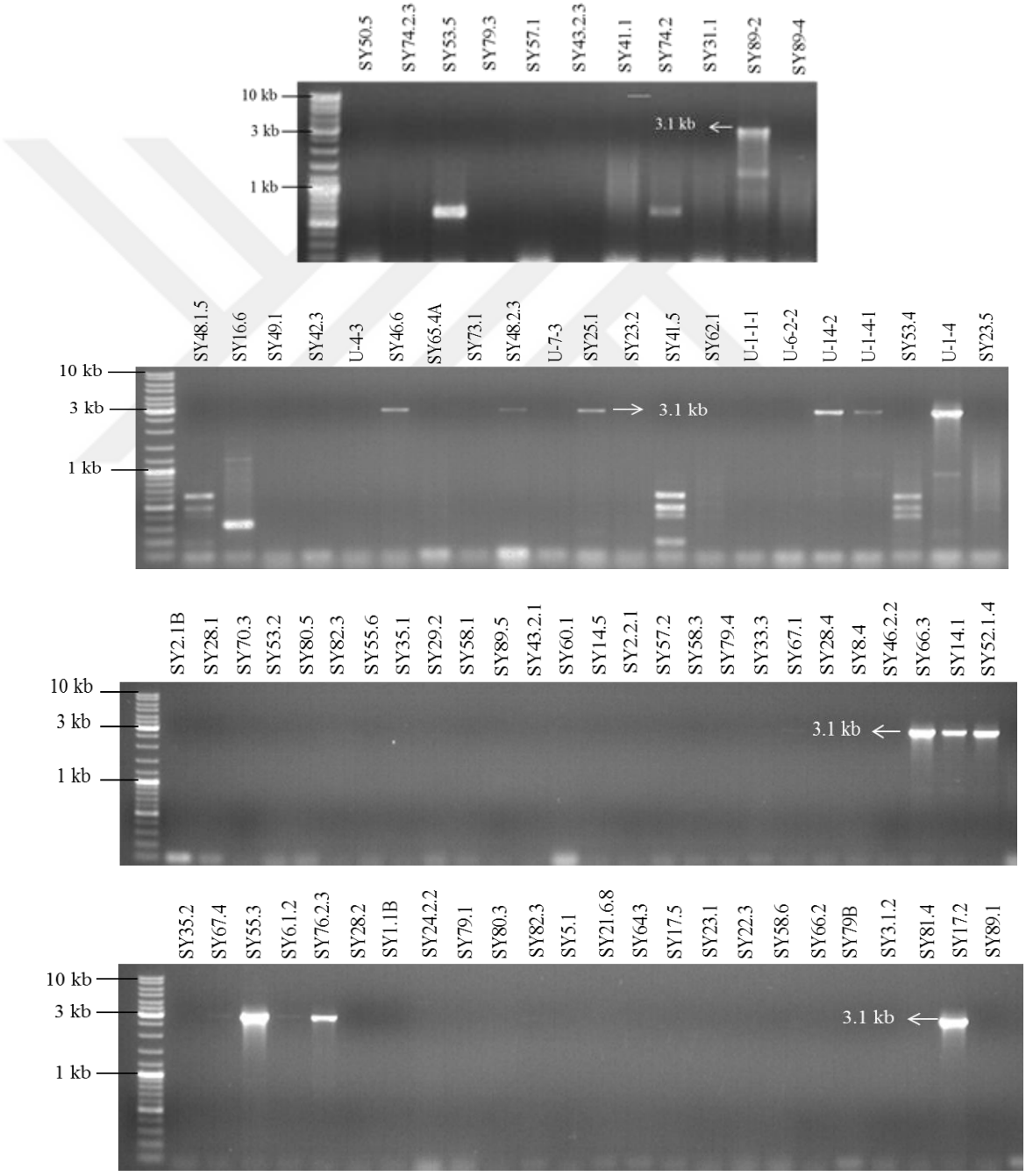
Şekil 3.3. Kontrol suşu ve izolatların primer 3 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.



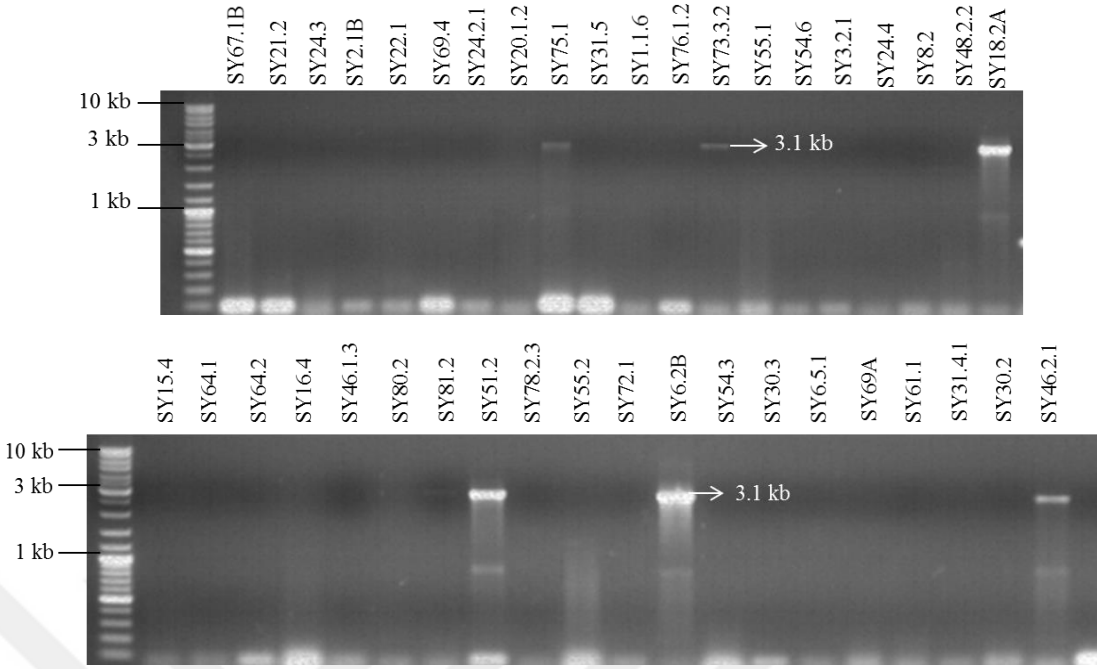
Şekil 3.3. Kontrol suşu ve izolatların primer 3 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).



Şekil 3.3. Kontrol suşu ve izolatların primer 3 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).

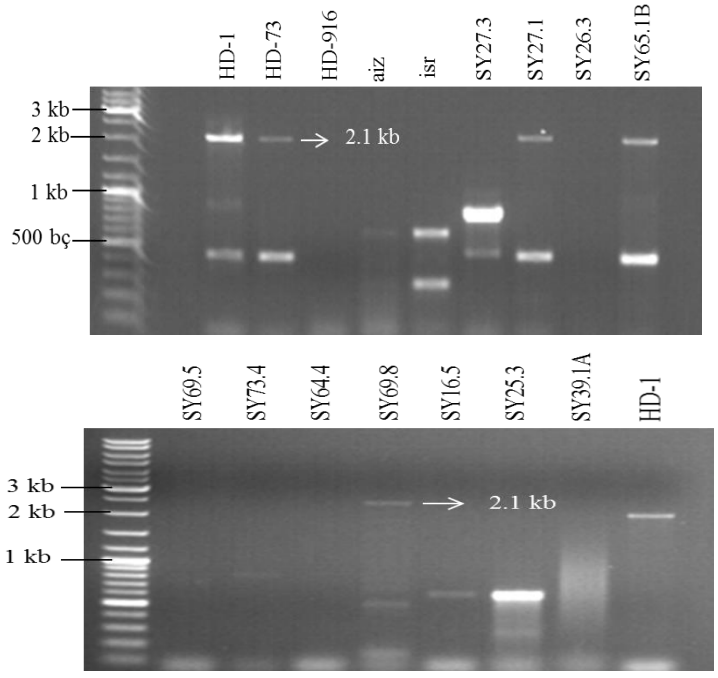


Şekil 3.4. Kontrol suşu ve izolatların primer 4 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).

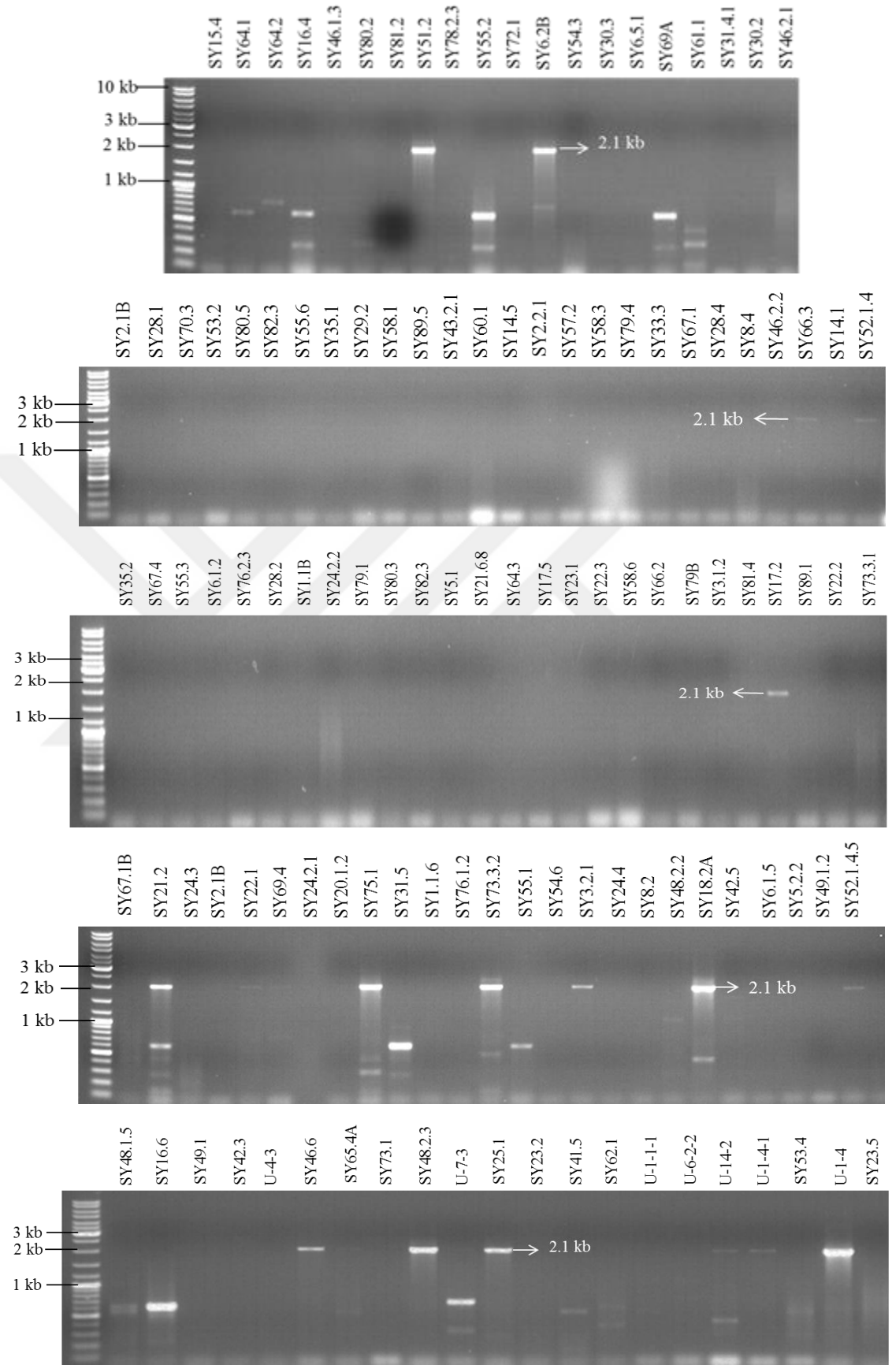


Şekil 3.4. Kontrol suşu ve izolatların primer 4 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).

Primer 5 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 22 izolatın yaklaşık olarak 2.1 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.5).

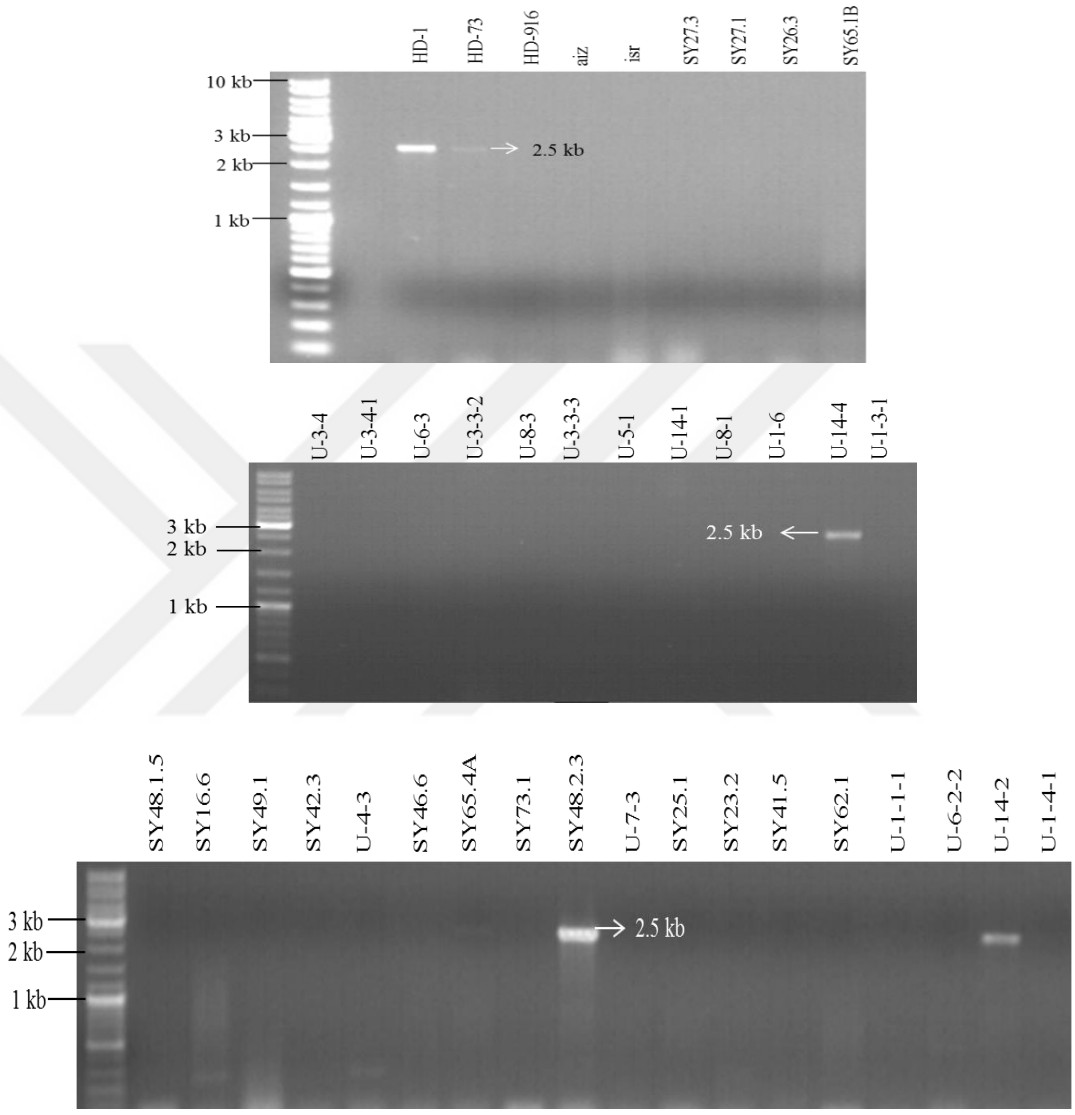


Şekil 3.5. Kontrol suşu ve izolatların primer 5 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.



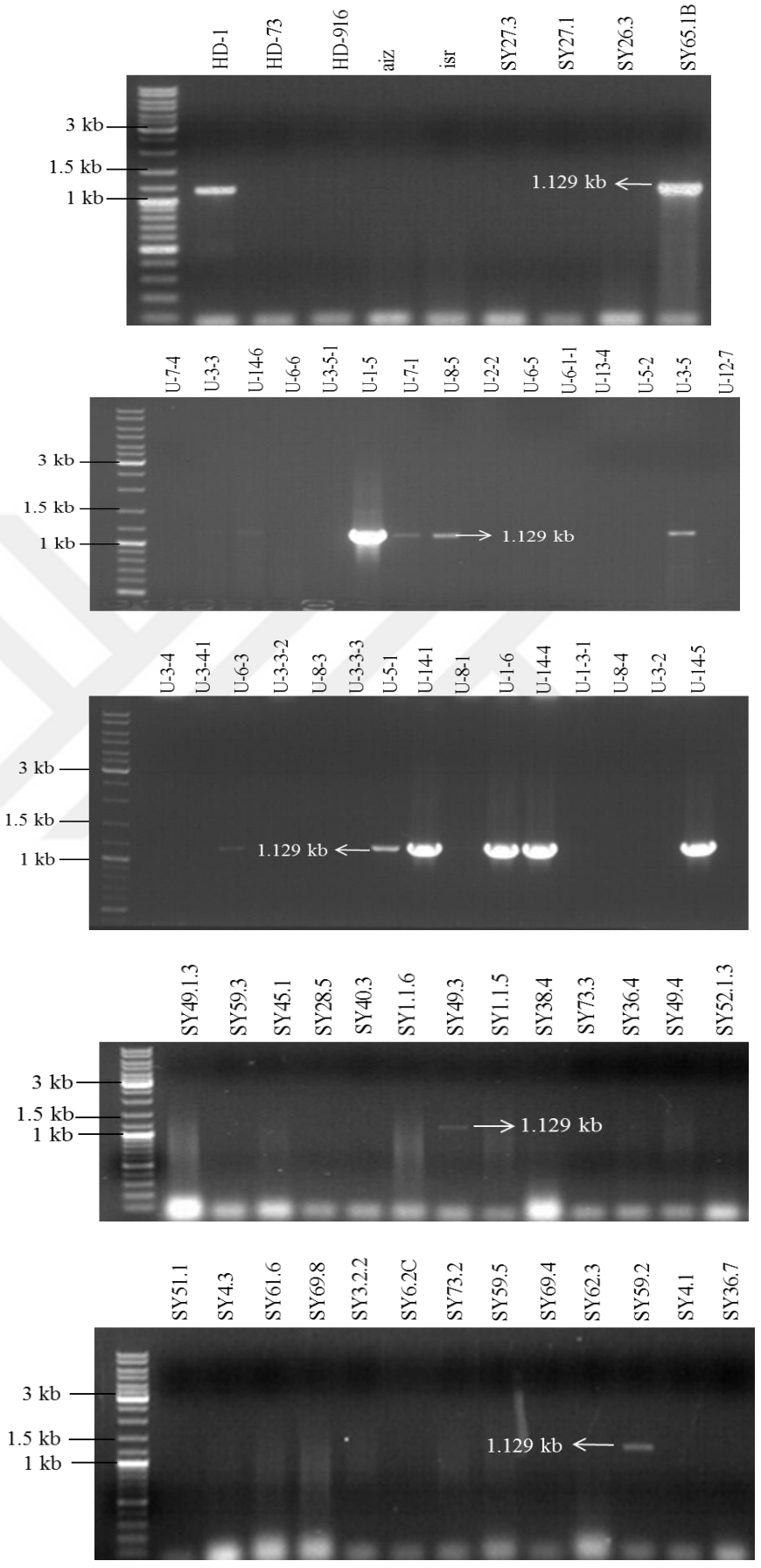
Şekil 3.5. Kontrol suşu ve izolatların primer 5 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).

Primer 6 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 5 izolatın yaklaşık olarak 2.5 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.6).

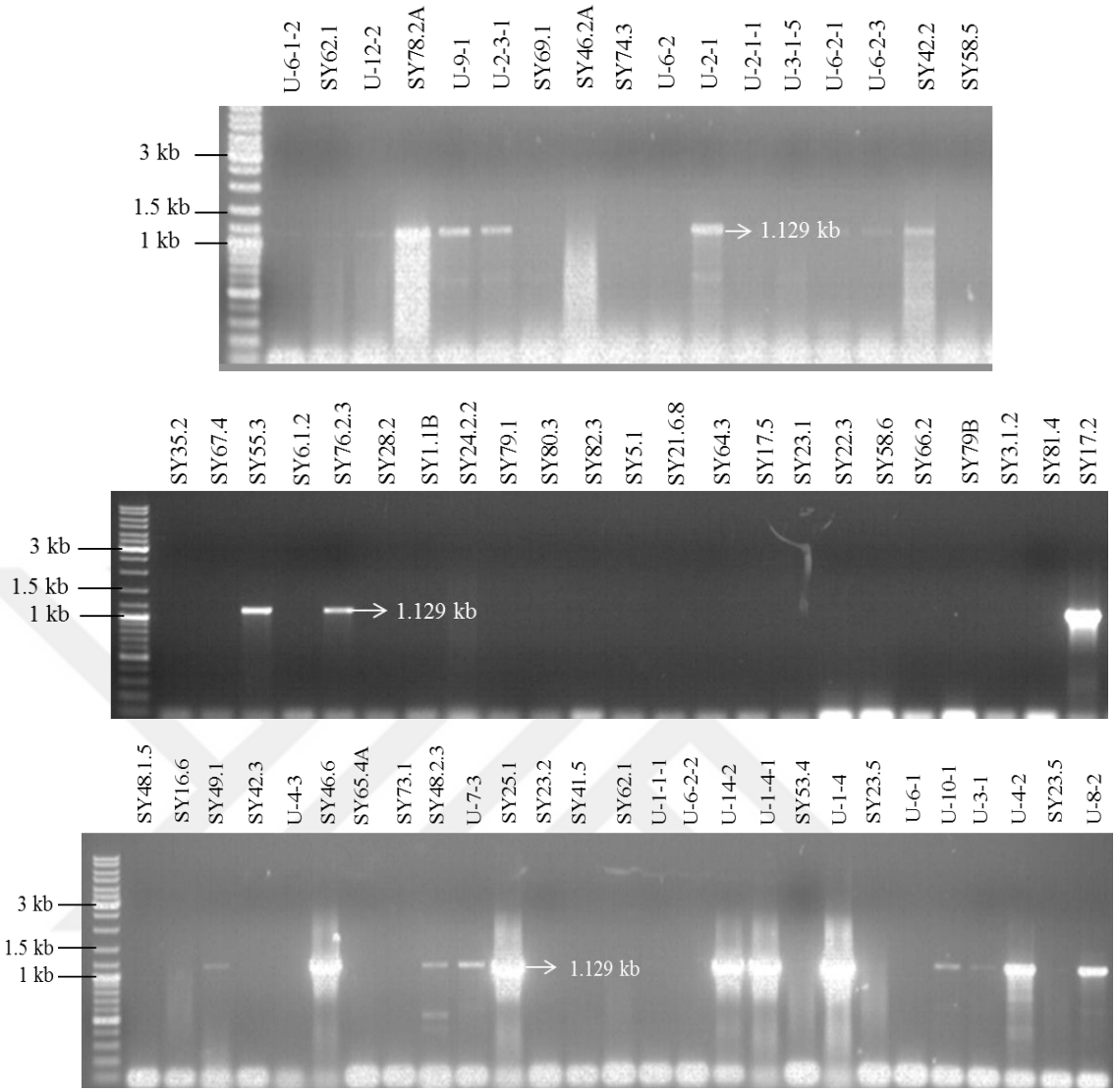


Şekil 3.6. Kontrol suşu ve izolatların primer 6 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.

Primer 7 ile yapılan PCR işlemi, Tablo 2.1'de belirtilen primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra 36 izolatın yaklaşık olarak 1.129 kb büyüklüğünde ve beklenen boyutta bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.7).



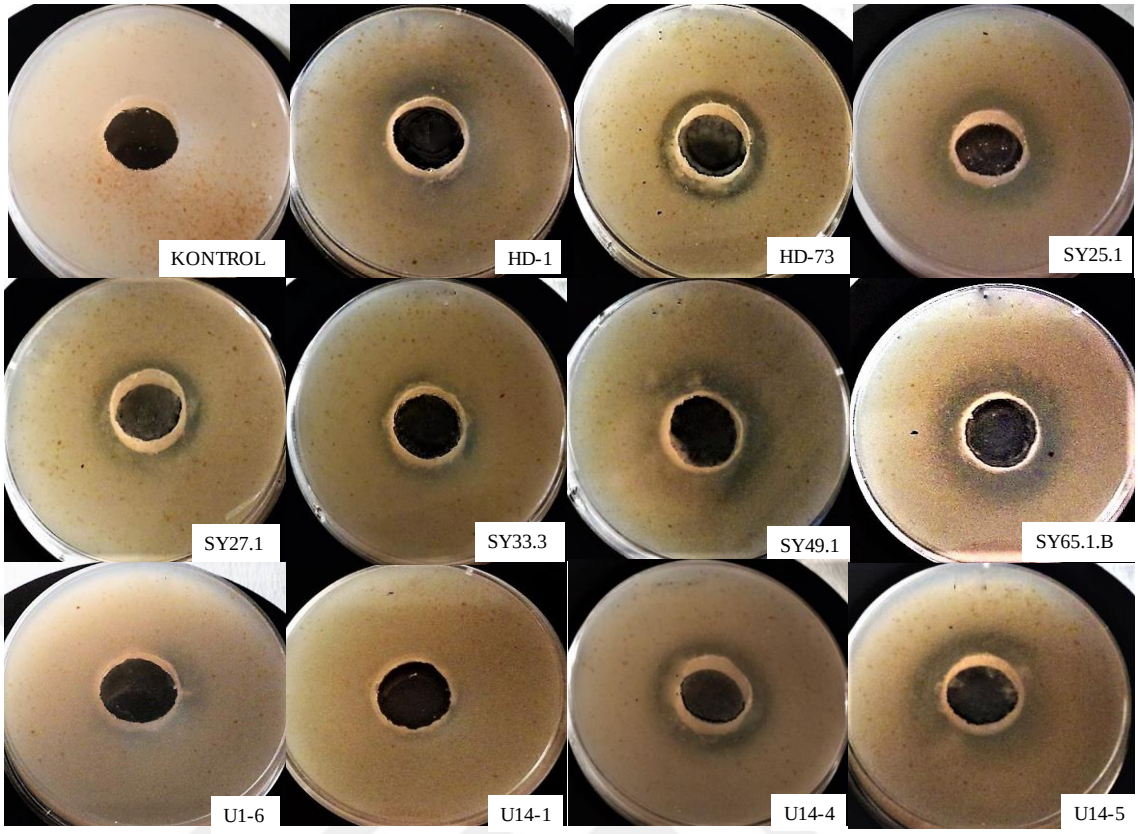
Şekil 3.7. Kontrol suşu ve izolatların primer 7 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü.



Şekil 3.7. Kontrol suşu ve izolatların primer 7 ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (Devam).

3.2. İzolatların CHDA Besiyerinde Kitinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

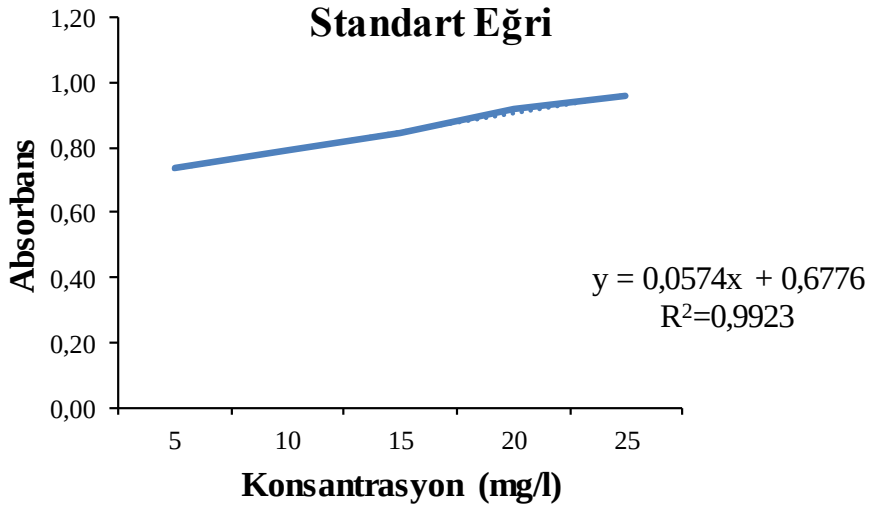
PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren 66 izolat içerisinden, önceki çalışmalarda insektisidal aktivitesi yüksek olduğu bilinen 2 standart suş (HD-1, HD-73) ve 9 *Bacillus thuringiensis* izolatı seçilerek enzim aktivitesi belirlenmiştir. CHDA besiyeri üzerinde açılan kuyucuğa, kısmı saflaştırılmış enzim karışımından 1 ml damlatılmış ve inkübasyon süresi sonunda izolatların besiyeri çevresinde hidroliz zonu (şeffaflaşma) oluşumu gözlenmiştir. HD-1 ile HD-73 standart suşlarında ve SY25.1, SY27.1, SY33.3, SY49.1, SY65.1B, U1-6, U14-1, U14-4, U14-5 izolatlarında hidroliz zonu oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.8).



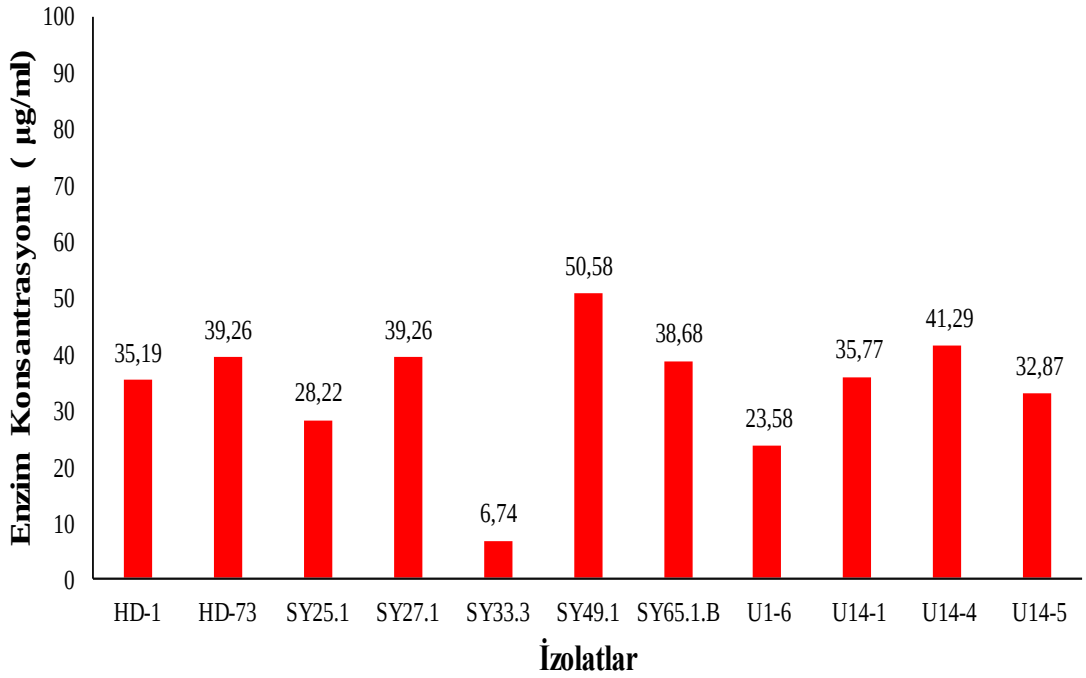
Şekil 3.8. Kontrol suşu ve izolatların CHDA besiyeri üzerindeki hidroliz zonu oluşumu.

3.3. Bradford Yöntemi ile Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Örneklerden elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin Bradford yöntemi ile enzim konsantrasyonları belirlenmiştir. Bradford analizinde standart olarak BSA kullanılmıştır (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Enzim konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart eğri grafiği.



Şekil 3.10. İzolatların enzim konsantrasyonları.

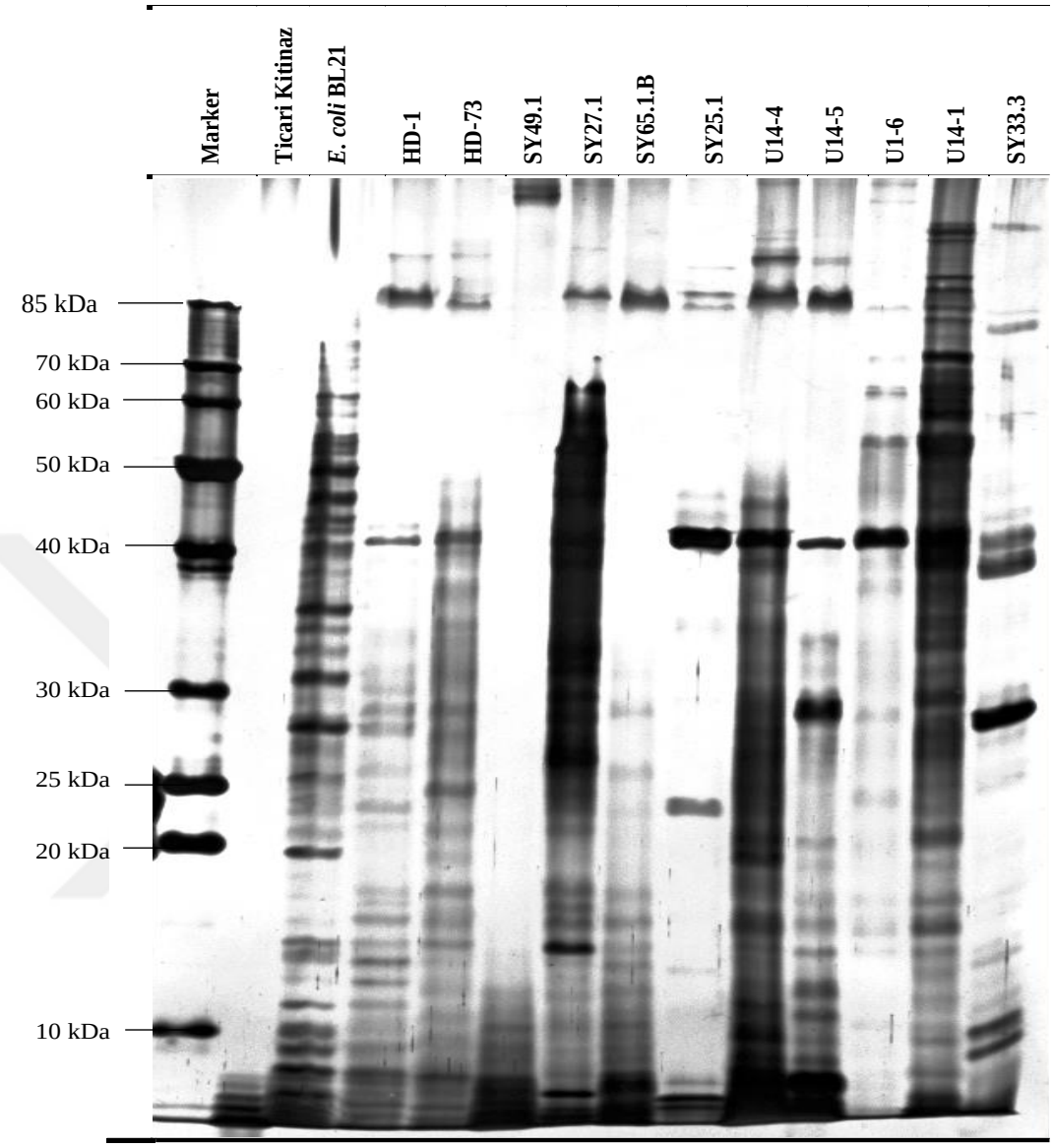
En yüksek enzim konsantrasyonu SY49.1 izolatında 50.58 µg/ml, en düşük enzim konsantrasyonu ise SY33.3 izolatında 6.74 µg/ml olarak belirlenmiştir.

3.4. SDS-PAGE Analizi

Kolloidal kitin içeren M9 besiyerinde 3 gün boyunca yetiştirilen 9 *Bacillus thuringiensis* izolatı ve 2 standart suşun üretmiş oldukları kitinaz enzimini belirlemek amacıyla SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi) yapılmıştır (Şekil 3.11). Tüm izolatların PCR analizinde çeşitli büyüklüklerde bantlar oluşturduğu ve gen büyüklükleri ile uyumlu şekilde SDS-PAGE analizinde beklenen büyüklüklerde protein bantları oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2). SDS-PAGE analizinde marker olarak Fermantes marka (SM 0661 Fermantes) protein markerı kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak ticari kitinaz (*Streptomyces griseus*) kullanılırlen, negatif kontrol olarak *Escherichia coli* kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan ticari kitinaz enziminin miktarı (5 U/µl) çok düşük olduğundan dolayı SDS-PAGE analizinde protein bandı tespit edilememiştir.

SDS-PAGE'de tespit edilen bu protein bantları dışında ekstra protein bantlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu bantların diğer kitinaz geni haplotipleri olduğu ve daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 3.11. Kontrol suşu ve izolatların SDS-PAGE görüntüsü.

Tablo 3.2. İzolatların PCR ve SDS-PAGE bant büyüklükleri.

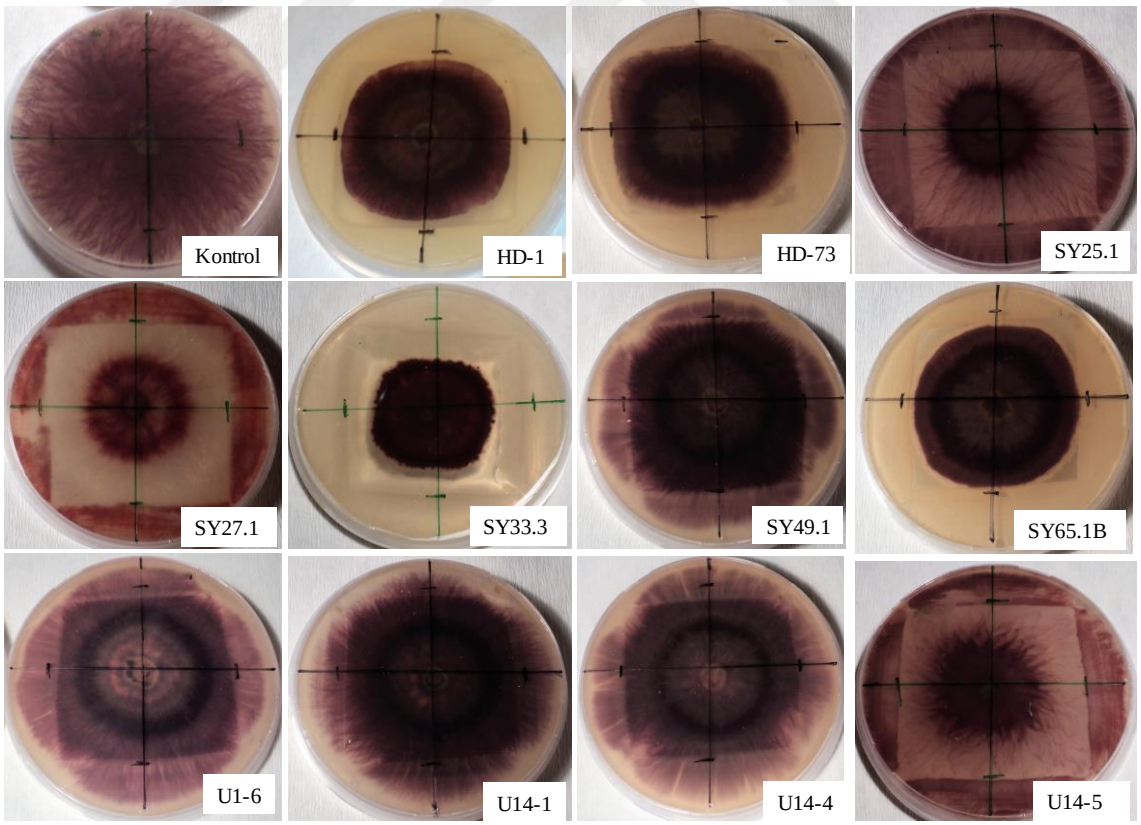
İzolatlar	HD-1	HD-73	SY49.1	SY27.1	SY65.1B	SY25.1	U14-4	U14-5	U1-6	U14-1	SY33.3
PCR bant büyüklüğü (kb)	1.083 1.129 2.5	1.083 2.5	2.5 3	1.083 2.5 3	2.5	1.129 2.5 3	1.083 1.129 2.5 3	1.129 2.5 3	1.083 1.129 3	1.083 1.129 2.5	3
SDS-PAGE protein moleküler ağırlığı (kDa)	39.71 41.39 91.66	39.71 91.66	91.66 110	39.71 91.66 110	91.66	41.39 91.66 110- 113	39.71 41.39 91.66 110	41.39 91.66 110	39.71 41.39 110	39.71 41.39 91.66	110

3.5. İzolatların Bitki Patojeni Funguslar ve Küf Mantarı Üzerindeki Antagonistik Etkisi

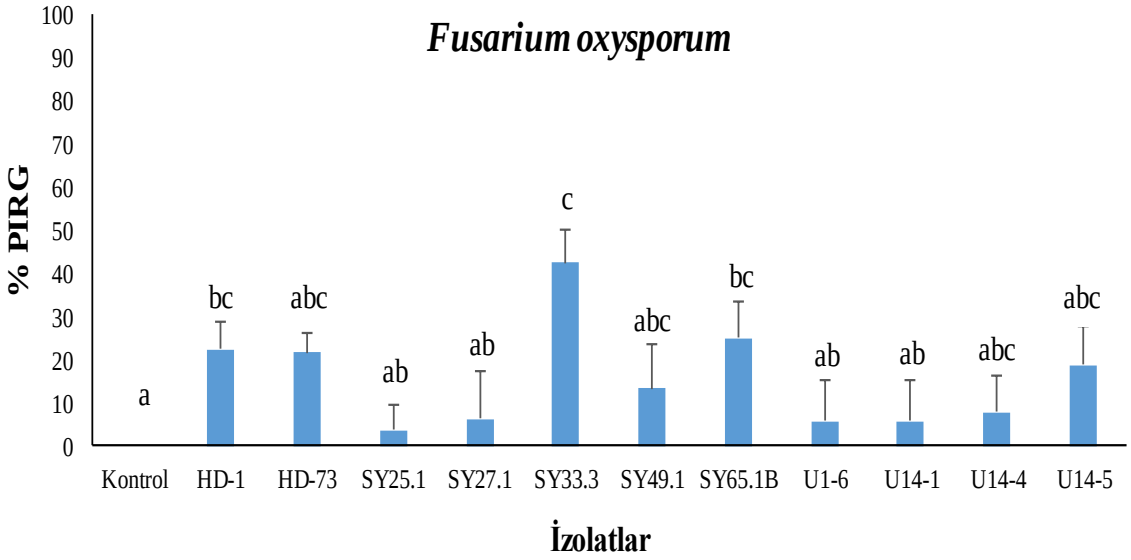
İzolatlar ve kontrol suşlarının bitki patojeni funguslar (*F. oxysporum* ve *V. dahliae*) ve küf mantarı (*A. niger*) üzerindeki antagonistik etkisini belirlemek amacıyla çift kültür testi yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. *Bt* İzolatlarının *Fusarium oxysporum* Üzerindeki Antagonistik Etkisi

PDA besiyerinde 48 saat yetiştirilen *F. oxysporum*'un bulunduğu ortama kolloidal kitin içeren Nutrient agar besiyerinde yetiştirilen izolatların saf kolonilerinden alınıp aynı besiyeri ortamına inokule edilerek fungus üzerindeki antagonistik etkisi radyal büyüme inhibisyon yarıçapı ölçülerek 7 gün boyunca gözlemlenmiş radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) hesaplanmıştır. Yapılan denemelerde kontrol ile kıyaslandığında fungusa karşı en iyi büyüme inhibisyonunun SY33.3 izolatında görüldüğü daha sonra HD-1 standart suşunda ve SY65.1B izolatında görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *F. oxysporum* üzerindeki antagonistik etkisi.

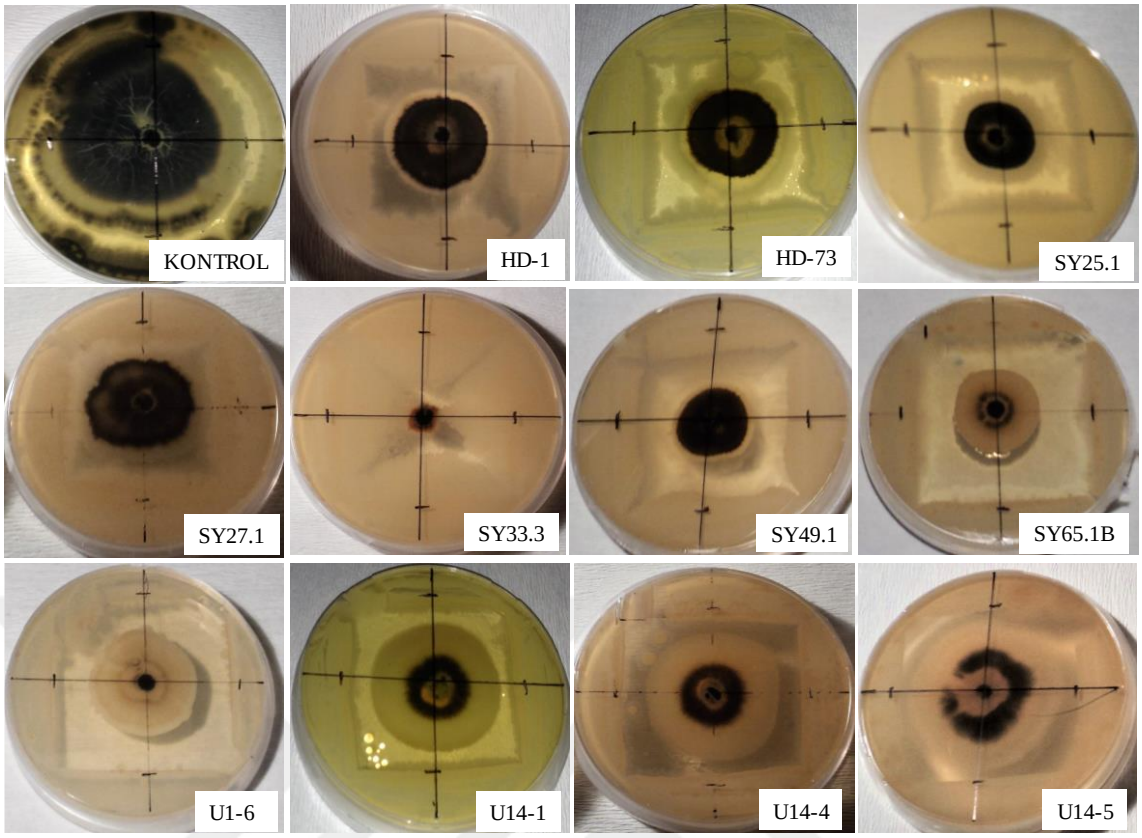


Şekil 3.13. İzolatların *F. oxysporum* üzerindeki % PIRG değerleri.

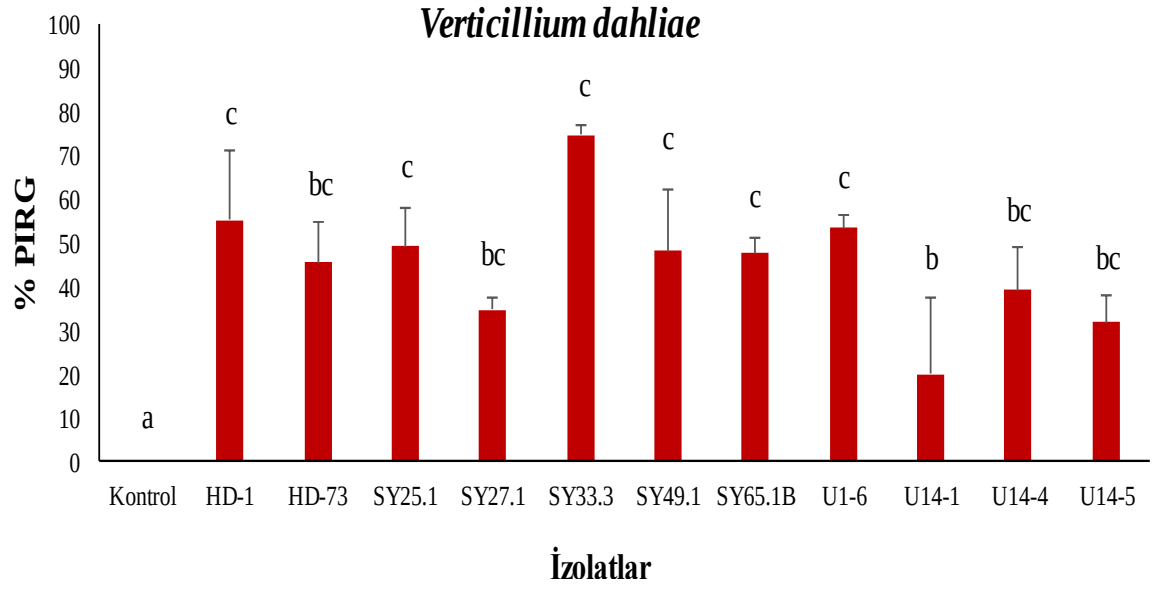
Radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) analizi sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek değer SY33.3 izolatı için % 42.36, SY65.1B için % 25, HD-1 için % 22.22 olarak hesaplanmış ve en düşük değer ise % 3.47 ile SY25.1 izolatında olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.13). İstatistiksel analizler sonucuna göre SY33.3, SY65.1B ve HD-1'in kontrol grubundan farklı olduğu belirlenmiş ancak kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Diğer izolatların ise kontrol grubu ve kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ($F= 4.830$; $df=11$; $P<0.001$).

3.5.2. *Bt* İzolatlarının *Verticillium dahliae* Üzerindeki Antagonistik Etkisi

PDA besiyerinde 48 saat yetiştirilen *V. dahliae*'nin bulunduğu ortama kolloidal kitin içeren Nutrient agar besiyerinde yetiştirilen izolatların saf kolonilerinden alınıp aynı besiyeri ortamına inokule edilerek fungus üzerindeki antagonistik etkisi radyal büyüme inhibisyon yarıçapı ölçülerek 7 gün boyunca gözlemlenmiş ve radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) hesaplanmıştır. Yapılan denemelerde tüm suşlar fungusun büyümesini bir dereceye kadar etkilemiş ancak kontrol ile kıyaslandığında fungusa karşı en iyi büyüme inhibisyonunun SY33.3 izolatında görüldüğü daha sonra HD-1 standart suşunda ve U1-6, SY25.1, SY49.1 ve SY65.1B izolatlarında görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *V. dahliae* üzerindeki antagonistik etkisi.



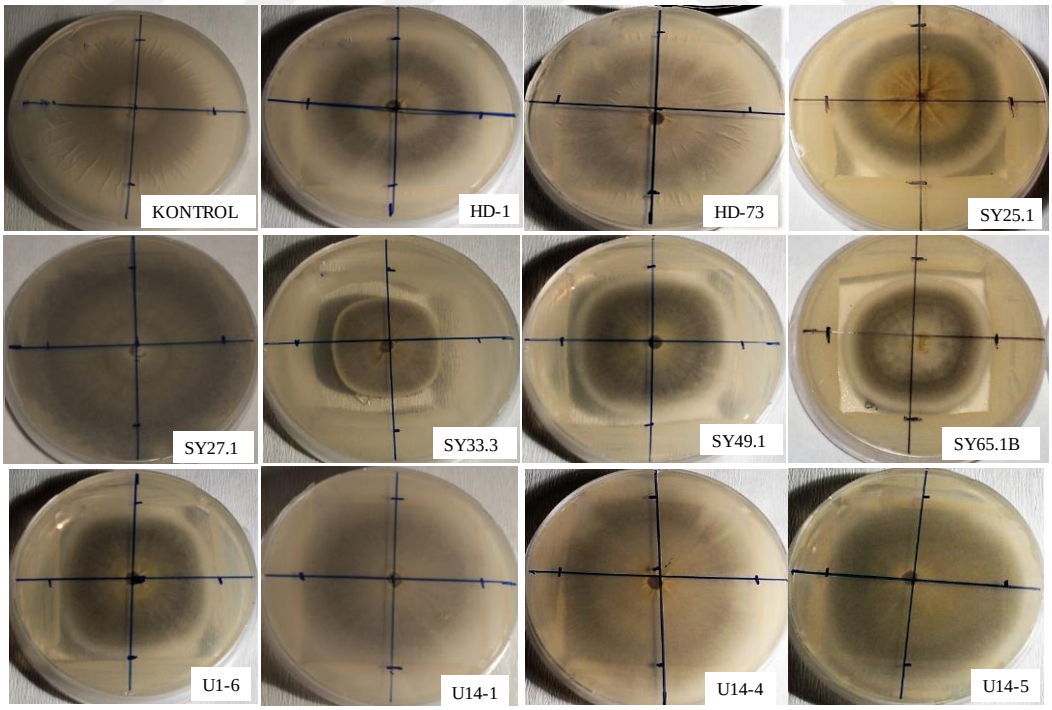
Şekil 3.15. İzolatların *V. dahliae* üzerindeki % PIRG değerleri.

Radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) analizi sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek değer SY33.3 izolatı için % 74.70, HD-1 için % 55.20, U1-6 için % 53.44, SY25.1 için % 49.08, SY49.1 için % 48.01, SY65.1B için % 47.44 olarak hesaplanmış

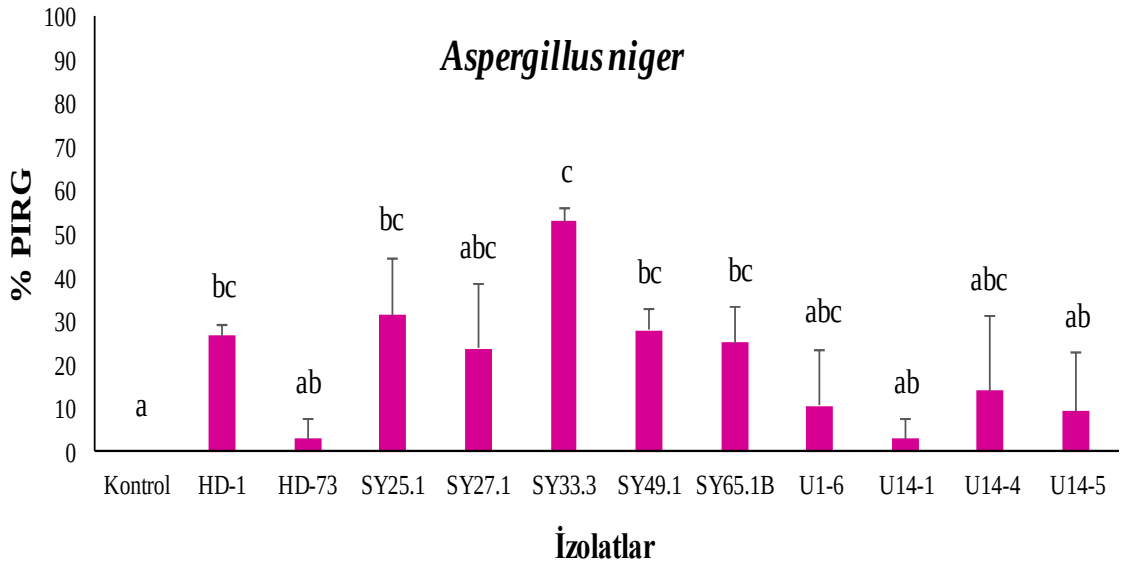
ve en düşük değer ise % 19.93 ile U14-1 izolatında olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3.15). İstatistiksel analizler sonucuna göre tüm izolatların kontrol grubundan faklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca SY25.1, SY49.1 ve U1-6 izolatları *F. oxysporum*'da en düşük radyal büyüme inhibisyon yüzdesine sahip iken; *V. dahliae*'de radyal büyüme inhibisyon yüzdesi yüksek bulunmuştur. Diğer izolatların ise kontrol grubundan farklı olduğu belirlenmiş ancak kendi aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır (F= 12.772; df=11; P<0.001).

3.5.3. *Bt* İzolatlarının *Aspergillus niger* Üzerindeki Antagonistik Etkisi

PDA besiyerinde 48 saat yetiştirilen *Aspergillus niger*'in bulunduğu ortama kolloidal kitin içeren Nutrient agar besiyerinde yetiştirilen izolatların saf kolonilerinden alınıp aynı besiyeri ortamına inokule edilerek fungus üzerindeki antagonistik etkisi radyal büyüme inhibisyon yarıçapı ölçülerek 7 gün boyunca gözlemlenmiş ve radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) hesaplanmıştır. Yapılan denemelerde kontrol ile kıyaslandığında fungusa karşı en iyi büyüme inhibisyonunun SY33.3, SY25.1, SY49.1, SY65.1B izolatlarında ve HD-1 standart suşunda görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Standart suşların ve izolatların çift kültür testi ile *A. niger* üzerindeki antagonistik etkisi.



Şekil 3. 17. İzolatların *A. niger* üzerindeki % PIRG değerleri.

Radyal büyüme inhibisyon yüzdesi (PIRG) analizi sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek değer SY33.3 izolatı için % 52.78, SY25.1 için % 31.25, SY49.1 için % 27.78, HD-1 için % 26.39 ve SY65.1.B için % 25 olarak hesaplanmış ve en düşük değer ise % 2.78 ile U14-1 izolatında ve HD-73 standart suşunda hesaplanmıştır (Şekil 3. 17). İstatistiksel analizler sonucuna göre SY33.3, SY25.1, SY49.1, HD-1 ve SY65.1B'in kontrol grubundan farklı olduğu belirlenmiştir. ($F= 5.747$; $df=11$; $P<0.0001$). Ayrıca SY25.1 ve SY49.1 izolatları *F. oxysporum*'da en düşük radyal büyüme inhibisyon yüzdesine sahip iken; *A. niger*'de radyal büyüme inhibisyon yüzdesi yüksek bulunmuştur.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Bacillus* cinsine ait yerel bakteri izolatlarında (270 örnek) kitinaz (*chi*) geni taranmış ve bu yerel izolatların gen frekansı belirlenmiştir. Pozitif sonuç alınan (66 örnek) izolatlar içerisinde daha önceki yapılan çalışmalarda insektisidal aktivitesinin yüksek olduğu bilinen 9 *Bacillus thuringiensis* izolatı ve 2 standart suşun bitki patojeni *Fusarium oxysporum, Verticillium dahliae* ve *Aspergillus niger* üzerindeki antagonistik etkileri belirlenmiştir.

Saleema et al., [135] yaptıkları çalışmada, karides kabuklarından kitin elde etmişler ve 17 *Bacillus* izolatının kitinolitik etkinliğini araştırmışlardır. Spesifik primer kullanılarak SBS *Bt*-5 suşundan PCR ile endokinitaz genini çoğaltmışlardır. Protein, molekül ağırlığını 74.53 kDa olarak tespit etmişlerdir. *chi* geninin amino asit dizisi, *Bt* MR11 endokitinaz, *Bt* serovar *kurstaki* kitinaz (*kchi*), *Bt* MR21 endokitinaz ve *Bacillus cereus* B4264'ün genleri ile % 99 benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Bir diğer çalışmada Djenane et al., [136] endokitinaz ve ekzokitinaz genlerinin varlığını spesifik gen primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu sonucuna göre değerlendirmiş ve toplam 137 *Bt* izolatının 88'nin (% 64.2) en az bir çeşit kitinaz geni taşıdığını, 66'sının (%48.2) ekzokitinaz geni için pozitif ve 82'sinin (% 59.9) endokitinaz geni için pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca 60 izolatın (% 43.8) her iki geni taşıdığını ve sadece 28'inin (%20.4) ifade edildiğini belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada da buna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda farklı kitinaz primerleriyle yapılan PCR reaksiyonu sonucunda toplam 270 izolatın % 24.4'ünün (n:66) pozitif bant verdiği belirlenmiş ve % 13.3'ünün (n:36) 1'den fazla kitinaz geni içerebileceği tespit edilmiştir.

Pozitif bant veren 66 izolatta primerlerle elde edilen oran en yüksek % 15.5 (n:42) ile primer 1'de ve en düşük % 1.8 (n:5) ile primer 6'da bulunduğu saptanmıştır. Jel görüntülerinde çıkan ilave bantların ise bu izolatlara ait yeni kitinaz genleri olabileceği düşünülmüştür.

Bhushan [137], çevrede yaygın bulunabilen *Bacillus sp.* BG-11'yi izole etmiş ve tanımlamıştır. Bu bakteri kitince zenginleştirilmiş ortamda, 50ºC de 72 saat, sıvı batch fermantasyonda 76 U/ml kitinaz üretmiş ve SDS-PAGE'de enzimin moleküler ağırlığını yaklaşık olarak 41 kDa olarak bulmuştur.

Vaidya et al., [138] yapmış oldukları çalışmada; *Alcaligenes xylosoxydans*'tan izole ettikleri kitinaz enziminin moleküler ağırlığını yaklaşık 45 kDa olarak saptamışlar ve saflaştırılan enzimin, *Aspergillus niger* misellerini parçaladığını belirtmişlerdir.

Yuli et al., [139] Endonezya'nın Tompaso bölgesinin sıcak su kaynağında kitinaz üreten bir bakteri izole etmiş ve bu bakteriyi 16S rRNA sekans analizine göre *Bacillus sp.* 13,26 olarak tanılamışlardır. Bu suş, % 5'lik kitin içeren besiyerinde 55^{o}C'de 72 saat inkübasyona bırakıldığında ekstrasellüler kitinaz üretmiş ve saf enzimin moleküler ağırlığının 60 kDa olduğu belirlemişlerdir.

Birçok araştırmacı kitinaz enzimlerinin 26-200 kDa arasında değişen moleküler ağırlıkta olduğunu bildirmişlerdir [140-142]. Benzer şekilde Kuzu [84], kitinaz üreticisi olan *Bt* HBK-51 suşundan kısmi saflaştırma ile elde ettiği kitinaz enziminin 50 ve 125 kDa boyutlarında 2 ayrı bant içerdiğini tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise 2 standart suş ve 9 yerel *Bt* izolatı kolloidal kitinli ortamda yetiştirilmiş ve kültür süpernatantından kısmi saflaştırma ile her bir izolattan kitinaz enzimi elde edilmiştir. 2 standart suş ve 9 izolatdan elde edilen enzimin SDS-PAGE' de moleküler ağırlıkları 39.71, 41.39, 91.66 ve 110-113 kDa arasında değiştiği tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizinde tespit edilen bu protein bantları dışında ekstra protein bantlarının varlığı da gözlenmiştir. Bu bantların diğer kitinaz geni haplotipleri olabileceği ve bunu tespit için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Younas et al., [143] fıstık tohumlarından elde edilen kitinazı, olarak saflaştırdıklarında enzimin 30 kDa ağırlığında monomerik protein olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılmış kitinazın kitinli agar plağı üzerindeki kitinolitik aktivitesi araştırıldığında enzim

ünitesindeki artışa bağlı olarak hidroliz zon çapının arttığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da enzim aktivitesini belirlemek amacıyla CHDA besiyeri üzerinde açılan kuyucuğa, kısmı saflaştırılmış enzim karışımından 1 ml damlatılmış ve inkübasyon süresi sonunda izolatların besiyeri çevresinde hidroliz zonu (şeffaflaşma) oluşumu gözlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında tüm izolatların hidroliz zonu oluşturdukları gözlenmiş fakat izolatlar kendi aralarında kıyaslandığında farklı derecelerde hidroliz zonu oluşturdukları belirlenmiştir.

Bacillus izolatlarının patojenik ve mikotoksijenik küflerin gelişimini engellediği birçok araştırıcı tarafından ortaya konmuştur. Zhang et al. [144], *Stenotrophomonas maltophilia* C3 suşu'nun *Bipolaris sorokiniana*'ya karşı kitinli sıvı ortamda kitinaz ürettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi ve kitin afinite kromotografisi ile sıvı kültürden kısmı saflaştırma yöntemi ile enzim saflaştırılmıştır. Araştırmacılar *Stenotrophomonas maltophilia* C3 suşunun antifungal etkinlik gösteren en az iki kitinaz enzimi ürettiğini bildirmişlerdir.

Sindhu ve Dadarwal [145] yeşil fasülye (*Vigna radiata* L.) ve nohutun (*Cicer arietinum* L.) rizosferinden izole edilen *Pseudomonas* suşlarını kitinaz bakımından taramışlar ve 5 *Pseudomonas* suşunun *Pythium aphanidermatum* (Oomycete) ve *Rhizoctonia solani* (Basidiomycete)'nin gelişimini engellediğini belirlemişlerdir.

Kim et al., [146] çalışmalarında kitinaz enziminin *Botrytis cinerea*'a karşı antifungal aktivite gösterdiğini ve enzimin fungusun hücre duvarında lizozimal etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Yan et al., [147] domates fide testlerinde, *Bacillus subtilis* SL-13 suşunun bitki patojeni olan *Rhizoctonia solani* mantarının büyümesini inhibe ederek domates fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarının sırasıyla % 42.86 ve % 18.75 oranında arttığını belirlemişler ve çalışma sırasında antifungal özellik gösteren enzimin kitinaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Ma et al., [148] yaptıkları çalışmada *Gliocladium catenulatum*'dan izole ettikleri ve saflaştırdıkları kitinaz enziminin çeşitli bitki patojeni fungusların çimlenmesini ve hifal büyümesini engellediğini belirlemişlerdir.

Safran fidelerindeki kök çürüklüğü hastalığına neden olan *Fusarium solani'*ye karşı çeşitli izolatların antagonistik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 48 kök ve rizosferik toprak numunesinden 11 bakteri türü izole edilmiş ve bu bakterilerin *in vitro* çift kültür denemelerinde *F. solani'*de misel büyümesini nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda EM9 ve ES7 izolatların fungus patojenine karşı daha yüksek radyal büyüme inhibisyonu oluşturdukları belirlenmiştir [149]. Kitinolitik bakterilerin antifungal aktivitesi ve kitinaz üretme kabiliyeti arasında yüksek korelasyon olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar 11 izolatı 16S rRNA homolojisi ve fenotipik özelliklerine dayalı olarak dört cins içinde sınıflandırmışlardır. Bunlardan 7 izolatın *Bacillus sp*. ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve 3 tanesinin *B. cereus*, 3 tanesinin *B. thuringiensis* ve 1 izolatın ise *B. subtilis* olduğu belirlenmiştir.

Daulagala [150], kitinli ortamda 4 *Bt* izolatını yetiştirmiş ve kitinolitik aktivite açısından taramıştır. Tüm izolatlar hücreye bağlı fraksiyonlarda çok düşük seviyelerde ekstraselüler kitinaz aktivitesi göstermişlerdir.

Cho et al., [151] tarım topraklarından, izole ettikleri çubuk şeklindeki bakterilerin *Fusarium oxysprorum, Rhizoctonia solani* ve *Phytium ultimum* gibi önemli bitki patojeni funguslara karşı etkinliklerini araştırmışlar ve bu 4 *Bacillus* izolatının patojenik funguslara karşı güçlü antagonistik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Reyes-Ramírez et al., [152] *Bt* kitinazının antifungal aktivitesini *S. rolfsii* ile istila edilmiş soya fasulyesi tohumlarında ve bitki patojeni funguslar üzerinde araştırmışlardır. Soya fasulyesi tohumları *S. rolfsii* ile enfekte edildiğinde, çimlenme oranı % 93'ten % 25'e düşmüş ancak kitinaz (0.8 U/mg protein) uygulandığında çimlenmenin % 90'a kadar arttığı gözlenmiştir. Fungus inhibisyonunun *S. rolfsii* için % 100 oranında olduğu *A. terreus, A. flavus, Nigrospora sp., Rhizopus sp., A. niger, Fusarium sp., A. candidus, Absidia sp.* ve *Helminthosporium sp.* için ise % 55 ile % 82 arasında değiştiği belirlenmiştir. *Curvularia sp* ve *A. fumigatus* için ise inhibisyon zonu sırasıyla % 45 ve % 10 olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar *Bt* kitinazının, entegre mücadele programlarında soya fasulyesi tohumlarında *S. rolfsii* ve diğer bitki patojeni fungusların biyolojik kontrolüne etkin bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ghasemi et al., [153] yüksek tuzluluğa sahip ortamdan *Bacillus pumilus* SG2 bakterisini izole etmişler ve bakterinin ChiS ve ChiL enzimlerini ürettiklerini belirlemişlerdir.

Araştırmacılar bu kitinaz enzimlerini saflaştırıp *Fusarium graminearum, Rhizoctonia solani, Magnaporthe grisea, Sclerotinia sclerotiorum, Trichoderma reesei, Botrytis cinerea* ve *Bipolaris sp.*'e karşı uyguladıklarında antifungal etki gösterdiklerini belirlemişlerdir

Al Banna et al., [154] ise *Bt*'ye ait yedi farklı suşun çözülebilir proteinlerinin antifungal etkisini *in vitro* da *F. oxysporum, F. proliferatum* ve *R. solani*'ni gibi bitki patojeni funguslar üzerinde denemişler ve *Bt*'nin *F. proliferatum* ve *F. oxysporum* üzerinde etkili solduğunu belirtmişlerdir. *Bt entomocidus* ve *Bt* (J115)'nin, *F. oxysporum Bt pakistani* (J107)'nin ise *R. solani* üzerinde en yüksek ativiteye sahip olduğunu, *Bt* (J139)'un ise pek etkili olmadığını bildirmişlerdir. *Bt* suşlarının çözünür proteinlerinin, funguslarda değişik düzeyde engelleyici etki gösterdiklerini belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar antimikrobiyal uygulamalar için en etkili *Bt* suşlarının çözünür proteinlerinin geliştirilerek zararlılara karşı kullanılmalarını önermişlerdir.

Yaptığımız çalışmada standart suş ve *Bt* izolatlarının *F. oxysporum, V. dahliae* ve *A. niger* üzerindeki antagonistik etkileri araştırılmış ve çift kültür testi yöntemi ile radyal büyüme inhibisyon yüzdeleri (PIRG) hesaplanmıştır. Yapılan denemelerde 9 izolat arasından 2 izolatın *F. oxysporum*'a karşı etkili olduğu ve fungus gelişimini engellediği tespit edilmiş, 7 izolatın ise patojene karşı çok fazla etkili olmadıkları belirlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında patojene karşı en iyi radyal büyüme inhibisyonu SY33.3 ve SY65.1B izolatlarında gözlenmiştir. SY33.3 izolatının oluşturduğu inhibisyon zonu standart suşlardan daha etkili olmuştur.

V. dahliae'a karşı da çeşitli *Bacillus* izolatlarından elde edilen kitinaz enzimlerinin etkileri araştırılmıştır. Li et al., [155] patlıcan rizosferinden çeşitli bakteri izolatları elde etmişler ve bunlardan *Bacillus cereus* CH2 suşunun 15 kDa büyüklüğünde kitinaz ürettiğini ve bu enzimin Verticillium solgunluğunun kontrolünde iyi potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda denediğimiz izolatlar da *V. dahliae*'nin gelişimini önemli ölçüde engellemiştir ve özellikle de SY33.3, U1-6, SY25.1, SY49.1 ve SY65.1B olmak üzere 5 izolatın fungus gelişimini önemli ölçüde engellediği tespit edilmiştir. Patojene karşı en iyi radyal büyüme inhibisyonu *Fusarium*'da olduğu gibi SY33.3 izolatı ile elde edilmiştir.

Hollensteiner et al., [156] domates bitkilerinin kök ile ilişkili topraklarından 267 farklı *Bacillus* suşu izole etmişler fenotipik olarak çeşitlilik gösteren 20 *Bacillus* izolatının *V. dahliae* ve *V. longisporum*'a karşı antifungal aktivitelerini değerlendirilmişler ve çift ekim deneyleri sonucunda tüm *Bt* suşlarının *V. dahliae*'ye karşı *in vitro* antifungal özellik sergilediklerini fakat *V. longisporum*'a karşı bu suşların antogonistik etkilerinin sınırlı olduğunu belirtmişlerdir.

Birçok araştırmacı *A. niger'*e karşı da çeşitli bakteri izolatlarından elde edilen kitinaz enzimlerinin etkilerini araştırmışlardır. Vaidya et al., [138] *Alcaligenes xylosoxydans*'tan saflaştırdıkları kitinaz enziminin, *A. niger*'in spor germinasyonunu ve hifsel gelişimini tamamen engellediğini ve enzimlerin miselleri parçaladığını belirtmişlerdir. Gomaa [157] yaptığı çalışmada *Bt* ve *B. licheniformis*'in kitinazlarının aktivitesini araştırmış ve enzimlerin *A. niger* ve diğer bitki patojeni fungusların hücre duvarını parçaladıklarını belirlemişlerdir. Okay ve ark., [158] ise *Serratia marcescens* MO-1'den elde edilen kitinazın, yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve enzimin *A. niger, Rhizopus oryzae, F. oxysporum, T. harzianum* ve *Alternaria citri* gibi bazı funguslara karşı antifungal etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 9 izolattan 4'ünün *A. niger*'e karşı etkili olduğu belirlenmiş ve fungus gelişimi önemli ölçüde engellediği tespit edilmiştir. Diğer 5 izolatın ise patojene karşı hiçbir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. En büyük radyal büyüme inhibisyonu SY33.3, SY25.1, SY49.1 ve SY65.1B izolatlarında görülmüştür. Yine *A. niger*'e karşı en etkili izolatın SY33.3 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, SY33.3 ve SY65.1B izolatları üç bitki patojeni fungusa karşı yüksek oranda etki göstermiştir. Ayrıca SY33.3 izolatının üç fungus üzerinde standart suşlardan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu izolattan düşük konsantrasyonda enzim elde edilmesine rağmen bu enzimin yüksek oranda antagonistik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun izolatın diğer antifungal aktivite gösteren sekonder bileşiklerin varlığından ve kitinaz ile sinerjistik etkisinden kaynaklanabileceği ve bu sekonder bileşiklerin detaylı bir şekilde araştırılması gerektiği düşünülmüş ve bu izolatın taşımış olduğu *chi* geninin klonlanarak, elde edilen gen ürünlerinden etkili fungisit geliştirme potansiyelinin yüksek olduğu anlaşılmıştır.

4.2. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kitinaz enzimi birçok kaynaktan elde edilebildiği gibi topraktan izole edilen bakterilerde bu enzimi önemli oranda üretebilmektedir. Bu bakımdan bu enzimler birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. *Bt* kitinazları doğada önemli bir role sahip olup farklı çevresel amaçlar için kullanılabilir. Örneğin karides ve yengeç gibi kitin bakımından zengin atıkların parçalanması önemli bir ekolojik kazanç sağlayacaktır. Daha da önemlisi insektisit ve fungusit gibi insan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olan bu kimyasalların kullanımını azaltarak çevre dostu biyo-pestisit geliştirilmesi ve üretilmesi bakımında oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, yerel kaynaklı izolatların kitinaz gen taraması yapılmış ve kitinaz geni taşıyan izolatlar belirlenmiştir. Belirlenen izolatlar içerisinde dünyada ve ülkemizde birçok tarımsal üründe ekonomik kayıplara sebep olan üç önemli bitki patojenine karşı mücadelede kullanılabilecek ve biyolojik mücadele açısından gelecek vaadeden 2 *Bacillus thuringiensis* izolatı (SY33.3 ve SY65.1B) elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışma ülke ekonomisine katkı sağlayacak yerel kaynaklı biyo-pestisit geliştirilmesi ve üretilmesi için ileriki çalışmalara değerli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Strange, R.N., Scott, P.R., 2005. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, **43**: 83-116.
2. Basha, S., Ulaganathan, K., 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. **Current Science**, **82**: 1457-1463.
3. Tombolini, R., Van der Gaag, D. J., Gerhardson, B., Jansson, J. K., 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, **65**: 3674-3680.
4. Theis, T., Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **61**:437-455.
5. Felse, P. A., Panda, T., 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **51**: 141-151.
6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov **(Eylül 2017)**
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Siegel, J. P., 2000. Bacteria. In Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Lacey, L.L. and Kaya, H.K. eds) Dordrecht, Netherlands: Kluwer Scientific Publishers pp. 209–230.
11. Berliner, E., 1911. Ãoeber die schlafsucht der mehlmottenraupe. **Z Gesamte Getreidewes, 3**: 63.
12. Berliner, E., 1915. Uber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n.sp. **Journal of Applied Entomology, 2**: 29.

13. Beegle, C. C., Yamamoto, T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist, 124** (4): 587-616.
14. Mattes, O., 1927. Parasitare krankheiten der mehimottenlarven und versuche uber ihre verwendbarkeit als biologisches bekamfungsmittel. **Ges Nature Marburg Schrift**, 381.
15. Angus, T.A., 1953. Studies of *Bacillus* spp. pathogenic for silkworm. **Canada Department of Science Service**, **9** (6):1-2.
16. Hannay, C. L., Fitz-James, P., 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Journal of Microbiology**, **1**: 694-710.
17. Joung, K. B., Côté, J. C., 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Horticultural Research and Development Centre (Canada) Technical Bulletin** No: 29, 16s.
18. de Barjac, H., 1978. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes; *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. **Compte Rendu Académie Sciences Paris Series D, 286**: 797-800.
19. Roh, J. Y., Choi J. Y., Shun L. M., Rae J. B., Yeon H. J., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for ınsect pest control. **Journal Microbiology Biotechnology**, **17**(4): 547–559.
20. Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J., Mahillon, J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environmental Microbiology, 5**: 631-640.
21. Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews, 53**: 242–255.
22. Ramírez-Lepe, M., Ramírez-Suero, M.,2012. Biological control of mosquito larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis.* Insecticides-Pest Engineering, Edited by Farzana Perveen, Chapter 11, 239-264.
23. Bozlağan, İ., 2007. Kayseri'den Alınan Toprak Örneklerinden Elde Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Bazı Zararlı Böcek Türleri Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri. 53s.
24. Kalaylı, E., Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA'ları. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1** (12): 24-35.

25. Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D. J., Roberts, G. M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H. D., 1997. Natural ısolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against ınsect pests. **Journal of Invertebrate Pathology, 70** (1): 59-68.
26. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. H., 1998. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins, **Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62**: 807-813.
27. Miguel, em J., 2016. Inseticida biológico a base de *Bacillus thuringiensis*.
28. **http://microbe-canvas.com** (Eylül 2017)
29. Lopez-Meza, J.E., Ibarra, J. E.,1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology, 62**: 1306-1310.
30. 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.
31. Yılmaz, S., 2010. Çeşitli habitatlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve bazı zararlı böceklere karşı mücadelede kullanımı. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kayseri, 76 s.
32. Argôlo-Filho, R. C., Loguercio, L. L., 2014. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. **Insects, 5**: 62-91.
33. Mohamed, A. I., Griko, N., Junker, M., Bulla, L. A., 2010. *Bacillus thuringiensis* a genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs, 1** (1): 31-50.
34. George, Z., Crickmore, N., 2012. *Bacillus thuringiensis* applications in agriculture. Sansinenea E., Ed. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, Chapter 2. pp. 19-39. Springer Science Business Media B.V.
35. Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis* biotechnology (pp. 3-18). Dordrecht; Heidelberg; London; New York, NY: Springer.
36. Lambert, B., Peferoen, M., 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience, 42** (2): 112-122.

37. Al-Hinai, M. A., Jones, S. W., Papoutsakisb, E. T., 2015. The clostridium sporulation programs: Diversity and preservation of endospore differentiation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79** (1): 19-37.
38. Grover, M., Naın, L., Saxena, A. K., 2009. Comparision between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic-defective mutants. **World Journal of Microbiology Biotechnology, 25**: 1329-1335.
39. Cawoy, H., Bettıol, W., Fıckers, P., Ongena, M., 2011. Bacillus-based biological control of plant diseases. **Pesticides in the Modern World- Pesticides Use and Management,** 273-302.
40. Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., 1999. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması, 1015-1021. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (Edt: Ş. USTAÇELEBİ). Güneş Kitabevi, Ankara.
41. Madigan, T.M., Martingo, J. M., Parker, J., 1996. Brock biology of microorganisms. **New Jersey: Prentice Hall**, 1-1036.
42. Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Rizza, M. D., 2011. Antıfungal actıvıty of medıcınal plant extracts agaınst phytopathogenıc fungus *Alternaria spp.* **Chılean Journal Of Agrıcultural Research, 71** (2): 231-239.
43. Choi, G. J., Jang, K. S., Kim, J. S, Lee, S.W., Cho, J. Y., Cho, K. Y., Kim, J. C., 2004. In vivo antifungal activities of 57 plant extracts against six plant pathogenic fungi. **Plant Pathology Journal, 3**: 184-191.
44. Pal, G. K., Kumar, B., Shahi, S.K., 2013. Antifungal activity of some common weed extracts against seedborne phytopathogenıc fungı *Alternarıa spp*. **International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences 3** (2): 6-14.
45. Bitki Koruma (Fitopatoloji), 2014. Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü.
46. Dignani, M.C., Anaissie, E., 2004. Human fusariosis. **Clinical Microbiology and İnfection, 10** (1): 67-75.
47. Cuomo, C.A., Guldener, U., Xu, J.R., et al., 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, **Science, 317**: 1400-1402.
48. Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry D.W., Nicholson, P., 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of

tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. **Applied and Environmental Microbiology, 65** (9): 3850-3854.

49. Yörük, E., Albayrak, G., 2014. Tri4 and Tri5 gene expression analysis in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates by Qpcr. **Plant Pathology Journal, 13** (2): 133-138.
50. Grün, C.H., 2003. Structure and biosynthesis of fungal α-glucans, Utrecht University, Netherlands.
51. Schoffelmeer, E.A.M., Klisa, F.M., Sietsmab, J.H., Cornelissen B. J.C., 1999. The cell wall of *Fusarium oxyporum*. **Fungal Genetics and Biology, 27**: 275-282.
52. Goswami, R.S., Kistler, H.C., 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crop. **Molecular Plant Pathology, 5** (6): 515-525.
53. Yörük, E., 2014. *Fusarium* Türlerinde Trikotesen Üretiminin Durdurulması. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 123s.
54. Küçükkaya G., 2012. Bazı Fungusitlerin Domateste Fusarıum Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker)'ne Karşı Etkinliklerinin Araştırılması. Ege üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 85s.
55. Çolak, A., Biçici, M., 2011. Doğu Akdeniz bölgesi örtü altı domates yetiştiriciliğinde *Fusarium oxysporum* spesiyal formlarınının simptomatolojik ayrımı ile solgunluk ve kök- kök boğazı çürüklüğü hastalıklarının çıkış, şiddet ve yaygınlıklarının belirlenmesi. **Bitki Koruma Bülteni, 51** (4): 331-345.
56. Gonsalves, A. K., Ferreira, S. A., 1993. *Fusarium oxysporum*, Crop Knowledge Master.
57. Bitki Hastalıkları Zirai Mücadele Teknik Talimatları Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, TAGEM.
58. Stover, R.H., 1962, Fusarial Wilt (Panama Disease) of bananas and other musa. common wealth mycological institute, Kew, UK.
59. Ploetz, R.C., 2005. Panama disease, an old nemesis rears its ugly head. Part 1: The beginnings of the banana export trades. Online. Plant Health Progress.
60. Pegg, G.F., Brady, B.L., 2002. *Verticillium* wilts. **Plant Sciences, 79**: 80.
61. Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Barbara, D. J., El Mahjoub, M., 2010. Morphological variability within and among *Verticillium* species collected in Tunisia. **Tunisian Journal of Plant Protection, 5**: 19-38.

62. Bolda, M., Koike, S., 2013. Verticillium Wilt in strawberries: California 2013 Update. Strawberries and Canaberries.

63. Blestos, F., Thanassoulopoulus, C., Raupaklas D., 2003. Effect of grafting on growth yield, and verticillium wilt of eggplant. **HortScience, 38** (2): 183- 186.

64. Kwon-Chung, K. J., Benett, J. E.,1992. Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia. Richardson, M. D., Warnock, D. W., 1993, 1997, 2003. Fungal infection: diagnosis and management, Third Edition by Blackwell Publishing Ltd.

65. Kirkpatrick, T.L., Rothrock, C.S., 2001. Compendium of cotton diseases. 2 nd American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

66. Ünal, M., Aydın, G., 1980. *Verticillium* solgunluğuna dayanıklı pamuk ıslahı. Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Yayınları, 27: 23.

67. Korkmaz, H. Y., 2005. Pamuk Solgunluk Hastalığı Etmeni *Verticillium dahliae* kleb. İzolatlarının Morfolojik ve Patolojik Özellikleri ve Bazı Pamuk Çeşitlerinin Hastalığa Tepkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 40 s.

68. Inderbitzin, P., Thomma, B. P. H. J., Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., 2014. *Verticillium alfalfae* and *V. dahliae*, agents of *Verticillium* wilt diseases. **Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens,** 65-97.

69. Harrington, M.A., Dobinson, K.F., 2000. Influences of cropping practices on *Verticillium dahliae* populations in commercial processing tomato fields in Ontario. **Phytopathology, 90**: 1011-1017.

70. Karaca, İ., Karcıoğlu, A., Ceylan, B., 1971. Wilt disease of of cotton in the Ege region of Turkey. **J.Turkish Phytopathy, 1**: 4-11.

71. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., Van Dijck P.W. M., 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology, 59**: 426-435.

72. **https://wiki.bugwood.org/Aspergillus_niger** (Eylül 2017)

73. Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J. and Cabanes, F., 2004. Taxonomy and signifance of black Aspergilli**. Antonie van Leeuwenhoek, 86**: 33-49.

74. Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. Fungi and food spoilage. 3rd edition, Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York.

75. **http://tr.wikipedia.org/wiki/Aspergillus** (Eylül 2017)

76. Azgın, F., 2013. Topraktan İzole Edilen *Bacillus sp*. Suşlarının Antifungal Etkinliklerinin Saptanması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, 90s.

77. Sumner, D. R., 1995. Black Mold. compendium of onion and garlic diseases., Ed: H.F. Schwartz, S.K. Mohan, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 26-27.

78. Gupta, R. P., Srivastava, V.K., Pandey, W. B., 1984. Note on fungi associated with onion seeds, their pathogenicity and control. **Review of Plant Pathology, 65**: 2593.

79. Tanaka, K., 1991. Studies on the black mould disease of onion bulbs caused by *Aspergillus niger* van Tieghem. **Review of Plant Pathology, 70**: 82-99.

80. Hayden, N. J., Maude, R. B., 1992. The role of seed-borne *Aspergillus niger* in transmission of black mould of onion. **Plant Pathology, 41**: 573-581.

81. Srinivasan, R., Shanmugam, V., 2006. Postharvest management of black mould rot of onion. **Indian Phytopathology, 59**: 333-339.

82. Wang, S., Moyne, A., Thottappilly, G., Wu, S., Locy, R. D., Singh, N.K., 2001. Purification and characterization of *Bacillus cereus* exochitinase, **Enzyme and Microbial Technology, 28** (6): 492-498.

83. Stryer, L., 1988. Biochemistry. Third Edition, W.H. Freeman and Company/Newyork.

84. Kuzu, S.B., 2008. Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 93s.

85. Khor, E., 2001. Chitin: Fulfilling a biomaterials promise. Department of Chemistry, National University of Singapore, Republic of Singapore. Elsevier Science, 135s.

86. Jollès, P., Muzzarelli, R. A. A., 1999. Chitin and Chitinases. Birkhäuser Verlag, 7: 340 s.

87. Goosen, M.F.A., 1997. Applications of Chitin and Chitosan. CRC Press, United States of Amerika, New York, 336 s.

88. Özbay, T., 2012. Yumuşakça ve eklem Bacaklıların Atık Kabuklarının Kitin, Kitosan ve Karotenoid İçeriklerinin Karşılaştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Mersin, 118s.

89. Seidl, V., 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiologial functions. **Fungal Biology Reviews, 22**: 36–42.

90. Kumar, R., 2000. A review of chitin and chitosan applications**. Reactive and Functional Polymers, 46**: 1-27.

91. Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science 31**(7): 603-632.

92. Bhattachrya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2007. Bacterial chitinase: Properties and potential. **Critical Review Biotechnology, 27**: 21–28.

93. Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., Javed, S., 2013. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy Bioallied Sciences, 5** (1): 21–29.

94. Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., Yu, Z., Li, L., 2015. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to ımprove chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematicidal activities. **International Journal of Biological Sciences, 11** (3): 304-15.

95. Sahai, A. S., Manocha, M. S., 1993. Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews, 11**: 317–338.

96. Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R.R., Svasti, J., Fothergill-Gilmore, L.A., 2004. An endochitinase a from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 424**: 171-180.

97. Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Tronsmo, A., 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology, 83**: 313–8.

98. Keyhani, N. O., Roseman, S., 1997. Wild-type *Escherichia coli* grows on the chitin disaccharide, N,N-diacetylchitobiose, by expressing the cel operon. **Proceeding of the National Academy of Sciences, 94** (26): 14367-14371.

99. Keyhani, N. O., Wang, L. X., Lee, Y. C., Roseman, S., 2000. The chitin disaccharide, N,N-diacetylchitobiose, is catabolized by *Escherichia coli* and is transported/phosphorylated by the phosphoenolpyruvate: glycose

phosphotransferase system. **The Journal of Biological Chemistry, 275**: 33084–33090.

100.Park, J. K., Keyhani, N. O., Roseman, S., 2000. Chitin catabolism in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. Identification, molecular cloning, and characterization of a N,N-diacetylchitobiose phosphorylase. **Journal of Biological Chemistry**, **275**: 33077–33083.

101. Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., 2003. Characterization of an exo-β-Dglucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **Journal of Bacteriology, 185** (17): 5175-5181.

102. Koga, D., Sasaki, Y., Uchiumi, Y., Hirai, N., Arakane, Y., Nagamatsu, Y., 1997. Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27**: 757–67.

103. Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M., Boot, R. G., 2007. Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. **Genetics, 177**: 959–70.

104. Chou, Y.T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., Presman, E., Lin, L., Aulabaugh, A., Huang, X., 2006. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. **Biochemistry, 45**:4444–54.

105. Shimono, K., Matsuda, H., Kawamukai, M., 2002. Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effectson morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochem, 66** (5):1143–7.

106. Tao, Y., Jin, H., Long, Z. F., Zhang Li, Ding, X. Q., Tao, K., Lıu, S. G., 2006. Cloning and expression of a chitinase gene from *Sanguibacter sp*. C4. **Acta Genetica Sinica, 33** (11): 1037–1046.

107. Watanabe, T., Ito, Y., Yamada, T., Hashimoto, M., Sekine, S., Tanaka, H.,1994. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. **Journal of Bacteriology, 176** (15): 4465-72.

108. Blaak, H., Schrempf, H., 1995. Binding and substrate specificities of a streptomyces olivaceoviridis chitinase in comparison with ıts proteolytically processed form. **The FEBS Journal, 229** (1): 132-139.

109. Tsujibo, H., Orikoshi, H., Tanno, H., Fujimoto, K., Miyamoto K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y., 1993. Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7. **Journal of Bacteriology, 175** (1):176-181.

110. West, P. A., Colwell, R. R., 1984. Identification and classification of Vibrionaceae: An overiew. In: Colweii RR, editor.Vibrios in the environment. New York: John Wiley and Sons, Inc;. pp. 285-363.

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

112. Kalısz, H. M., 1988. Microbial enzymes. Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology, Springer, Berlin Heidelberg, New York, 36: 3-61.

113. 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.

114. 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.

115. 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**: 29–37.

116. Dubourdieu, D., Desplanges, C., Vıllettaz, J. C., Rıbereaugayon, P., 1985. **Carbonhydrate Research, 144** (2): 277.

117. Chet, I., 1993. Biotechnology in plant disease control. Wiley-Liss, New York.

118. Harman, G.E., 2000. The myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderms harzianum* strain T-22**. Plant Disease, 84** (4), 377-393.

119. Casique-Arroyo, G., Bideshi, D., Salcedo-Herna´ndez, R., & Barboza-Corona, J. E., 2007. Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. **Antonie van Leeuwenhoek, 92**: 1–9.

120. Arora N., Ahmad T., Rajagopal R., Bhatnagar R. K., 2003. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 307**: 620–625.

121. Driss F., Kallassy-Awad M., Zouari N., Jaoua S., 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology, 99**: 945–953.

122. Lin Y., Xiong G., 2004. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. **Biotechnology Letters, 26**: 635-639.

123. Okay S., Ozcengiz G., 2011. Molecular cloning, characterization, and homologous expression of an endochitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *morrisoni*. **Turk J Biol, 35**: 1-7.

124. Usharani T. R. Gowda T. K. S., 2011. Cloning of chitinase gene *Bacillus thuringiensis.* **Indian Journal of Biotechnology, 10**: 264-269.

125. Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y., Lı, Y.K., 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry, 35** (3): 213-219.

126. Lab Ref., 2002. A Handbook of Recipes, Reagents, and Other References Tools Use at The Bench, Edited by Rokams, J., Rodgers, L., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

127. Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M. E., Soberón, M., Quintero, R., 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology, 64** (12): 4965-4972.

128. Frankowski, J., Lorıto, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., Bahl, H., 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Archives of Microbiology, 176** (6): 421-426.

129. Srivastava, R. A. K., 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. **Enzyme and Microbial Technology, 9** (12): 749-754.

130. Folders, J., Tommassen, L., Loon, C., Bıtter, W., 2000. Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology, 182** (5): 1257-1263.

131. Muzzarelli, R. A. A., Peter, M. G., 1997. Chitin Handbook. European Chitin Society, Atec, Grottammare, Italy.

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

133. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd edition, CSH. pp. 18-47.

134. Elmahdi, S., Kadir, J., Mohamed, M. T. M., Vadamalai, G., Akter, S., 2015. Isolation, screening and characterization of effective microbes with potential for biological control of fusarium wilt of rock melon. **World Journal of Agricultural Research, 3** (1): 11-16.

135. Saleema, F., Uzma, N., Aisha Y., Jabeenb, F., Qazib, J. I., Khursheedb, N., Munira, N., Naza, S., Shakooric, A. R., 2016. Molecular characterisation of *Bacillus* chitinase for bioconversion of chitin waste. **Natural Product Research, 30** (6): 720-723.

136. Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H., Ferré, J., 2017. Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of Bacillus thuringiensis ısolates from Algeria. **Toxins, 9** (4): 139.

137. Bhushan, B., 2000. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. **Journal of Applied Microbiology, 88** (5): 453-459.

138. Vaidya, R., Roy, S., Macmıl, S., Gandhı, S., Vyas, P., Chhatpar, H. S., 2003. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. **Biotechnology Letters, 25**: 715-717.

139. Yuli, E. P., Suhartono, T., Rukayadı, Y., Hwang, J. K., Pyun, R.Y. 2004. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the ındonesan *Bacillus* sp. 13.26. **Enzyme and Microbial Technology 35**: 147-153.

140. Chanpen, W., Patcharapon, S., Amarat, B., 1999. Purification and characterisation of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. **Current Microbiology, 39** (3): 134-140.

141. Lee Y.S., Park I.H., Yoo J.S., Chung S.Y, Lee Y.C., Cho Y.S., Ahn S.C., Kım C.M., Choı Y.L. 2006. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. **Bioresource Technology, 98** (14): 2734-2741.

142. Kim, H. S., Tımmıs, K. N., Golyshın, P. N., 2007. Characterization of a chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. **Applied Microbioogy Biotechnology, 75** (6): 1275-1283.

143. Younas, A., Saleem, M., Tariq, H., Arooj, B., Akhthar, M. S., Tahira, R., 2016. Purification and biochemical characterization of a pathogenesis related endochitinase *Arachis hypogaea*. **International Journal of Agriculture Biology, 18** (4): 780-788.

144. Zhang, Z., Yuen, G. Y., Sarath, G., Penheiter, A. R., 2000. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Biological Control, 91** (2): 204-211.

145. Sindhu, S. S., Dadarwal, K. R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *cicer* in chickpea. **Microbiological Research**, **156**: 353–358.

146. Kim, K. J., Yang, Y. J., Kim, J. G., 2002. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J**ournal of Biochemistry and Molecular Biology, 36** (2): 185-189.

147. Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., Hui, L., Chun, L., 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. **Chinese Journal of Chemical Engineering, 19** (1): 128-134.

148. Ma, G. Z., Gao, H. L., Zhang, Y. H., Li, S. D., Xie, B. Y., Wu, S. J., 2012. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. **African Journal of Microbiology Research, 6** (20): 4377-4383.

149. Mahmoudi, E., Naderi, D., 2017. Anti-fungal and bio-control properties of chitinolytic bacteria against safflower Fusarium root rot. **Journal of Crop Protection, 6** (2): 225-234.

150. Daulagala, P. W. H. K. P., 2017. Induction and expression of chitinases from four sub species of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Advances in Microbiology, 3** (1): 1-8.

151. Cho, M. J., Kim, Y. K., Ka, J. O., 2004. Molecular differentiation of *Bacillus* spp. antanistic against phytopathogenic fungi causing damping-off disease. **Journal of Microbiology and Biotechnology, 14** (3): 599-606.

152. Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B. I., Aguılar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P. M., Eleazar Barbozacorona, J., 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and ıts potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. **Journal of Food Scıence, 69** (5): M131-M134.

153. Ghasemi, S., Ahmadian, G., Sadeghi, M., Zeigler, D. R., Rahimian, H., Ghandilia, S., Naghibzadeh, N., Dehestani, A., 2011. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2. **Enzyme and Microbial Technology, 48** (3): 225–231.

154. Al Banna, L., Khyami-Horani, H., Sadder, M., Abu Zahra, S., 2016. Afr. Efficacy of some local *Bacillus thuringiensis* isolates against soil borne fungal pathogens. **Journal of Agricultural Research, 11** (19): 1750-1754.

155. Li, J. G., Jiang, Z. Q., Xu, L. P., Sun, F. F., Guo, J. H., 2008. Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. **BioControl, 53** (6): 931–944.

156. Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A. M., Diaz Valerio, S. M., Poehlein, A., Brzuszkiewicz, E. B., Nesemann, K., Braus-Stromeyer, S. A., Braus, G. H., Daniel, R., Liesegang, H., 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* ınhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. **Frontiers in Microbiology, 7**: 2171.

157. Gomaa, E. Z., 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **The Journal of Microbiology, 50** (1): 103-111.

158. Okay, S., Özdal, M., Kurbanoğlu, E. B., 2013. Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. **Turkish Journal of Biology, 37**: 639-644.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	**:**	ZEHRA BÜŞRA AZİZOĞLU
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri	**:**	Kadıköy
Doğum Tarihi	**:**	06.12.1990
Medeni Durumu	**:**	Evli
E-mail	**:**	atczehra58@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

2013- 2017 **Yüksek Lisans Öğrenimi**: Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı, Kayseri

2013- 2016 **Yüksek Lisans Öğrenimi**: Erciyes Üniversitesi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Kayseri

2009-2013 **Lisans Öğrenimi:** Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Lisans Programı, Kayseri,

2004- 2008 **Lise Öğrenimi:** Mustafa Kemal Anadolu Lisesi, İstanbul

2001- 2004 **Ortaokul Öğrenimi:** Mediha Tansel İlköğretim Okulu, İstanbul

1996 - 2001 **İlkokul Öğrenimi:** Emine Koçulu İlkokulu, İstanbul

SCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. Yilmaz S., Azizoglu U., Ayvaz A., Temizgül R., **Atcıyurt Z.B.**, Karaborklu S., 2017. Cloning and Expression of *cry2Aa* from Native *Bacillus thuringiensis* Strain SY49.1 and Its Insecticidal Activity against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Microbial Pathogenesis**, vol.105, pp.81-85.

2. Azizoglu U., Yilmaz S., Ayvaz A., **Atcıyurt Z.B.**, Karaborklu S., 2017. Mosquitocidal Potential of Native *Bacillus thuringiensis* Strain SY49-1 against Disease Vector, *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae). **Tropical Biomedicine**, vol.34, pp.256-262.

HAKEMLİ KONGRE / SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. **Atcıyurt Z.B**., Azizoğlu U., Ayvaz A., Yilmaz S., Karaborklu S., "The Antagonistic Activity of Native *Bacillus thuringiensis* Strains against Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*, Ecology 2017 International Symposium, KAYSERİ, TÜRKİYE, 11-13 Mayıs 2017, pp.336-33
2. Karabörklü S. , Ayvaz A., Yilmaz S., Azizoğlu U., **Atcıyurt Z.B**. "Ecological Importance of Free-Living Soil Nematodes", Ecology 2017 International Symposium, KAYSERİ, TÜRKIYE, 11-13 Mayıs 2017, pp.529-529
3. Yilmaz S., **Atcıyurt Z.B.**, Ayvaz A**.,** Azizoğlu U., Karaborklu S., Temizgül R., et al., "Chitinase gene screening for native *Bacillus* spp., isolates", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.70-70.
4. Ayvaz A., Çömlekci E., Yilmaz S., Azizoğlu U**.**, Ünalmış S., **Atcıyurt Z.B**., et al., "Evaluating molasses broth for producing *Bacillus thuringiensis* strains", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.63-63.
5. Azizoğlu U., Ayvaz A., Yilmaz S., Karaborklu S., Temizgül R., **Atcıyurt Z.B**., et al., "Biocontrol potential of native *Bacillus thuringiensis* strains against *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae)", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.64-64
6. Yilmaz S., Azizoğlu U., Ayvaz A., **Atcıyurt Z.B.**, Çömlekci E., Karabörklü S., Temizgül R., Akbulut M., "Controlling *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepideptera: Pyralidae) With Recombinant Cry1Ab Protein", 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İZMİR, TURKEY, 10-12 September 2014, pp.211-211.
7. Ayvaz A., Azizoğlu U., **Atcıyurt Z.B.**, Çömlekci E., Yilmaz S., Karabörklü S., Akbulut M., Temizgül R., "Cloning And Expression Of Cry2A Gene from *Bacillus thuringiensis* Sy49-1 Strain And Its Toxicity On Culex Pipiens (Diptera) Larvae", 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İZMİR, TURKEY, 10-12 September 2014, pp.209-209.