

138216

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞAL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS THURINGIENSIS*'LERİN
KARAKTERİZASYONU VE İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hatice KATI

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
"Doktor"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26.09.2003
Tezin Savunma Tarihi : 24.10.2003**

138216

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ

Trabzon 2003

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖNSÖZ

“Doğal ortamlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis*’lerin karakterizasyonu ve insektisidal özelliklerinin belirlenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek gerek konunun seçiminde gerekse çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin geliştirilmesinde ve planlanmasında yardımcı olan tez izleme jüri üyelerimden sayın hocam Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve sayın hocam Doç Dr. Saadettin GÜNER’e ve tez süresince bana her konuda destek veren aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonuna (Proje No: 99.111.004.6) teşekkür ediyorum.

Hatice KATI

Trabzon, 2003

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Genel Özellikleri	3
1.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Tarihi	4
1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Plazmitleri	4
1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Ürettiği Bileşikler	5
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması	5
1.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Habitatları	7
1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Yapısı	7
1.7.1. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması	11
1.7.2. İnsektisidal Kristal Proteinin Genetiği	11
1.8. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Mekanizması	12
1.8.1. Böcek Populasyonlarının <i>Bacillus thuringiensis</i> 'e Dirençliliği	13
1.9. <i>Bacillus thuringiensis</i> Suşlarının Biyoteknolojisi	14
1.10. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Yöntemler	18
1.10.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Morfolojik, Boyama ve Biyokimyasal Yöntemler	18
1.10.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Genetik Yöntemler	19
1.10.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri	20
1.11. <i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı	20

1.12.	Tezin Amacı.....	21
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1.	Bakteriler ve Büyüme Şartları	22
2.2.	İzolatların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	22
2.2.1.	Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması	22
2.2.2.	Kristallerin Işık Mikroskobu ile İncelenmesi	23
2.2.3.	Kristallerin Tarama Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi	23
2.2.4.	Kristallerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	23
2.3.	İzolatların Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi	24
2.3.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarından DNA İzolasyonu	24
2.3.2.	İntergenik 16S-23S Ara Bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ISR-PCR) Analizi.....	25
2.3.3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının <i>cry</i> Gen İçeriklerinin Belirlenmesi	25
2.3.4.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarından Plazmit İzolasyonu	27
2.4.	İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	27
2.4.1.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	27
2.4.1.1.	Kristal Proteinlerin Çözünmesi ve Tripsin ile Muamele Edilmesi	28
2.5.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	28
3.	BULGULAR.....	29
3.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Fenotipik Özellikleri	29
3.1.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Kristal Morfolojileri	29
3.1.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının İnsektisidal Özellikleri	37
3.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Moleküler Özellikleri	40
3.2.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatların İntergenik 16S-23S Ara Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (ISR- PCR) Analizi	40
3.2.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının <i>cry</i> Gen İçerikleri	41
3.2.3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Plazmit İçerikleri	43
3.3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri	45
3.3.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Kristal Protein Profilleri	45
3.3.1.1.	Kristal Proteinlerinin Tripsin ile Muamele Edilmesi.....	46
3.4.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarının Antibiyotik Testleri	47
4.	İRDELEME	49
5.	SONUÇLAR.....	54
6.	ÖNERİLER.....	55

7. KAYNAKLAR.....56

EKLER..... 69



ÖZET

Bu araştırmada, 3 tanesi böceklerden [(BnBt (*Balaninus nucum*, ergin), Mm2 (*Melolontha melolontha*, ergin) ve MnÖ (*Malacosoma neustria*, larva)] 6 tanesi ise topraktan [(6 numaralı izolat Çağlayan'dan, 11 numaralı izolat Yeşilova'dan, 27 numaralı izolat Akçaabat'dan, 29 ve 40 numaralı izolatlar Tonya'dan ve 46 numaralı izolat Çaykara'dan)] izole edilen 9 *B. thuringiensis* izolatının fenotipik, moleküler ve kemotaksonomik olarak karakterizasyonu yapıldı.

Işık ve tarama elektron mikroskobu sonuçlarına göre altı izolatta (BnBt, MnÖ, 27, 29, 40, 46) bipiramidal, bir izolatta (6 numaralı) küresel, bir izolatta (Mm2) düz kare ve bir izolatta (11) da şekilsiz kristaller olduğu tespit edildi. ISR-PCR sonuçlarına göre izolatların kontrol *B. thuringiensis* izolatları ile benzer bantlar oluşturduğu görüldü. PCR analizleri sonucunda BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı izolatlarda *cry1* ve *cry2* genleri, Mm2 izolatında *cry3* ve 6 numaralı izolatta ise *cry4* genleri bulundu. SDS-PAGE analizlerinde, izolatlarda yaklaşık 65-130 kDa'lık proteinler belirlendi. Çözünmüş kristallerin tripsin ile parçalanmalarından sonra, SDS-PAGE analizlerinde 50-65 kDa arasında tripsine dirençli peptidler oluşturduğu görüldü. İzolatların plazmit içerikleri, kontrol *Bacillus thuringiensis* suşları ile karşılaştırıldığında 11 numaralı izolat hariç diğerlerinde 4-8 arası plazmit olduğu tespit edildi. BnBt ve MnÖ izolatlarının *Malacosoma neustria* ve *Lymantria dispar* larvalarına ve Mm2 izolatının *Leptinotarsa decemlineata* ve *Agelastica alni* larvalarına karşı insektisidal aktivite gösterdikleri diğer izolatların ise insektisidal aktivite göstermediği tespit edildi.

Sonuç olarak, BnBt ve MnÖ izolatlarının *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye, Mm2 izolatının *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*'e ve 6 numaralı izolatın *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*'e benzedikleri tespit edildi. Diğer izolatların ise yeni *B. thuringiensis* izolatları olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Kristal Proteinleri, *cry* Genleri, Biyolojik Kontrol

SUMMARY

Characterization and Determination of Insecticidal Features of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Natural Environment

In the present study, 3 isolates [(BnBt (*Balaninus nucum*, adult), Mm2 (*Melolonta melolanta*, adult) and MnO (*Malacosoma neustria*, larvae)] obtained from insects and 6 isolates [(isolate 6 from Çağlayan, isolate 11 from Yeşilova, isolate 27 from Akçaabat, isolates 29 and 40 from Tonya and isolate 46 from Çaykara)] obtained from soil samples were characterized based on their phenotypic, molecular and chemotaxonomical features.

According to light and scanning electron microscopy results, six isolates (BnBt, MnÖ, 27, 29, 40 and 46) have bipyramidal, one isolate (6) has spherical, one isolate (Mm2) has flat square, and one isolate (11) has irregular shape crystal. Based on the ISR-PCR results, *B. thuringiensis* isolates formed identical bands with the control *B. thuringiensis* isolates. PCR analyses have shown that BnBt, MnO, 11 and 29 have *cry1* and *cry2* genes. On the other hand, Mm2 and 6 contain *cry3* and *cry4* genes, respectively. SDS-PAGE analyses have shown that isolates contain protein components with molecular masses ranging from 65-130 kDa. After trypsin digestion of solubilized crystals, SDS-PAGE resolved trypsin-resistant peptides ranged between 50 and 65 kDa. The plasmid DNA contents of the isolates were compared with control *B. thuringiensis* strains. Based on these results 4-8 plasmids were detected at all isolates expect 11. Toxicity tests have shown that BnBt and MnO have insecticidal effect against *Malacosoma neustria* and *Lymantria dispar*, isolate Mm2 has been found to be toxic to *Leptinotarsa decemlineata* and *Agelastica alni*. However, no insecticidal activity has been found in the other isolates. ✓

In conclusion, isolates BnBt and MnO are similar to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolates Mm2 and 6 are identical to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, respectively. The other isolates are thought to be new *B. thuringiensis* isolates.

Key Words: *Bacillus thuringiensis*, Crystal Proteins, *cry* Genes, Biological Control

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	<i>B. thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskopik görünümü	3
Şekil 2.	<i>B. thuringiensis</i> suşlarına ait Cry proteinlerinin yapısı.....	8
Şekil 3.	<i>B. thuringiensis</i> 'in hedef böceklerdeki mekanizması	13
Şekil 4.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarının kristal morfolojilerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	30
Şekil 5.	BnBt izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	32
Şekil 6.	MnÖ izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	33
Şekil 7.	Mm2 izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	33
Şekil 8.	6 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	34
Şekil 9.	11 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	34
Şekil 10.	27 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	35
Şekil 11.	29 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	35
Şekil 12.	40 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	36
Şekil 13.	46 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....	36
Şekil 14.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarının ISR-PCR analizleri.....	41
Şekil 15.	Topraktan izole edilen <i>B. thuringiensis</i> 'lerin cry gen PCR ürünleri	42
Şekil 16.	Böcekten izole edilen <i>B. thuringiensis</i> 'lerin cry gen PCR ürünleri.....	43
Şekil 17.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarının plazmit içerikleri	44
Şekil 18.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarının spor-kristal karışımlarının protein profilleri.....	45
Şekil 19.	Böceklerden izole edilen <i>B. thuringiensis</i> izolatlarına ait çözünmüş kristallerin tripsin ile proteolizi.....	46
Şekil 20.	Topraktan izole edilen <i>B. thuringiensis</i> izolatlarına ait çözünmüş kristallerin tripsin ile proteolizi.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Mevcut <i>B. thuringiensis</i> 'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması	6
Tablo 2.	Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları	9
Tablo 3.	Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler ...	14
Tablo 4.	Dipteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler.....	16
Tablo 5.	Coleopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler	16
Tablo 6.	Genel primerler ile tespit edilen <i>cry</i> genleri ve ürün büyüklükleri	26
Tablo 7.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarının oluşturduğu kristallerinin büyüklükleri	32
Tablo 8.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) <i>Malacosoma neustria</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri	37
Tablo 9.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) <i>Lymantria dispar</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri	38
Tablo 10.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) <i>Hyphantria cunea</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri	38
Tablo 11.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkiler	39
Tablo 12.	<i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) <i>Agelastica alni</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri	40
Tablo 13.	<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının antibiyotik test sonuçları.....	48
Tablo 14.	Çalışmada kullanılan <i>B. thuringiensis</i> izolatları ile kontrol <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının karşılaştırılması	53
Ek Tablo 1.	<i>B. thuringiensis</i> suşlarının kristal proteinleri	69

SEMBOLLER DİZİNİ

Cry	: Kristal
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ICP	: İnsektisidal Kristal Protein
ISR-PCR	: İntergenik 16S-23S Ara Bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	: Luria Bertani
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünyada tanımı yapılan hayvan türlerinin %97'sini böcekler oluşturmaktadır. Doğada yaşayan böceklerin %99,5'inin doğa ve insana faydalı olduğu bilinmektedir. Bilinen yaklaşık 1 milyon 300 bin böcek türünün, sadece %0,5'i doğa ve insana zarar vermektedir (Serez, 2003).

Böceklerin doğaya ve insanlara çok çeşitli faydaları vardır. Şöyleki, böcekler doğal ortamda polen taşınımına yardımcı olarak tozlaşmayı gerçekleştirirler. Böylece çiçekli bitkilerde meyve ve tohum oluşumunu sağlarlar. Doğada ölmüş ya da ölmekte olan organizmaları ve organik maddeleri kısa sürede ayrıştırarak, doğanın temizlenmesini ve toprağın daha verimli olmasını sağlarlar. Her bir böcek türü, doğada doğal denge ve besin zinciri içinde yerlerini alırlar. Böceklerin en önemli faydaları ise bazı türlerin, ürünlerini (Örneğin; bal, ipek gibi) insanlara doğrudan sunmalarıdır. (Serez, 2003).

Zararlı böcek türleri de bulunmaktadır. Özellikle ürün kayıplarına sebep olarak, insan ve hayvan sağlığı yönünden tehlike oluşturmaktadırlar. Dünyada üretilen meyve, sebze, tahıl, yaş veya kuru her türlü gıda maddelerinin, sanayi hammaddelerinin ve depolanmış ürünler, kürk, deri ve kumaş gibi maddelerin her yıl yaklaşık olarak %15-20'si böcekler tarafından zarar görmekte ve kullanılamaz hale gelmektedirler. Bu zararlar da yılda yaklaşık olarak 7-10 milyar dolar civarındadır. Ayrıca böcekler, virüs, bakteri ve mantar hastalıklarının sebep olduğu tifo, veba, sıtma gibi hastalıkları da yayabilmektedirler. Ancak bunlar mevcut böceklerin %0,5'ini oluşturmaktadır (Serez, 2003).

Zararlı böceklerin meydana getirdiği ürün kayıplarını önlemek için kullanılan kimyasal ilaçların insan sağlığına olumsuz etkisi vardır. İlaç üretiminde çalışan, ilaç uygulaması yapan ve uygulamanın yapıldığı alanda çalışan işçiden başlayıp ilaçlı ürünü yiyen kişiye hatta doğacak çocuğa kadar zararlı etki söz konusu olabilmektedir. Ayrıca, hedef dışı canlılara etkisi sonucu doğal dengenin bozulması, hava, toprak ve su kirliliğinin oluşması da sorunun önemli bir boyutunu oluşturmaktadır. Zararlı populasyonları dengede tutan doğal düşman populasyonları da tarım ilaçlarından etkilenmekte ve doğal düşmanı olmayan zararlılar problem haline gelmektedir. Kimyasal ilaçların tarım zararlılarına karşı

çoğu kez aşırı ve bilinçsiz kullanımları, bunların kimyasallara karşı dayanıklılık kazanmalarına sebep olmaktadır. Bu durumun sonucunda doğal düşman populasyonları azalmakta ya da yok olmaktadır. Böylece biyolojik denge bozulurken, diğer taraftan da insan ve hayvan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir.

Zararlılarla mücadele yöntemlerinde kimyasal mücadeleye alternatif bir yöntem olarak biyolojik mücadele yöntemi görülmektedir. Biyolojik mücadele; zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını kullanma olarak tanımlanabilir. Bu mücadelede kullanılacak organizmaların bazıları doğadan toplanarak zararlı türün bulunduğu ortama nakledilir. Bazıları ise yetiştirme laboratuvarlarında çoğaltılarak belirli zamanlarda zararlıların bulunduğu yerlere bırakılır.

Biyolojik mücadelede önemli rol oynayan ajanlar arasında virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoonlar, nematodlar, akarlar ve örümcekler bulunmaktadır. Bunların dışında böcek sınıfında yer alan 15 takımın içindeki 200'den fazla familyaya ait binlerce avcı ve parazit böcekler sayılabilir.

Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklerle karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. Spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Böceklerle önemli zararlar veren bakteriler, daha çok spor meydana getiren gruptandır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Buna rağmen spor oluşturmayan bakteriler olağanüstü şartlar karşısında oldukça dayanıksız ve hassas yapıdadırlar. Buna göre, böceklerle karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

Son yıllarda patojenik potansiyeli hayli yüksek bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde durulmaktadır. Bu bakterinin biyolojik mücadelede, diğer birçok bakteriye nazaran daha ümit verici olduğu ifade edilmektedir. *B. thuringiensis*'in çok sayıda varyetesi vardır. Bunlar başta Lepidoptera olmak üzere Diptera ve Coleoptera türlerine karşı da kullanılmaktadır. Bu bakterinin spor ve kristalleri piyasaya toz, ıslanabilir toz veya sulu karışım halinde sunulmaktadır. *B. thuringiensis*'den hazırlanan karışımların uygulandığı böcekler, bu karışımların ihtiva ettiği bir toksin sebebiyle ölürlür.

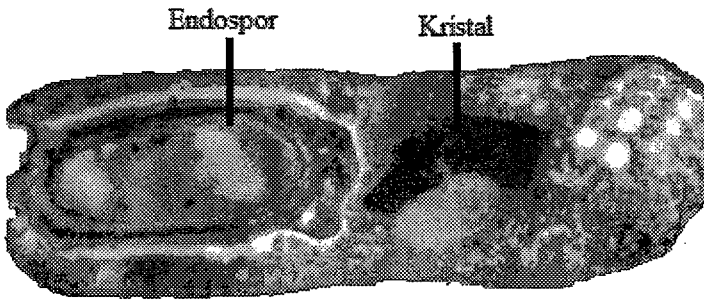
B. thuringiensis bir toprak bakterisidir. Buna rağmen hastalıklı ve sağlıklı böceklerden, bitkilerin yaprak yüzeylerinden ve depolanmış ürünlerden de izole edilmiştir (Carozzi vd., 1991; Burges ve Hurst, 1977; Kaelin vd., 1994).

1.2. *Bacillus thuringiensis*'lerin Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis Bacillaceae familyası içerisinde yer almaktadır. Bacillaceae familyasının üyeleri endospor üreten Gram-olumlu hareketli ya da hareketsiz çubuk şekilli bakterilerdir. Bu familyanın iki önemli cinsi vardır: *Bacillus* ve *Clostridium*. Bu türler birbirlerinden çoğunlukla oksijen ihtiyaçlarına göre ayrılırlar. *Bacillus* cinsine ait türler aerobik, *Clostridium* cinsine ait türler ise anaerobiktirler. Her iki cins de zincirler oluşturan çubuk şekilli hücrelere sahiptir (Tanada ve Kaya, 1993).

B. thuringiensis, *Bacillus* cinsi içinde *B. cereus* grubu içerisinde yer almaktadır. Bu grup altı türden oluşmaktadır. Bunlar; *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* (Turnbull vd., 1990), *B. pseudomycoides* (Nakamura, 1998) ve *B. weihenstephanensis* (Lechner vd., 1998) bakterileridir.

B. thuringiensis Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin üreten, spor oluşturan, Gram-olumlu ve aerobik bir toprak bakterisidir (Beegle ve Yamamoto, 1992) (Şekil 1). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga böcek grupları üzerinde ve ayrıca nematodlar, keneler ve protozoalar üzerinde de aktivite tespit edilmiştir (Feitelson, 1993; Feitelson vd., 1992).



Şekil 1. *B. thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskopik görünümü (Waheed ve Kogan, 2003).

1.2.1. *Bacillus thuringiensis*'lerin Tarihi

B. thuringiensis ilk kez 1901 yılında Japon bakterioloğu Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Aoki ve Chigasaki (1915) adlı araştırmacılar bakteriyi tanımlamışlardır. Spor bulunan hücrelerde inklüzyon yapılarının varlığını Berliner (1911; 1915) ve Mattes (1927) rapor etmişlerdir. Hannay (1953) *B. thuringiensis*'in spor morfolojisini ve parasporal yapı olarak adlandırılan inklüzyon yapılarını açıkladı. Ayrıca parasporal yapının böcek toksitesi ile ilgili olduğunu gösterdi. Angus (1954), ipek böceği larvalarının orta bağırsaklarında *B. thuringiensis*'in spor oluşmuş hücrelerinde toksik bir maddenin oluştuğunu buldu. Daha sonra aynı araştırmacı (Angus, 1956) toksik maddenin parasporal yapı içinde olduğunu keşfetti. Hannay (1955) adlı araştırmacı bu yapının protein yapıda olduğunu belirledi.

1.3. *Bacillus thuringiensis*'lerin Plazmitleri

B. thuringiensis suşları yaklaşık 2,4 ile 5,7 milyon baz çifti uzunluğunda bir genoma sahiptirler (Carlson, 1994). *B. thuringiensis* 2 ile 11 tane plazmit içermektedir (Gonzalez, 1981). Bu plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişmektedir (Lereclus, 1993). Insektisidal proteini kodlayan genler plazmitler üzerinde yer almaktadır (Carlton, 1988). Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölgeler bulunmaktadır (Mahillon vd., 1994). Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'den diğerine kendiliğinden transfer yeteneğine sahiptir.

İncelenen bütün *B. thuringiensis* türlerinde plazmit bulunmaktadır. Ancak Lecadet ve arkadaşları (1981) *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*'da plazmit tespit edememişlerdir. Bu araştırmacılar plazmiti tespit edememelerinin sebebini kullandıkları yöntemler yüzünden olduğunu rapor etmişlerdir. *B. thuringiensis* subsp. *finitimus*'un diğer suşlarında plazmitlerin varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Faust, 1979).

B. thuringiensis suşlarından moleküler ağırlığı büyük olan plazmitleri izole etmedeki başarısızlığın kullandıkları yöntemlerin yetersizliği yüzünden olduğu düşünülmektedir. Büyük moleküler ağırlıklı plazmit DNA'sı izole etmek için tasarlanan çoğu yöntem *B. thuringiensis*'de çalışmamaktadır (Gonzales, 1981).

1.4. *Bacillus thuringiensis*'lerin Ürettiği Bileşikler

Ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis* ürünleri çevreye ve insanlara zararlı olan bileşikler içermezler. *B. thuringiensis* suşları Cry ve Cyt proteinlerinin dışında vejetatif büyüme süresince β -ekzotoksin, fosfolipazlar, proteazlar, kitinazlar, vejetatif insektisidal proteinler (VIP) ve antifungal bileşikler oluştururlar (Porcar ve Juarez-Perez, 2003). VIP'lerin sınıflandırılması, kristalleri oluşturan proteinlerle ilişkileri olmadığından farklıdır (Schnepf, 1998).

1.5. *Bacillus thuringiensis*'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

B. thuringiensis'in ayırt edilmesinde konak seçiciliği, alt türleri belirleyen H-serovarları ve *cry* genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda alt türleri karakterize etmek için DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaktadır (Hansen vd., 1998).

Kullanılan fenotipik yöntemlerden birisi olan H-serotiplenme, *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında önemli bir yöntemdir. Bu yöntem de Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından geliştirilmiş ve o zamandan beri kullanılmaktadır (de Barjac ve Frachon 1990).

Serotip ile sınıflandırma morfolojik ve biyokimyasal kriterler ile desteklenmektedir (de Barjac, 1981). 1977 yılına kadar, sadece 13 *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır ve bunların da Lepidopter larvalarına karşı toksik olduğu bulunmuştur. Daha sonra Dipteralara (Goldberg ve Margalit, 1977), Coleopteralara (Krieg vd., 1983) ve nematodlara (Narva vd., 1991) karşı toksik olan diğer alttürlerin keşfi *B. thuringiensis* alttürlerinin sayısını artırmıştır. 1998 verilerine göre flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 67 den fazla *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır (Tablo 1). Serovarların mevcut listesi Paris'deki Pasteur Enstitüsü'nden elde edilebilmektedir (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, France).

Tablo 1. Mevcut *B. thuringiensis*'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması

Flagella antijenleri	<i>B.thuringiensis</i> subsp.	Flagella antijenleri	<i>B.thuringiensis</i> subsp.
1	<i>thuringiensis</i>	28a, 28c	<i>jegathesan</i>
2	<i>finitimus</i>	29	<i>amagiensis</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	30	<i>medellin</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	31	<i>toguchini</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	32	<i>cameroun</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	33	<i>leesis</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	34	<i>konkukian</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	35	<i>seoulensis</i>
5a, 5c	<i>galleriae</i>	36	<i>malaysiensis</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	37	<i>anadalousiensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>
7	<i>aizawai</i>	39	<i>brasiliensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	40	<i>huazhongensis</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	41	<i>sooncheon</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	42	<i>jinghongiensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	43	<i>guiyanguebsus</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	44	<i>higo</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	45	<i>roskildiensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	46	<i>chanpaisis</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
12	<i>thompsoni</i>	48	<i>balearica</i>
13	<i>pakistani</i>	49	<i>muju</i>
14	<i>israelensis</i>	50	<i>navarrensis</i>
15	<i>dakota</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
16	<i>indiana</i>	52	<i>kim</i>
17	<i>tohokuensis</i>	53	<i>asturiensis</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
18a, 18c	<i>yosoo</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
19	<i>tochigiensis</i>	56	<i>rongseni</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	58	<i>argentinensis</i>
21	<i>colmeri</i>	59	<i>iberica</i>
22	<i>shandongiensis</i>	60	<i>pingluonsis</i>
23	<i>japonensis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	62	<i>zhadongensis</i>
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	63	<i>bolivia</i>
25	<i>coreanensis</i>	64	<i>azorensis</i>
26	<i>silo</i>	65	<i>pulsiensis</i>
27	<i>mexicanensis</i>	66	<i>gracioensis</i>
28a, 28b	<i>monterrey</i>	67	<i>vazensis</i>

1.6. *Bacillus thuringiensis*'lerin Habitatları

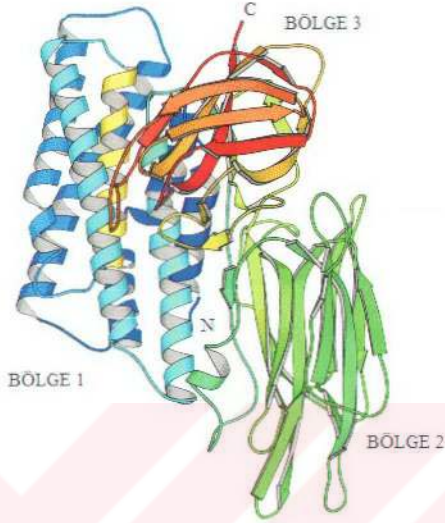
B. thuringiensis suşları genellikle topraktan (Carozzi vd., 1991; DeLucca vd., 1979; Hastowo vd., 1992; Martin ve Travers, 1989; Smith ve Couche, 1991), böceklerden (Carozzi vd., 1991), depolanmış ürünlerden (Burges ve Hurst, 1977; Chaufaux vd., 1997; DeLucca vd., 1984; Meadows vd., 1992) ve kozalaklı ağaçların yapraklarından (Kaelin vd., 1994; Smith ve Couche, 1991) izole edilmiştir.

Çok sayıdaki *B. thuringiensis* ölü böceklerden izole edilmiştir ve çoğu durumlarda izolat izole edildiği böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir (Goldberg ve Margalit, 1977; de Barjac, 1981; Hansen vd., 1996). Bu organizmalar Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarında dar bir konak hassasiyetine sahiptirler ve konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar. Enfekte olan böcek larvası öldüğünde, ölü böcek vücutları kristal ve spor içerirler (Prasertphon vd., 1973; Grassi ve Deseö, 1984; Aly, 1985; Aly vd., 1985).

B. thuringiensis sporları toprakta bulunabilmektedir. Bu bakterilerde vejetatif büyüme, besinleri kullanabildiğinde meydana gelir (DeLucca vd., 1981; Akiba, 1986; Ohba ve Aizawa, 1986; Travers vd., 1987; Martin ve Travers, 1989). Meadows (1993) adlı araştırmacı 1115 toprak numunesinden 785 *B. thuringiensis* izole etmiştir. Aynı zamanda, Asya ve Güney Afrika'daki numunelerin %94'ünde, Yeni Zelanda'da %56 oranlarında *B. thuringiensis* bulunduğunu rapor etmiştir. Japonya'da yapılan bir araştırmada 186 toprak numunesinde 136 tane *B. thuringiensis* izole edilmiştir (Ohba ve Aizawa, 1986).

1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Yapısı

B. thuringiensis subsp. *tenebrionis*'in δ -endotoksininin aktif kısmının kristal yapısı X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (Li vd., 1991). Aktif toksin üç ayrı etkin bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2) (Höfte ve Whiteley, 1989; Li vd., 1991; Grochulski vd., 1995). Bölge I, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumludur. Bölge II'nin böcek bağırsağındaki epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanma ile ilgili görevi vardır (Li vd., 1991). Bölge III'ün fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Ancak bir görüşe göre Cry toksinin bağırsak proteazları tarafından parçalanmasını önler (Li vd., 1991), bir görüşe göre de iyon kanallarının oluşumundan, reseptör bağlanmasından ve böcek özgünlüğünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Rajamohan vd., 1998).



Şekil 2. *B. thuringiensis* suşlarına ait Cry proteinlerinin yapısı (URL-1, 2002).

δ -endotoksinler, aktivitelerine bakılarak beş önemli sınıfa ayrılırlar.

1. Lepidopteralara özgün,
2. Lepidoptera ve Coleopteralara özgün,
3. Coleopteralara özgün,
4. Dipteralara özgün,
5. Nematodlara özgün (Cannon, 1996).

Kristal (Cry) proteinleri kodlayan genler birkaç sınıf ve alt sınıflardan oluşmaktadır (Cannon, 1996). Adang ve arkadaşları (1993) 60 dan fazla *cry* geni (26 farklı ICP'leri kodlayan *cry* genleri) nükleotit dizinini belirlediler. Baum ve Malvar (1995) adlı araştırmacılar ise 90 dan fazla ICP genlerinin nükleotit dizinini belirlediler ve klonladılar. Thompson ve arkadaşları (1995) yaptıkları bir çalışmada 50 toksinin yapılan ilk dizilerini karşılaştırdı ve bilgisayar ortamında evrimsel ilişkilerini gösteren bir dendrogramını oluşturdular.

Protoksinlerin; multijenik yapısı, moleküler büyüklüğü ve konak özgünlüğü Tablo 2’de görülmektedir. Sınıf 1’in *cry* genleri kristal inklüzyon içinde C-ucu ve N-ucunda korunan ve gömülü olarak bulunan aktif toksin ile 130-160 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlar (Höfte ve Whiteley, 1989). Cry1A(a), 1A(b) ve 1A(c) proteinler, %80’den daha fazla birbirlerine benzemektedirler (Höfte ve Whiteley, 1989). Cry1B ve Cry1C protoksinler sırasıyla %58 ve %67 Cry1A(a) protoksinine benzerdir (Höfte ve Whiteley, 1989).

Tablo 2. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları

Gen	Alt Sınıf	Etkilediği Böcek Grupları	Protoksin (kDa)	Toksin (kDa)
<i>cry1</i>	1A(a)	Lepidoptera	130–160	60
	1A(b)	Lepidoptera/Diptera	130–160	60
	1A(c)	Lepidoptera	130–160	60
	1B	Lepidoptera	130–160	60
	1C	Lepidoptera	130–160	60
	1D	Lepidoptera	130–160	60
	1E	Lepidoptera	130–160	60
	1F	Lepidoptera	130–160	60
<i>cry2</i>	2A	Lepidoptera/Diptera	70–71	65
	2B	Lepidoptera	70–71	65
	2C	Lepidoptera	70–71	65
<i>cry3</i>	3A	Coleoptera	73	55
	3B	Coleoptera	73	55
	3C	Coleoptera	73	55
	3D	Coleoptera	73	55
<i>cry4</i>	4A	Diptera	134	46–48
	4B	Sivrisinek	128	46–48
	4C	Karasinek	58	?
	4D	Nematot	72	30
	CytA		27	?
<i>cry5</i>	5	Lepidoptera	81.2	?
		Coleoptera		

Sınıf 2’nin genleri 65 kDa’lık toksinlere dönüşebilen 70-71 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlarlar. Cry2A Lepidoptera ve Diptera larvalarına toksiktir, Cry2B ise sadece Lepidoptera larvalarına toksiktir (Wider vd., 1990). Bu iki toksin %87 oranında birbirine benzerdir (Aronson, 1993).

B. thuringiensis subsp. *tenebrionis* ve Coleopteraya aktif diğerk suşlarda oluşank *cry3* genleri Cry3 A, B, C, D, ve E toksinlerini oluştururlar (Sekar ve Carlton, 1985; Hernstadt vd., 1987; Hernstadt vd., 1986). *cry3* genleri yaklaşık 73 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlamaktadırlar. Bu protoksinler proteolitik parçalanmada ilk olarak 67 kDa'ya dönüşürler. Daha sonra larvanın bağırsağında 55 kDa'lık toksini oluştururlar (Carroll vd., 1989). Cry3A ve Cry3B proteinleri %75 oranında benzerdirler (Donovan vd., 1992). Cry3D proteini %74 Cry3A'ya, %61 Cry3B, ve %33 Cry3C proteinlerine benzerdir (Lambert vd., 1992).

cry4 (A, B, C, D) ve *cytA* genleri 20-140 kDa proteinleri kodlarlar. Bu genlere sahip olan *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* kristalleri en az dört polipeptidi oluşturur. Bunların moleküler ağırlıkları 27 kDa (CytA), 58 kDa (Cry4C), 70 kDa (Cry4D), 128 kDa (Cry4B) ve 134 kDa (Cry4A)'dır (Höfte ve Whiteley, 1989; Hurley vd., 1985; Lee vd., 1985). CytA, ve 4D ve 4B proteinleri arasında sinergistik ilişki vardır. Cry4A, Cry4B ile %54 ve Cry4C ile %29 oranlarında, Cry4B ve Cry4C ise %29 oranında birbirine benzerdir. *cry3* ve *cry4* genlerinin, *cry1A* genleri ile sadece %20 oranında benzerlikleri vardır (Höfte ve Whiteley, 1989).

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* DSIR 732 tarafından üretilen 81,2 kDa'lık Cry5 protoksini hem Coleoptera (*Leptinotarsa decemlineata*) hem de Lepidoptera (*Ostrinia nubilalis*) türlerine karşı aktiftir, fakat Lepidoptera larvalarına karşı daha çok aktif olduğu bildirilmiştir (Tailor vd., 1992).

Sınıf 1 ile 5 toksinleri inaktif protoksin olarak oluşurlar ve toksinler proteolitik olarak aktif edilirler. Farklı büyüklükte amino asit dizilerine sahip olan bu proteinlerin yaygın proteaz işleyiş bölgelerini oluşturmak için nasıl katlandığı bilinmemektedir. Toksinin proteaz aktivasyonunda glikolizasyonun nasıl bir rolü olduğu araştırılmaktadır. Aktivasyon işleminde kullanılan enzimler pepsinojen ve tripsinojen gibi memeli bağırsak proteazlarına benzemektedir. Ancak, protoksin aktivasyonu durumunda, büyük ölçüde C-uç işlemini içerir ve aktivasyon süresince toksin kısmında iç kesilmeler meydana gelmez. Aktivasyon süresince meydana gelen şekilsel değişiklikler proteinin tersiyer yapısını etkilerken sekonder yapısını etkilemediği görülmüştür. Fakat bunun nasıl olduğu bilinmemektedir.

1.7.1. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması

Kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal protein (ICP)'leri kodlamaktadırlar. Bu kristal genleri Lepidoptera (*cry1*), Diptera ve Lepidoptera (*cry2*), Coleoptera (*cry3*), Diptera (*cry4*), veya Coleoptera ve Lepidoptera (*cry5*) (Höfte ve Whiteley, 1989) böceklerine karşı etkilidir. Aynı bir sınıflandırma, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ICP'de ve bazı diğer *B. thuringiensis* alttürlerinde bulunan özgün olmayan sitolitik bir faktörü kodlayan sitolitik (*cyt*) genler için kullanılmaktadır. Ancak, karakterize edilen ICP genlerinin sayısının artması ve insektisidal spektruma dayandırılan mevcut *cry* gen terminolojisindeki uyuşmazlıklar yüzünden Crickmore ve arkadaşları (1998) ICP gen dizilerine bakarak yeni bir sınıflandırma yaptılar (Ek Tablo 1). Bu sınıflandırmada mevcut Romen rakamları yerine Arabik rakamları kullanıldı.

1.7.2. İnsektisidal Kristal Proteinin Genetiği

1980'li yılların başında, ICP'leri kodlayan çoğu genlerin büyük taşınabilir plazmitler (bu plazmitlerin çoğu konjugasyon ile suşlar arasında kolayca değişebilen plazmitlerdir) üzerinde bulunduğu tespit edildi (González ve Carlton, 1980; González vd., 1981). Bu ilk çalışmalardan sonra pek çok ICP geni klonlandı, dizileri belirlendi ve yeni insektisidal spektrumlu *B. thuringiensis* suşları yapmak için kullanıldı (Höfte ve Whiteley, 1989).

ICP gen dizileri, *B. thuringiensis* izolatlarından elde edilen ICP'leri karakterize etmek için PCR ve hibridizasyonda kullanılmak üzere gene özgün problemlerin yapısı için temel oluşturmaktadır (Prefontaine vd., 1987; Juarez-Perez vd., 1997; Bravo vd., 1998; Shevelev vd., 1998). Bu çalışmalar dizi homolojisi ve proteinlerin toksite spektrumuna bakılarak ICP genlerinin alt sınıflarına ayrılmasını sağlamaktadır.

ICP moleküllerinin her biri reseptör tanımından sorumlu olan değişken bir C-uç bölgesine ve delik oluşumunu teşvik eden korunmuş bir N-uç bölgesine sahiptir (Li vd., 1991).

Doğal olarak meydana gelen çoğu *B. thuringiensis* suşları tek grup böceklerle karşı aktif ICP'ler içerir. Ancak, *B. thuringiensis* suşları ya da ilişkide olduğu diğer türler arasında konjugatif transfer meydana gelir, sonuçta çeşitli plazmit içerikli yeni suşlar oluşur. Bu yüzden *cry* genlerinin hareketliliği ve plazmitlerin değiş tokuşu *B. thuringiensis*

de incelenen farklı ve kompleks aktivite spektrumu ile açıklanabilir (González ve Carlton, 1980; González vd., 1981; González vd., 1982; Reddy vd., 1987; Jarrett ve Stephenson, 1990). İki böcek grubuna karşı toksik olan yeni *B. thuringiensis* suşları konjugasyon ile geliştirilmektedir.

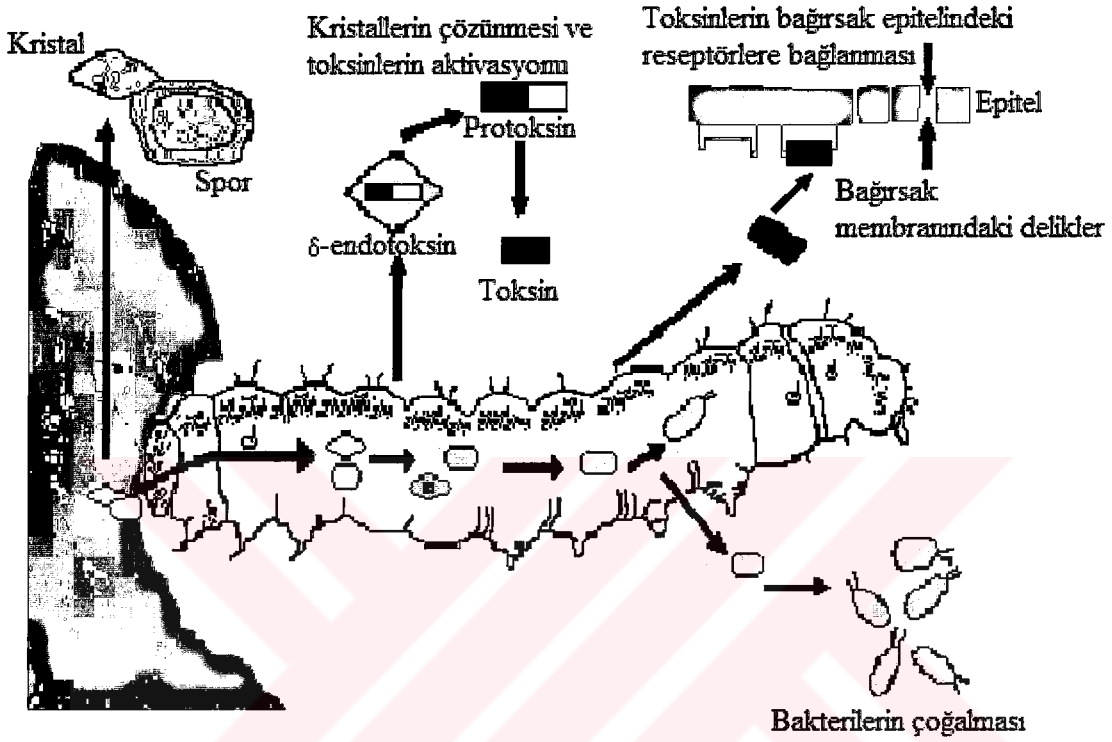
1.8. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Mekanizması

B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklerle karşı *cry* genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde. ICP'nin etkili olabilmesi için sindirilmesi gerekmektedir (Visser vd., 1993). Diğer böcek gruplarına (Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Mallophaga), nematodlara (Strongylida, Tylenchida), kenelere (Acari), yassı kurtlara (Digenea) ve protozoalara (Diplomonadida) karşı aktivite de bulundukları tespit edilmiştir (Feitelson, 1993; Zukowski, 1995).

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden bulunurlar, bu yüzden insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşımaları kristal proteinlerine yoğun bir insektisit özelliği kazandırmaktadır. δ -endotoksinler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu semptomlar; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).

B. thuringiensis'in hedef böcek üzerindeki mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından özetlenmiştir: 1) spor ve ICP oluşturmuş *B. thuringiensis*'in larva tarafından sindirilmesi; 2) orta bağırsakta kristal şeklindeki ICP'nin çözünmesi; 3) proteazlar ile ICP'nin aktifleştirilmesi; 4) orta bağırsak hücre membranındaki özgün reseptörlere aktif ICP'nin bağlanması; 5) hücre membranına toksinin eklenmesi ve bağırsak hücre membranında kanallar ve deliklerin oluşumu, ve bunun sonucunda da epitel hücrelerinin parçalanması (Cooksey, 1971; Norris, 1971; Fast, 1981; Huber ve Lüthy,

1981; Lüthy ve Ebersold, 1981; Smedley ve Ellar, 1996); 6) larvada fazla miktarda *B. thuringiensis*'in çoğalması ve oluşan kan zehirlenmesinin ölümü artırması (Şekil 3).



Şekil 3. *Bacillus thuringiensis*'in hedef böceklerdeki mekanizması (URL-2, 2002).

Özgün reseptörlere ICP'lerin bağlanmasının insektisidal spektrum ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (Denolf vd., 1997). Van Rie ve arkadaşları (1989), tütün kurdu (*Heliothis virescens*) ve domates kurtlarının (*Manduca sexta*) fırça şeklindeki membran vesiküllerine bağlandıklarını göstermişlerdir. Fakat bağlanma yerlerinin sayısı farklıdır ve değişik biyolojik aktivite gösterir. Bağlanma yerleri için bütün böceklerde toksin ilgisi aynı değildir.

1.8.1. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis*'e Dirençliliği

Laboratuar şartlarında farklı böcek türlerinde *B. thuringiensis*'e karşı dirençlilik tespit edilmiştir (Schnepf vd., 1998). Dirençlilik tespit edilen böcek türleri *Plodia interpunctella*, *Cadra cautella*, *Leptonatarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*,

Trichoplusia ni, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* ve *Culex quinquefasciatus* türleridir (Schnepf vd., 1998). Direnç oluşturan *B. thuringiensis* suşları; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer *B. thuringiensis* alt türleridir.

Bir çeşit güve olan *Plutella xylostella*'nın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*'ya karşı direnç geliştirdiği Hawaii, Filipinler, Endonezya, Malezya, Orta Amerika ve bazı Amerika şehirlerinde görülmüştür (Schnepf vd., 1998). *B. thuringiensis*'de dirençlilik ile ilgili yaygın görüş, zararlıyı kontrol etmek için *B. thuringiensis* ve *B. thuringiensis* toksin genlerini kullanma ile başarılabilmektedir. *B. thuringiensis*'lerin direnç mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir.

1.9. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Biyoteknolojisi

B. thuringiensis suşları zararlı kontrol ajanı olarak günümüzde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* ürünleri biyopestisit pazarının %95'ini oluşturmaktadır. Bu ürünlerin çoğu 33 yıl önce izole edilen *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 izolat orijinelidir (Dulmage, 1970). *B. thuringiensis*'in oluşturduğu β -ekzotoksin ve δ -endotoksinler tarım zararlılarına karşı kullanılmaktadır. En fazla kullanılan δ -endotoksin; Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gruplarındaki larvalara karşı etkili olmaktadır. Tarım zararlılarına karşı kullanılan *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer suşlarından elde edilen ürünler Tablo 3, 4 ve 5'de görülmektedir.

Tablo 3. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Bactospeine	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Biobit	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Dipel	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Florbac	Abbott	<i>aizawai</i>
Foray	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
XenTari	Abbott	<i>aizawai</i>
Cordalene	Agrichem	<i>kurstaki</i> HD-1
BMP 123	Becker	<i>kurstaki</i> HD263
Biobest-Bt	Biobest	<i>kurstaki</i> HD-1

Tablo 3'ün devamı.

Bacticide	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1
Worm Whipper	Cape Fear Chemicals	<i>kurstaki</i> HD-1
Collapse	Calliope	<i>kurstaki</i> HD-1
Baturad	Cequisa	<i>kurstaki</i> HD-1
Condor	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2348
Crymax	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7841
Cutlass	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2371
Lepinox	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG7826
Raven	Ecogen	<i>kurstaki</i> EG2424
Ecotech Bio	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2371
Ecotech Pro	Ecogen/ AgrEvo	<i>kurstaki</i> EG2348
Jackpot	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2424
Rapax	Ecogen/ Intrachem	<i>kurstaki</i> EG2348
Forwarbit	Forward International	<i>kurstaki</i> HD-1
Bio-Worm Killer	Green Light Co	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactospeine Koppert	Koppert	<i>kurstaki</i> HD-1
Guardjet	Mycogen/ Kubota	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
Maatch	Mycogen	<i>Kurstaki</i> Cry1Ac ve <i>aizawai</i> Cry1C
M/C	Mycogen	<i>aizawai</i> Cry1C
M-Peril	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
MVP	Mycogen	<i>kurstaki</i> Cry1Ac
Bactec BT 16	Plato Industries	<i>kurstaki</i> EG2348
Bactec BT 32	Plato Industries	<i>kurstaki</i> HD-1
Insectobiol	Samabiol	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactosid K	Sanex	<i>kurstaki</i> HD-1
Soilserv BT	Soil Serv Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Agrobac	Tecomag	<i>kurstaki</i> HD-1
Able	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> M-200
Agree	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Costar	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-12
Delfin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Desing	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Javelin	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Thuricide	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> HD-1
Turex	Thermo Trilogy	<i>aizawai</i> GC-91
Vault	Thermo Trilogy	<i>kurstaki</i> SA-11
Larvo-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Troy-Bt	Troy Biosciences	<i>kurstaki</i> HD-1
Ringer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
Safer BT	Verdant Inc	<i>kurstaki</i> HD-1
BT 320	Wilbur Ellis Inc	<i>kurstaki</i> HD-1

Copping (1998), CPCR (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)

Tablo 4. Dipteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşu
Bactimos	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Gnatrol	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Skeetal	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
VectoBac	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Acrobe	American Cyanamide	<i>B.t. israelensis</i>
Aquabac	Becker Microbiol	<i>B.t. israelensis</i>
BMP	Becker Microbiol	<i>B.t. israelensis</i>
Bactis	Caffaro	<i>B.t. israelensis</i>
BTI Granules	Clarke Mos. Cont.	<i>B.t. israelensis</i>
Prehatch SG	Meridian	<i>B.t. israelensis</i>
Vectocide	Sanex	<i>B.t. israelensis</i>
Summit Bactimus	Summit Kimyasalları	<i>B.t. israelensis</i>
Summit Mosquito Bits	Summit Kimyasalları	<i>B.t. israelensis</i>
Tekar	Thermo Trilogy	<i>B.t. israelensis</i>
Copping (1998), CPCR (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)		

Tablo 5. Coleopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan *B. thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Ditera	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Novodor	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Raven	Ecogen	<i>B.t. kurstaki</i> (EG2424)
M-Trak	Mycogen	<i>B.t. tenebrionis</i> /Cry 3A
Trident	Thermo Trilogy	<i>B.t. tenebrionis</i>
Copping (1998), CPCR (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)		

Tarımda biyolojik pestisidlerin kullanımı sentetik kimyasal pestisidlerinin yanında önemli derecede geri kalmıştır. Buna rağmen, bazı kesimler *B. thuringiensis*'in gelecekteki gelişimini favori görmektedirler. δ -Endotoksinler; memelilere, kuşlara, kara ve suda yaşayanlara ve sürüngenlere patojen değildirler. Ancak, böcek ve omurgasız zararlılarına karşı etkili olmaktadır. Cry orjinli pestisidler genellikle düşük maliyetle elde edilmektedir. Örneğin *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* den elde edilen ürünler sentetik kimyasal pestisidlerin 1/40 daha ucuzuna mal olmaktadır (Becker ve Margalit, 1993). Ayrıca, Cry proteinlerin mekanizması bilinen sentetik kimyasalların mekanizmasından tamamen farklıdır.

B. thuringiensis toksinleri bir araya getirilerek farklı böcek grupları üzerinde kullanılmaktadır. Honee ve arkadaşları (1990) Cry1Ab ve Cry1Ac proteinlerinin birleştirilmesi ile her ikisinin de toksik özelliğine sahip bir hibrid meydana getirmişlerdir.

Cry1Aa, Cry3A ve Cry3B2'nin kristal yapıları incelenmiştir (Borisova vd., 1994; Cody vd., 1992; Li vd., 1991). Ayrıca kısmi fonksiyonları, biyokimyasal ve genetik özelliklerine bakılarak farklı bölgelere ayrılmaktadır (Thompson vd., 1995). Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilen ICP'ler sayesinde, *B. thuringiensis* toksinlerine karşı böceğin direnç kazanması engellenmiş olmaktadır.

B. thuringiensis'in konak seçimi ve patojenitesi hem rekombinant hem de rekombinant olmayan yollar kullanılarak değeri artırılmaktadır. Örneğin bir *B. thuringiensis* suşunun plazmit yapısı rekombinant DNA yöntemlerini kullanmadan değiştirilebilir. ICP genleri konjugasyon benzeri bir işlem ile suşlar arasında transfer edilebilir. Zayıf aktiviteli ICP genlerine sahip ya da ICP genli plazmitleri kaybeden bir varyantın değerini artırmak için, insektisidal aktivitesi yüksek olan ICP'leri içeren plazmitler kullanılır. Çünkü farklı ICP'ler farklı konaklara karşı etkilidir, ICP genlerinin kombinasyonu ve manipulasyonu hem bakterinin virulansını hem de konak seçimini temelinden etkilemektedir.

Yeni *B. thuringiensis* suşlarına genetik yöntemler kullanılarak ICP genlerinin kombinasyonları yapıldı. *B. thuringiensis* klonlama vektör sistemi, *E. coli* ya da *B. thuringiensis*'de ICP genleri içeren rekombinantların seçimi sayesinde geliştirildi (Carlton, 1996). Bu sistem sadece *B. thuringiensis* DNA'sı içeren *B. thuringiensis* suşlarının üretimine müsaade eder. *B. thuringiensis* transpozon sistemi, yeni ICP kombinasyonlu suşların seçimini ve klonlamayı kolaylaştırır (Baum, 1994).

Son zamanlarda genetik mühendisliği *B. thuringiensis* toksinlerine alternatif dağıtım sistemleri sağlamak için kullanılmıştır (Kozziel vd., 1993). Böcek zararlılarına karşı ürün koruma için spreyli *B. thuringiensis* tercih edilmektedir. Buna ilave olarak *B. thuringiensis* toksinleri bitkilere doğrudan verilebilir. Aynı zamanda bu toksinler bitki epifitleri (yosun ve likenler) ya da bitki endofitleri (bitki içinde büyüyen bir mantar) vasıtasıyla taşınabilir.

B. thuringiensis'in arazi şartlarında sürekliliği zayıftır. Tekrar tekrar araziye uygulamak gerekmektedir. Bu sorunu çözmek için iki yol kullanılmıştır. Normalde böceklerle patojen olmayan *Pseudomonas fluorescens* suşuna ICP genleri klonlanmıştır (Carlton, 1996). Diğerinde ise *B. subtilis*'in *spoOA* mutant suşu, Coleopteraya karşı aktif olan *cry3A*'yı ekspres etmek için kullanıldı (Lereclus vd., 1995). *spoOA* geni sporulasyonun başlangıcında meydana gelir ve bu genin bozulması sporulasyonu engeller. Sporlar oluşmaz ve insektisidal toksin hücre içinde kapsüllenir. Böylece toksin kısmen

korunmuş olur. Bu sayede δ -endotoksinler ultraviyole ışıktan ve zararlı yaprak enzimlerinden korunur. Böylece arazi ortamında devamlılığı artırılmış olur. Bu iki yeni formülasyon *B. thuringiensis* içerikli biyopestisitlerin daha kararlı olmasını sağlamaktadır.

1.10. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Yöntemler

B. thuringiensis endüstride üretilmekte ve bu bakterinin ürünleri tarım ve orman zararlılarının (Lüthy vd., 1982), insan ve hayvan hastalıklarının vektörü olan böceklerin (Mollay, 1990; Mulla, 1990) biyolojik kontrolünde kullanılan ekonomik önemliliği olan bir bakteridir. Bu entomopatojenik özellik yeni *B. thuringiensis* izolatlarının bulunmasını teşvik eder (Martin ve Travers, 1989; Meadows vd., 1992). *B. thuringiensis* bakterisinin taksonomisi ile ilgili çalışmalar 1950 yılının sonlarında başlamıştır.

1.10.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Morfolojik, Boyama ve Biyokimyasal Yöntemler

B. thuringiensis'lerin suşlarını tanımlama yöntemleri, geleneksel mikrobiyolojik yöntemleri kullanılarak morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyona dayandırılmaktadır (Heimpel ve Angus, 1958). *B. thuringiensis* bakterisinin sınıflandırılmasında kullanılan bazı fenotipik özellikler; morfolojik, biyokimyasal, bioassay ve serotiplendirme özelliklerini kapsamaktadır.

B. thuringiensis bakterisinin tanımlanmasında ilk olarak kristallerin tespit edilmesi gerekmektedir. Bunun içinde daha iyi sonuç almak için *B. thuringiensis*'in oluşturduğu kristaller boyanmaktadır (Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988). Kristallerin varlığını tespit etmek için faz-kontrast ve ışık mikroskobu ile inceleme yapılmaktadır (Iriarte vd., 2000; Lee vd., 1994). Kristallerin büyüklüğü ve şekillerini tespit etmek için de elektron mikroskobu çalışmaları yapılmaktadır (Iriarte vd., 2000).

Çok zahmetli bir iş olmasına rağmen yeni bir *B. thuringiensis* izolatının insektisidal aktivitesini belirlemek için bioassayler yapmak gerekir (Iriarte vd., 2000). Bioassaylerde en fazla kullanılan böcekler Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera gruplarına aittir.

B. thuringiensis izolatlarının sınıflandırılmasında kullanılan faydalı bir yöntemde H-serotiplenmedir. Serovarlar içinde bu suşların farklılığı de Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından flagella antijenlerine dayandırılarak geliştirildi ve o zamandan beri

kullanılmaktadır (de Barjac ve Frachon, 1990). Ancak serotip içindeki izolatların biyokimyasal karakterleri, plazmit profilleri ve insektisidal aktiviteleri her zaman aynı değildir. Aynı zamanda, kendi kendine aglütine olan *B. thuringiensis* suşları ve hareket yeteneğine sahip olmayan suşlar bu yöntem ile tiplendirilmeleri yapılamaz. Özel amaçlar için, diğer yöntemler, örneğin plazmit profil analizi (Lereclus vd., 1982), ICP'lerini belirlemek için monoklonal antikor kullanılarak yapılan immunolojik testler (Lynch ve Baumann, 1985) ve özgün DNA problemleri kullanılarak ICP'leri kodlayan genin tanımlanması önerilmektedir.

1.10.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Genetik Yöntemler

Flagella aglütinasyonu ile yapılan serotiplendirme *B. thuringiensis* suşlarının önemli sınıflandırma yöntemi olmasına rağmen, diğer yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler poliakrilamid jel elektroforezi ile kristallerin proteinlerini belirlemek (Thomas ve Ellar, 1983), plazmitlerin sayısını ve büyüklüğünü belirlemek (Gonzalez vd., 1980) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile toksin genlerini tespit etmektir (Carozzi vd., 1991; Juarez-Perez vd., 1997). Bu yöntemler ile çok sayıdaki numunenin analizi yapılabilmektedir.

B. thuringiensis farklı büyüklükte ve çok sayıda plazmide sahiptir (Gonzales ve Carlton, 1980). Çoğu δ -endotoksin genleri büyük plazmitler üzerinde yer almaktadır, bazıları da kromozom üzerinde bulunmaktadır (Kronstad vd., 1983). *B. thuringiensis* suşlarının plazmit içerikleri birbirinden farklı olabilmektedir (Aptosoglou vd., 1997). *B. thuringiensis* izolatlarında plazmitlerin sayısının belirlenmesi ve *cry* genlerini taşıyıp taşımadığının tespit edilmesi karakterizasyon için önemlidir.

B. thuringiensis izolatlarının analizindeki dönüm noktası PCR'nin ortaya çıkmasıdır. Kleppe ve arkadaşları (1971) tarafından önerilen ve Saiki ve arkadaşları (1988) tarafından bağımsız olarak geliştirilen ve tasarlanan bu yöntem özgün DNA fragmentlerini çoğaltmak için kullanılmaktadır. PCR ile *B. thuringiensis* δ -endotoksin genlerinin tanımlanmasının suş karakterizasyonu için çok gerekli bir yöntem olduğu görülmüştür. İnsektisidal aktiviteyi tespit etmek için *B. thuringiensis cry* genlerinin PCR'ye dayalı tanımlanması ilk kez Carozzi ve arkadaşları (1991) tarafından gerçekleştirildi.

Bakteri genomundaki 16S-23S arası rRNA genini kodlayan DNA üzerinde değişmeyen ve değişken olan intergenik bölgeler bulunmaktadır. Bu intergenik bölgeler filogenetik ilişkiler bakımından yüksek derecede korunmuştur. Bu bölgeler genellikle cins veya tür seviyesinde önemli sapmalar gösterir. “Intergenik 16S-23S ara bölge polimeraz zincir reaksiyonu (ISR-PCR)” bu intergenik bölgelerin uzunluk polimorfizmini göstermek bakımından çok sık uygulanan yöntemlerin başında gelir (Daffonchio vd., 1998). *Bacillus* türlerinin teşhisinde de bu intergenik bölgelerden istifade etmek mümkündür. Bu özellikten yararlanılarak ISR-PCR yardımıyla 16S-23S rRNA genini kodlayan bölge çoğaltılabilmektedir (Gray vd., 1984).

1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından bulunan rastgele çoğaltılan polimorfik DNA (RAPD) yöntemi (Welsh ve McClelland, 1990; Williams vd., 1990), genomda rastgele bölgelerin PCR yöntemi ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu yöntemde standart PCR reaksiyonunun aksine, rastgele seçilen tek bir primer kullanılmaktadır. RAPD birbirine yakın ilişkili olan organizmaları ayırt etmek için tercih edilmektedir (McClelland ve Welsh, 1994; Bassam vd., 1992; Hadrys vd., 1992). *B. thuringiensis* serovarlarının RAPD parmak izlerine bakılarak tanımlandığı ve ayırt edildiği hatta benzer serotip içinde bireysel suşların bile ayırt edilebildiği görülmüştür (Brousseau vd., 1993).

1.10.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri

B. thuringiensis izolatlarının oluşturduğu kristallerden protoksinler ve aktif toksinler karakterizasyonda kullanılmaktadır (Porcar vd., 1999; Ferrandis vd., 1999). Tek yönlü poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) proteinlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir.

1.11. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı

B. thuringiensis suşları çok fazla miktarda plazmit içermektedir. Bundan dolayı plazmitlerinde bulunan antibiyotiğe dirençli ya da duyarlı suşları tespit etmek önemlidir (Lee vd., 1994).

1.12. Tezin Amacı

Günümüzde tarım zararlılarını kontrol altına almak için kimyasallar yerine biyolojik ajanlar tercih edilmeye başlanmıştır. Tarım zararlılarına karşı kullanılan bakterilerden en fazla tercih edileni *B. thuringiensis* bakterisidir. Etkili ve güvenilir biyolojik kontrol için bu bakterinin özelliklerinin belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada da topraktan ve böceklerden izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarının karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu sayede tarımda zararlı böceklerle karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek mikrobiyal kontrol materyalleri bulmak hedeflenmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteriler ve Büyüme Şartları

Bu çalışmada, yapılan ön deneyler sonucunda kristal içeren ve ISR-PCR sonuçlarına göre kontrol *B. thuringiensis*'lerle benzer bantlar oluşturan 9 *B. thuringiensis* izolatı Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Kullanılan *B. thuringiensis*'lerin 3 tanesi böceklerden [(BnBt (Coleoptera: Curculionidae, *Balaninus nukum*, canlı, ergin), Mm2 (Coleoptera: Scarabaeidae, *Melolontha melolontha*, canlı, ergin,) ve MnÖ (Lepidoptera: Lasiocampidae, *Malacosoma neustria*, ölü, larva)], 6 tanesi topraktan (6 numaralı izolat Çağlayan'dan, 11 numaralı izolat Yeşilova'dan, 27 numaralı izolat Akçaabat'tan, 29 ve 40 numaralı izolatlar farklı zamanlarda Tonya'dan ve 46 numaralı izolat Çaykara'dan) izole edilmiştir. Kontrol olarak *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Daniel R. Zeigler, Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, Ohio), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (DSMZ 5724) ve *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Plant Genetic Systems J. Plateaustroat 22, 9000 Gent, Belçika) kullanıldı.

B. thuringiensis izolatları nutrient agar (Merck) ve Luria Bertani besiyerlerinde (1 litre dH₂O için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü, LB) 30 °C'lik inkübatörlerde büyütüldü.

2.2. İzolatların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1. Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması

B. thuringiensis izolatları "nutrient agar" besiyerlerinde beş gün büyütüldü. Besiyerlerinden toplanan spor-kristal karışımları soğuk 1 M'lık NaCl'de süspanse edildi. Daha sonra bu karışım 13000×g' de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelte steril ddH₂O ile iki kez yıkandı. Pelte steril ddH₂O'da çözüldü. Kullanılncaya kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

2.2.2. Kristallerin Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Spor-kristal karışımlarından “smear”lar hazırlandı. “Smear”lar, etanol/aseton (%50/50) karışımından geçirildi. Daha sonra Coomassie Brilliant Blue (%50 etanol ve %7 asetik asit çözelti içinde %25 oranında CBB) boyası ile boyama yapıldı (Sharif ve Alaeddinoğlu, 1988). Boyama neticesinde preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Mikroskoba takılan dijital fotoğraf makinesiyle (Nikon) fotoğrafları çekildi.

2.2.3. Kristallerin Tarama Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

Spor-kristal karışımlarından lamel üzerinde hazırlanan “smear”lar havada kurutulduktan sonra altın ile kaplama yapıldı. Spor-kristaller tarama elektron mikroskobu (JSM 6400) ile 15 kV altında incelendi.

2.2.4. Kristallerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

B. thuringiensis izolatlarının ve spor-kristal karışımlarının insektisidal aktivitelerini test etmek için bioassayler yapıldı. Bioassaylerde Lepidoptera grubundan *Malacosoma neustria* L. (Lasiacompidae, yüzük kelebeği), *Lymantria dispar* L. (Lymantridae, kırtırtılı), *Hyphantria cunea* Drury. (Arctiidae, amerikan beyaz kelebeği) ve *Galleria mellonella* L. (Galleridae, büyük balmumu güvesi) larvaları, Coleoptera grubundan *Leptinotarsa decemlineata* Say (Chrysomelidae, patates böceği) ve *Agelastica alni* L. (Chrysomelidae, kızılağaç böceği) larvaları ve Diptera grubundan da *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae, sirke sineği) erginleri bioassaylerde kullanıldı. Bioassaylerde kullanılan bu larvalar Trabzon ve çevre illerden toplandı. *Drosophila melanogaster* Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Handan Uysal’dan temin edildi. Test edilecek numuneler 10^9 spor-kristal/ml olacak şekilde hazırlandılar. Her bir numune için 10 tane larva bioassay kapları içerisine yerleştirildi. Hazırlanan karışımlar taze yapraklara sürüldü ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra bu yapraklar böceklere verildi. *Drosophila melanogaster* erginleri ve *Galleria mellonella* larvaları için kendi yiyecekleri hazırlandı. Bu yiyecekler üzerine test edilecek numuneler ilave edildi. Bioassayler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Meydana gelen ölümler Coleoptera ve Lepidoptera larvaları için 10 gün

sonunda, Diptera larvaları için 4 gün sonunda kayıt edildi. Deneyler üç tekrarlı yapıldı. Fakat *Lymantria dispar* larvalarının sayısının yeterli olmaması nedeniyle deney grubu 5'erli ve 2 tekrarlı yapıldı. Ayrıca *Agelastica alni* larvaları laboratuvar şartlarına uzun süre dayanmadığı için deneyler 3 gün ile sınırlı kaldı. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ve *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* suşları pozitif kontroller olarak kullanıldılar. Bioassaylerden elde edilen sonuçlar Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

2.3. İzolatların Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

2.3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarından DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yönteme göre yapıldı. Çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* izolatları, nutrient broth besiyerinde 30 °C'de bir gece inkübe edilerek üretildi. Elde edilen sıvı kültürler iki kez oda sıcaklığında 13,000×g'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pelte kısımları saklandı. Peltelerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilerek pelteler çözüldü. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim konularak vortekslendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için, 50 µl %10'luk SDS eklenerek 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, her bir tüpe 3 M'lık 0,1 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dakika alt üst edilerek hücrelerin parçalanmaları sağlandı. Üzerlerine 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi, tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13000×g' de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki sıvı alınıp temiz tüplere bırakıldı, pelte kısmı ise atıldı. Bu tüplere tekrar 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 13000×g' de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra, üzerlerindeki sıvı kısım alındı, 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'lık etanol ilave edildi ve -20 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13,000×g'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvılar boşaltıldı. Kalan peltelerin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13,000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısımlardaki sıvılar dökülerek her bir pelte açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelteleri, 100 µl ddH₂O'da çözüldü ve -20 °C'de muhafaza edildi.

2.3.2. İntergenik 16S-23S Ara Bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ISR-PCR) Analizi

16S-23S rRNA arasındaki bölgenin PCR yöntemi ile çoğaltılması için A) FGPS 1490-72 (5'-TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT-3') ve B) FGPL 132-38 (5'- CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') primerleri kullanıldı (Riffard, 1998).

PCR reaksiyonları 50 µl'lik hacimlerde yapıldı. Her bir tüpe 2,5 ünite *Taq* DNA polimeraz, 5 µl 10×PCR tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 2,5 mM MgCl₂, 1 mM 16S-23S A primeri, 1 mM 16S-23S B primeri, 5'er µl 2 mM'lık dNTP'lerden ve 1 µl genomik DNA bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR şartları 95 °C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü 95 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika şeklinde gerçekleştirildi (Riffard, 1998).

PCR reaksiyonları sonucunda oluşan DNA fragmentleri 0,5 µg/ml etidyum bromür katkılı %1,3'lük agaroz jelde 90 V'da 1 saat elektroforez edildi. Tespit edilen DNA fragmentleri "BioDocAnalyze" (Biometra) sistemiyle görüntülendi.

2.3.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının *cry* Gen İçeriklerinin Belirlenmesi

B. thuringiensis izolatlarının *cry* gen içeriklerinin tespit edilebilmesi için PCR kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan genel primerler: *cry1* (forward, 5'-CAT GAT TCA TGC GGC AGA TAA AC-3'; reverse, 5'- TTG TGA CAC TTC TGC TTC CCA TT-3'), *cry2* (forward, 5'- GTT ATT CTT AAT GCA GAT GAA TGG G-3'; reverse, 5'-CGG ATA AAA TAA TCT GGG AAA TAG T-3'), *cry3* (forward, 5'-CGT TAT CGC AGA GAG ATG ACA TTA AC-3'; reverse, 5'-CAT CTG TTG TTT CTG GAG GCA AT-3') and *cry 4* (forward, 5'GCA TAT GAT GTA GCG AAA CAA GCC -3'; reverse, 5'- GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C-3') (Ben-Dov vd., 1997). Bu primerlerin oluşturduğu alt sınıfların ürünlerinin büyüklükleri Tablo 6'da verilmektedir (Ben-Dov vd., 1997).

Tablo 6. Genel primerler ile tespit edilen *cry* genleri ve ürün büyüklükleri

Gen Terminolojisi		Ürün
Yeni Adı	Orijinal Adı	Büyüklüğü (bp)
<i>cry1Aa5</i>	<i>cryIA(a)</i>	277
<i>cry1Ab9</i>	<i>cryIA(b)</i>	277
<i>cry1Ac5</i>	<i>cryIA(c)</i>	277
<i>cry1Ad</i>	<i>cryIA(d)</i>	277
<i>cry1Ae</i>	<i>cryIA(e)</i>	277
<i>cry1Ba</i>	<i>cryIB</i>	274
<i>cry1Bb</i>	<i>cryI ETS</i>	274
<i>cry1Ca1</i>	<i>cryIC</i>	277
<i>cry1Cb</i>	<i>cryIC(b)</i>	277
<i>cry1Da</i>	<i>cryID</i>	277
<i>cry1Db</i>	<i>prtB</i>	277
<i>cry1Ea3</i>	<i>cryIE</i>	277
<i>cry1Eb</i>	<i>cryIE(b)</i>	277
<i>cry1Fa2</i>	<i>cryIF</i>	277
<i>cry1Fb</i>	<i>prtD</i>	277
<i>cry1G</i>	<i>prtA</i>	277
<i>cry1H</i>	<i>prtC</i>	277
<i>cry1Hb</i>		277
<i>cry1Ja</i>	<i>cryI ET4</i>	274
<i>cry1K</i>		274
<i>cry2Aa1</i>	<i>cryIIA</i>	701
<i>cry2Ab2</i>	<i>cryIIB</i>	701
<i>cry2Ac</i>	<i>cryIIC</i>	689
<i>cry3A6</i>	<i>cryIIIA</i>	589
<i>cry3Ba1</i>	<i>cryIIIB</i>	595
<i>cry3Bb1</i>	<i>cryIIIBb</i>	595
<i>cry3C</i>	<i>cryIIID</i>	604
<i>cry4A2</i>	<i>cryIVA</i>	439
<i>cry4B4</i>	<i>cryIVB</i>	439

PCR reaksiyonları 25 µl'ye göre yapıldı. Her bir tüpe: dört farklı dNTP'den 150 µM, primerlerden 0,4 µM, 0,5 U *Taq* DNA polimeraz, 10× konsantrasyonlu reaksiyon tamponundan 2,5 µl, 1,5 mM konsantrasyonlu MgCl₂'den 1,5 µl ve 1 µl' de her bir *B. thuringiensis* izolatından DNA bırakıldı. Ayrıca reaksiyon karışımının üzerine buharlaşmayı önlemek için 15 µl mineral yağ ilave edildi. PCR reaksiyon şartları: 94 °C'

deki ilk denatürasyon basamağının ardından 30 döngü 94°C’de 60 saniye, 55°C’de 50 saniye ve 72°C’de 90 saniye olacak şekilde gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonları sonucunda oluşan DNA fragmentleri daha önceden belirtildiği gibi görüntülendi.

2.3.4. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarından Plazmit İzolasyonu

B. thuringiensis izolatlarından plazmitler Jensen ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak izole edildi. Buna göre, hücreler 5 ml’lik LB sıvı besiyerinde 30 °C’de bir gece büyütüldü. Kültürlerden 2 ml alınarak santrifüj edildi ve pelte 100 µl TE tamponunda (40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,9) çözüldü. Daha sonra hücrelere taze olarak hazırlanmış 200 µl alkali çözeltisi (%3 SDS, %15 sukroz, 50 mM Tris, pH 12,5) ilave edildi ve parçalanması sağlandı. Karışım 60 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 5 U proteinaz K ilave edildi. Mikrosantrifüj tüpünde bulunan karışımlar 20 kez alt-üst edildikten sonra 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi. Bu işlem sonucunda alınan numuneler üzerine 1’er ml fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi. Tüpler 40 kez alt-üst edildikten sonra 6,000×g’de 7 dakika santrifüj edildi. Üst fazdaki plazmit içeren karışımdan 60 µl alınıp 1×TBE (Tris-Borik asit EDTA)’de hazırlanmış %0,5’lik agaroz jelde 62 V’da 4 °C’de 5-7 saat elektroforez edildi. Jel 1 µg/ml’lik etidium bromürlü dH₂O’lu karışım içerisinde 4 °C’de bir gece bekletildi. Daha sonra “BioDocAnalyze” sistemi ile görüntülendi.

2.4. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

B. thuringiensis izolatlarındaki kristal proteinleri tespit etmek için spor-kristal karışımları sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) analiz edildi.

Miktarları tayin edilmiş olan protein numunelerinden uygun miktarlarda (10 µg) alındı. Bu numunelere muamele tamponu (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2

SDS, %5 2-merkaptoetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içersinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 30 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) çözeltisine alındı. Daha sonra tarayıcı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.4.1.1. Kristal Proteinlerin Çözünmesi ve Tripsin ile Muamele Edilmesi

B. thuringiensis izolatlarının spor-kristal karışımları çözünme tamponu içerisinde (50 mM Na₂CO₃, 0,1 M NaCl ve 10 mM DTT, pH 11,3) 2 saat sallayıcıda sallanmaya bırakıldı. Çözünmüş proteinler 5 dakika 13000×g'de santrifüj edildi. Böylece kristal proteinleri sporlardan ayrılmış oldu. Elde edilen süpernatantın protein konsantrasyonu Bradford yöntemi (1976) ile tayin edildi. Daha sonra 1:20 (Tripsin/protein w/w) oranında tripsin ilave edildi. Karışım 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. 1. ve 2. saatlerde tripsinden aynı oranlarda ilave edildi. Elde edilen proteolitik ürünler %10'luk SDS-PAGE'de analiz edildi.

2.5. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri

B. thuringiensis izolatlarının antibiyotiğe duyarlılık testleri yapıldı. Bunun için agar disk yöntemi kullanıldı (Murray vd., 1995). Test edilen antibiyotikler tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg) kanamisin (30 µg), penisilin (10 µg), streptomisin (10 µg), sülfametaksol (25 µg) ve kloromfenikol (30 µg)'dur.

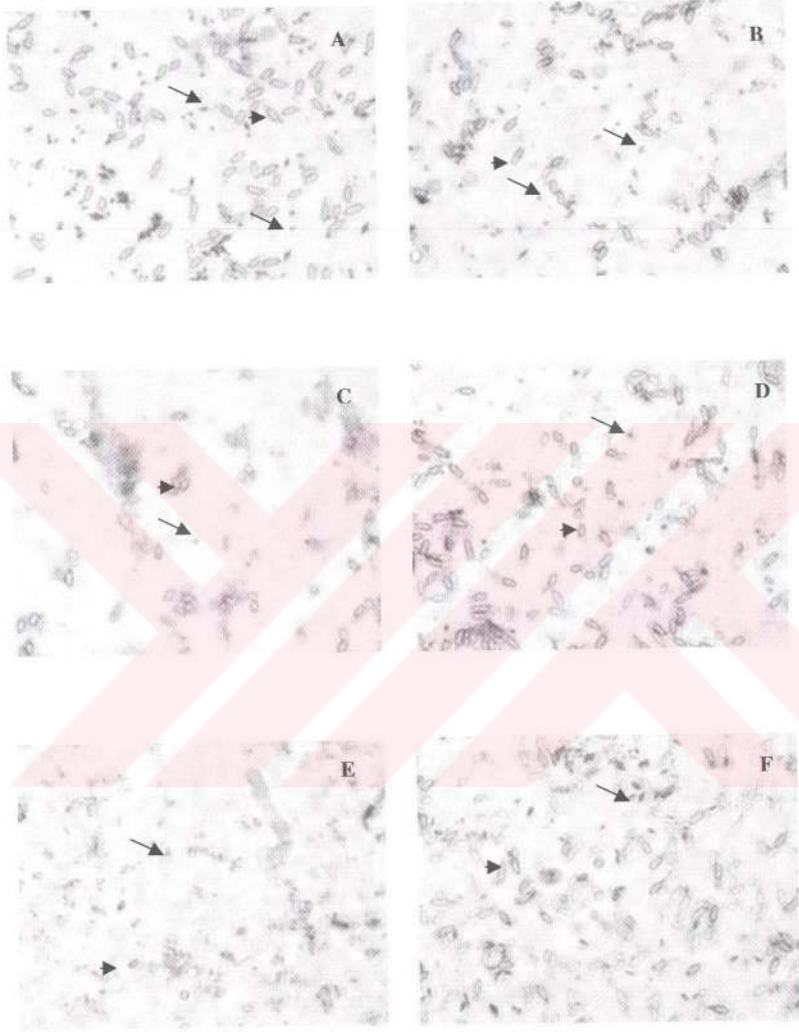
3. BULGULAR

Bu çalışmada, kullanılan *B. thuringiensis* izolatları Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Bu izolatların üç tanesi böceklerden [BnBt (*Balaninus nukum*, ergin), Mm2 (*Melolonta melolanta*, ergin) ve MnÖ (*Malacosoma neustria*, larva)] altı tanesi ise topraktan [6 numaralı izolat Çağlayan'dan, 11 numaralı izolat Yeşilova'dan, 27 numaralı izolat Akçaabat'tan, 29 ve 40 numaralı izolat farklı zamanlarda Tonya'dan ve 46 numaralı izolat Çaykara'dan] izole edildi. Bu izolatlar fenotipik, moleküler ve kemotaksonomik olarak karakterize edildiler.

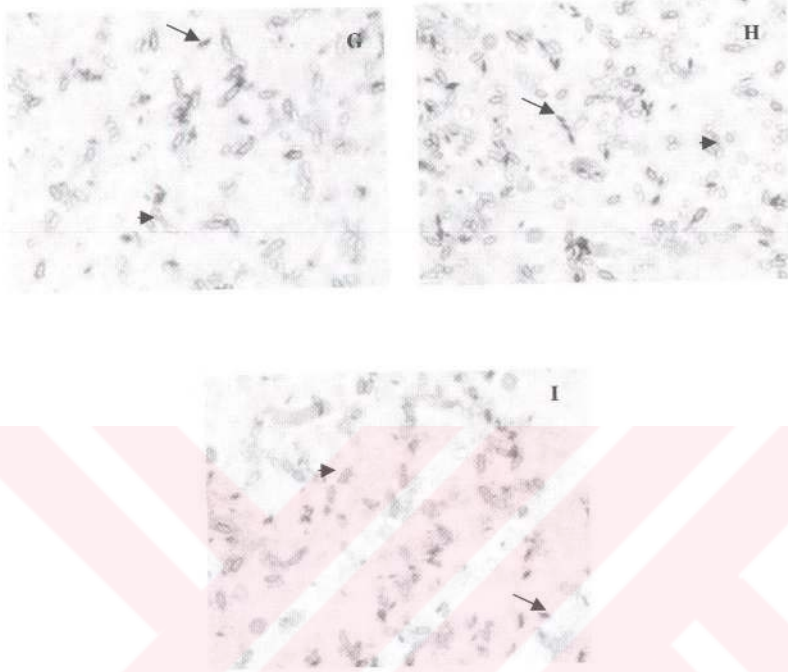
3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Fenotipik Özellikleri

3.1.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kristal Morfolojileri

Bu çalışmada kullanılan sekiz *B. thuringiensis* izolatı nutrient agar üzerinde dalgalı ve krem renkli koloni oluştururken bir izolatın (11 numaralı izolat) yuvarlak ve sarımtırak renk koloni oluşturduğu görüldü. Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanan *B. thuringiensis* izolatlarının oluşturduğu kristaller ışık mikroskobu ile incelendi (Şekil 4). İnceleme sonucunda sadece iki izolat (Mm2 ve 11 numaralı izolat) hariç diğerlerinin kristal şekilleri tespit edildi (Şekil 4; C, E). BnBt, MnÖ, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatta bipiramidal şekilli kristaller görünürken 6 numaralı izolatta küresel şekilli kristaller belirlendi.



Şekil 4. *B. thuringiensis* izolatlarının kristal morfolojilerinin ışık mikroskopundaki görünümleri (1000×). A) BnBt izolatı, B) MnÖ izolatı, C) Mm2 izolatı, D) 6 numaralı izolat, E) 11 numaralı izolat, F) 27 numaralı izolat, G) 29 numaralı izolat, H) 40 numaralı izolat, I) 46 numaralı izolat. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



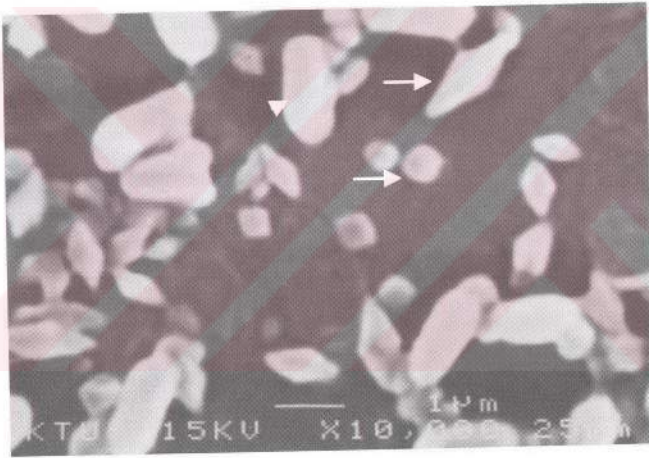
Şekil 4'ün devamı.

Tarama elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar ışık mikroskobu çalışmalarını doğrulamıştır (Şekil 5-13). Mm2 ve 11 numaralı izolatların kristal şekilleri tarama elektron mikroskobu ile belirlendi. Mm2 izolatında düz kare kristal, 11 numaralı izolatta ise şekilsiz kristaller belirlendi. Ayrıca BnBt, MnÖ ve 27 numaralı izolatlarda bipiramidal kristallere ilave olarak kübik kristaller de tespit edildi. *B. thuringiensis* izolatlarının oluşturduğu kristallerin büyüklükleri Tablo 7'de görülmektedir.

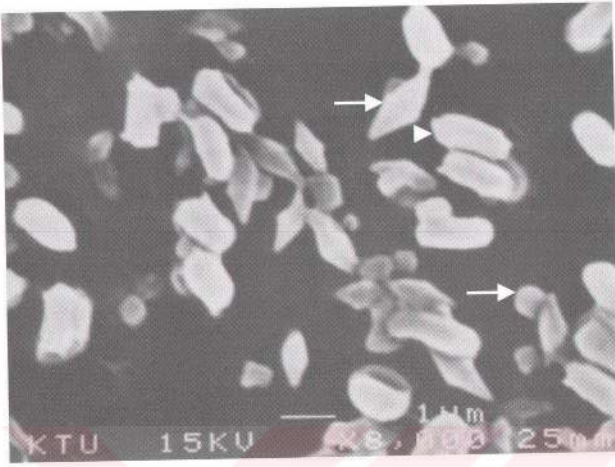
Tablo 7. *B. thuringiensis* izolatlarının oluşturduğu kristallerin büyüklükleri

İzolatların Adı	Kristallerin Şekli ve Büyüklükleri (µm)			
	Bipiramidal	Kübik	Düz Kare	Şekilsiz/Küresel
BnBt	0.8-1.5 × 0.4-0.6	0.3-0.7	-	-
MnÖ	0.9-1.8 × 0.3-0.7	0.4-1.0	-	-
Mm2	-	-	0.3-0.8	-
6	-	-	-	0.3-0.7 ^a
11	-	-	-	0.3-0.9 ^b
27	0.7-1.1 × 0.4-0.5	0.5-0.7	-	-
29	0.6-1.2 × 0.3-0.5	-	-	-
40	1.0-1.6 × 0.5-0.7	-	-	-
46	0.6-1.1 × 0.3-0.5	-	-	-

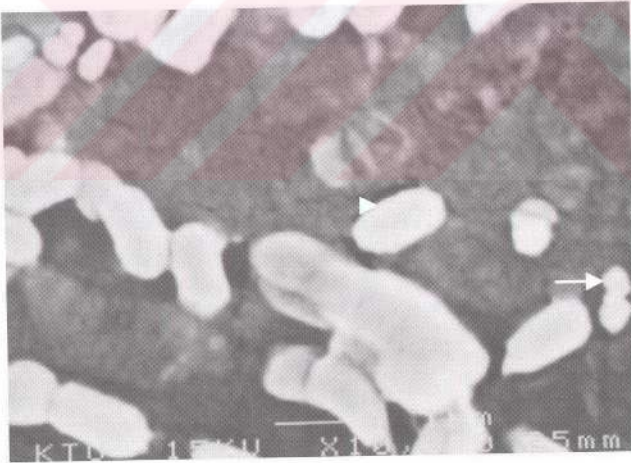
:- Kristal tespit edilemedi, ^a Küresel ^b Şekilsiz



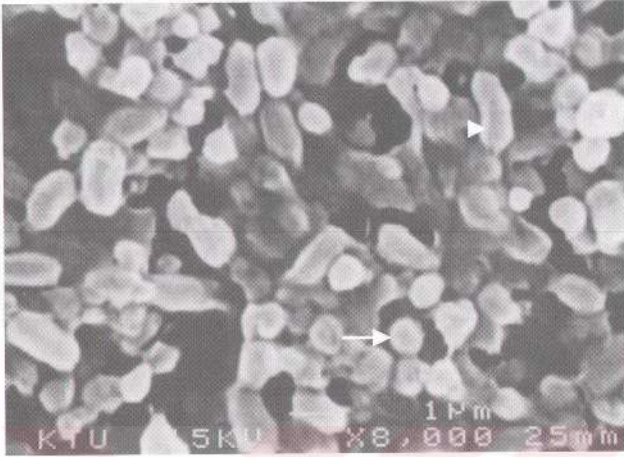
Şekil 5. BnBt izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



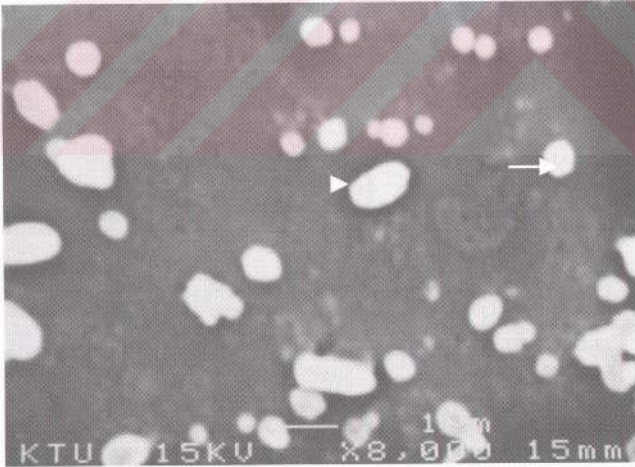
Şekil 6. MnÖ izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



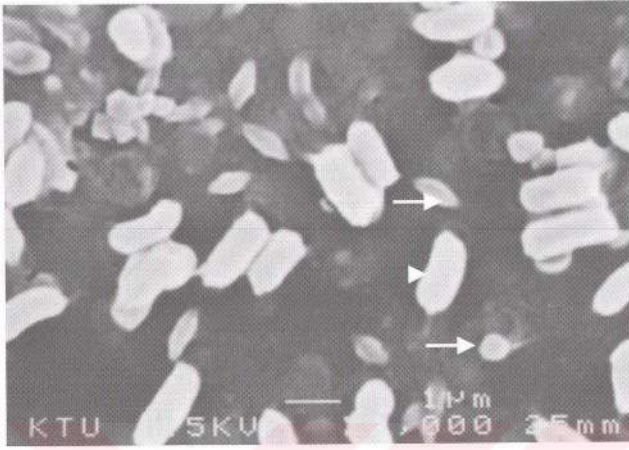
Şekil 7. Mm2 izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



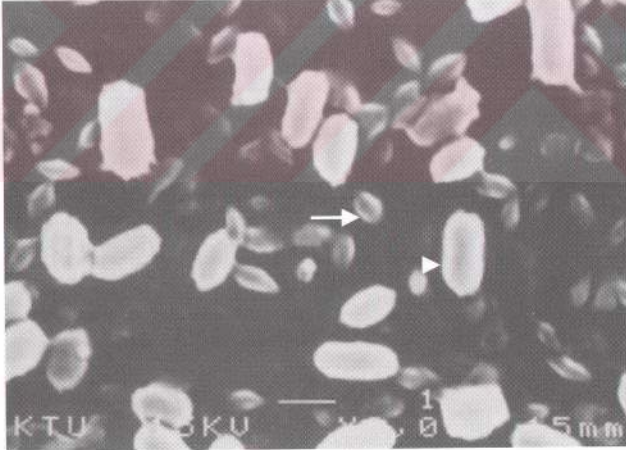
Şekil 8. 6 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



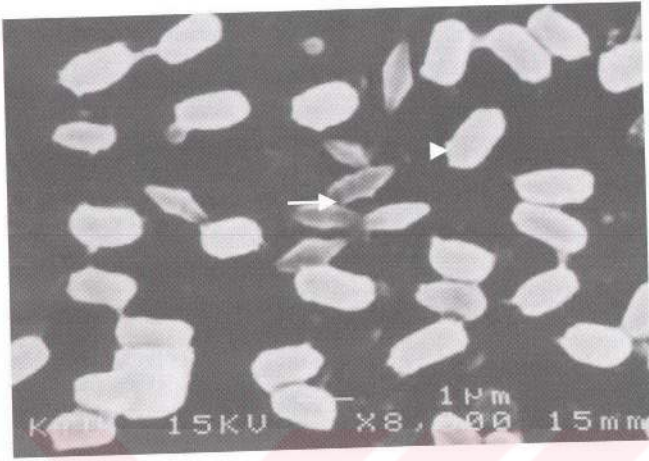
Şekil 9. 11 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



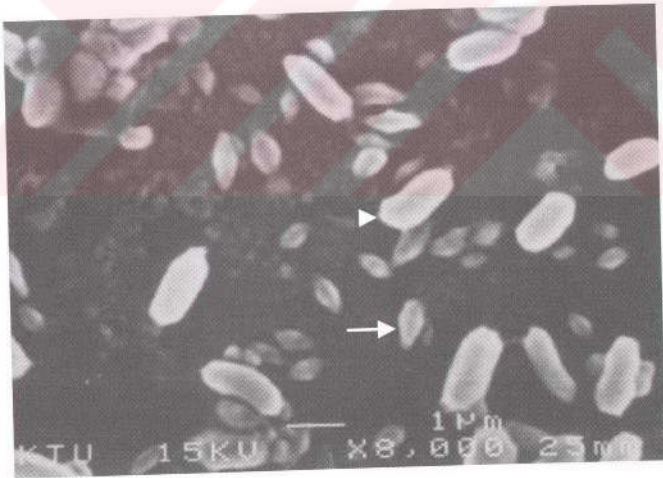
Şekil 10. 27 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



Şekil 11. 29 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



Şekil 12. 40 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



Şekil 13. 46 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir

3.1.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnsektisidal Özellikleri

B. thuringiensis izolatlarının Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera gruplarına ait yedi böcek üzerinde insektisidal özelliklerinin belirlenmesi için 10^9 spor-kristal/ml karışımı hazırlandı.

Lepidoptera grubuna ait olan yüzük kelebeği (*Malacosoma neustria*), kırtırtılı (*Lymantria dispar*), Amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea*) ve büyük balmumu güvesi (*Galleria mellonella*) larvaları bioassaylerde kullanıldı. En fazla insektisidal etkiyi BnBt ve MnÖ izolatları gösterdi.

Malacosoma neustria larvaları üzerinde yapılan bioassayler sonucunda BnBt ve MnÖ izolatları 2. ve 3. günlerde kontrol *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'den daha fazla bir etkiye neden olmuştur (Tablo 8).

Tablo 8. *B. thuringiensis* izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) *Malacosoma neustria* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	Günler Ölüm Oranları (%)		
	2.Gün	3.Gün	10.Gün
BnBt	30	90	100
MnÖ	30	76	100
Pozitif kontrol ^a	16	83	100
Negatif kontrol ^b	-	-	-

-: insektisidal bir etki tespit edilemedi, ^a*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

^bSteril ddH₂O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

Lymantria dispar larvaları ile yapılan deney sonucunda en fazla etkiyi gösteren BnBt izolatu kontrol ile benzer sonuç vermiştir. En fazla etki gösterenlerden MnÖ izolatu 2. günde BnBt ve kontrol *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'e göre % 10 daha az etkilidir (Tablo 9). Diğer izolatlar çok az etki göstermişlerdir.

Tablo 9. *B. thuringienis* izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) *Lymantria dispar* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	Günler Ölüm Oranları (%)		
	2.Gün	3.Gün	10.Gün
BnBt	80	90	90
MnÖ	70	90	100
Mm2	-	-	10
27	-	10	10
29	-	10	10
40	-	-	10
46	-	10	10
Pozitif kontrol ^a	80	90	100
Negatif kontrol ^b	-	-	-

-. insektisidal bir etki tespit edilemedi, ^a*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

^bSteril ddH₂O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

Hyphantria cunea larvaları ile yapılan deneylerde BnBt ve MnÖ izolatları etkili olmuştur (Tablo 10). Bu iki izolatın etkisi 2. ve 3. günlerde kontrol *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ile birbirine yakın değerler gösterirken 10 gün sonunda en fazla etki kontrolde olmuştur.

Tablo 10. *B. thuringienis* izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) *Hyphantria cunea* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	Günler Ölüm Oranları (%)		
	2.Gün	3.Gün	10.Gün
BnBt	30	30	53
MnÖ	20	33	53
Pozitif kontrol ^a	23	43	80
Negatif kontrol ^b	-	-	3

-. insektisidal bir etki tespit edilemedi, ^a*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

^bSteril ddH₂O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

Büyük balmumu larvaları kullanılarak yapılan deneylerde herhangi bir insektisidal etki tespit edilemedi.

Coleoptera grubundan olan patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) larvaları kullanılarak yapılan bioassaylerde 10 gün sonunda Mm2 numaralı izolatin pozitif kontrol olarak kullanılan *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* suşundan %14 daha fazla bir insektisidal etkiye sahip olduğu tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11. *B. thuringiensis* izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor- kristal/ml) *Leptinotarsa decemlineata* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	Günler Ölüm Oranları (%)		
	2.Gün	3.Gün	10.Gün
Mm2	53	80	90
Pozitif kontrol ^a	46	63	76
Negatif kontrol ^b	-	-	-

-. insektisidal bir etki tespit edilemedi, ^a*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*,

^bSteril ddH₂O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

Coleoptera grubuna ait olan diğer bir zararlı olan kızılağaç böceği (*Agelastica alni*) larvaları kullanılarak yapılan bioassaylerde Mm2 izolatinin pozitif kontrolden daha fazla insektisidal etkiye sahip olduğu belirlendi (Tablo 12). Fakat laboratuvar şartlarında *Agelastica alni* larvaları uzun süre yaşayamadığından deney diğer bioassaylere nazaran daha kısa sürede sonlandırıldı.

Tablo 12. *B. thuringiensis* izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının (10^9 spor-kristal/ml) *Agelastica alni* larvaları üzerindeki insektisidal etkileri

<i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	Günler	
	Ölüm Oranları (%)	
	2.Gün	3.Gün
BnBt	16	40
MnÖ	20	26
Mm2	96	96
6	33	43
11	10	26
27	36	63
29	10	13
40	6	23
46	6	10
Pozitif kontrol ^a	66	80
Negatif kontrol ^b	6	20

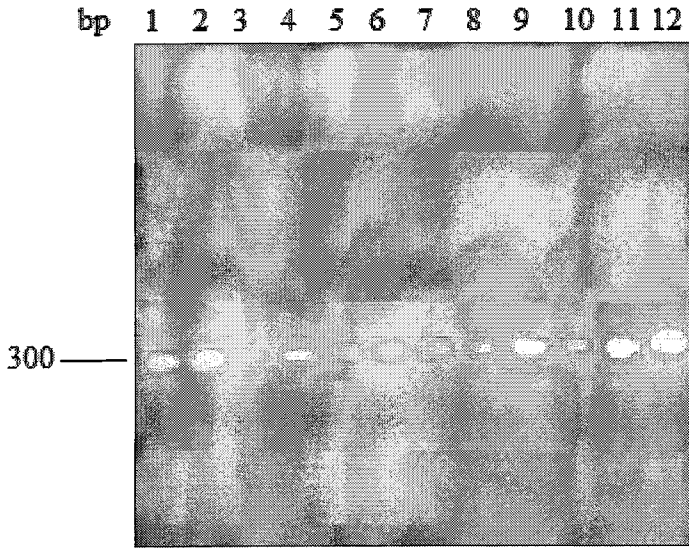
^a*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, ^bSteril ddH₂O

Diptera grubundan olan meyve sineği erginleri kullanılarak yapılan bioassayler sonucunda herhangi bir insektisidal etki belirlenemedi.

3.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Moleküler Özellikleri

3.2.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatların İntergenik 16S-23S Ara Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (ISR-PCR) Analizi

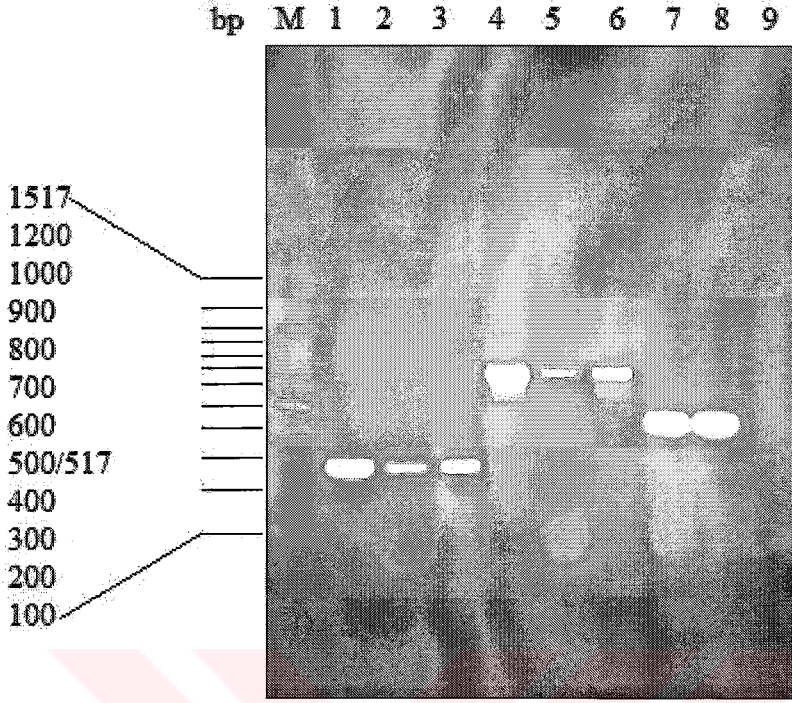
Toprak ve böceklerden izole edilen dokuz izolatın 16S-23S rRNA genleri arasındaki “intergenik” bölge PCR reaksiyonları ile artırıldı ve oluşan PCR profili incelendi. Yapılan inceleme sonunda Şekil 14 ‘te de görüldüğü gibi bütün izolatlar kontrol *B. thuringiensis*’in suşları ile aynı bantları oluşturmaktadır. Oluşan bandın büyüklüğü yaklaşık 300 bp kadardır.



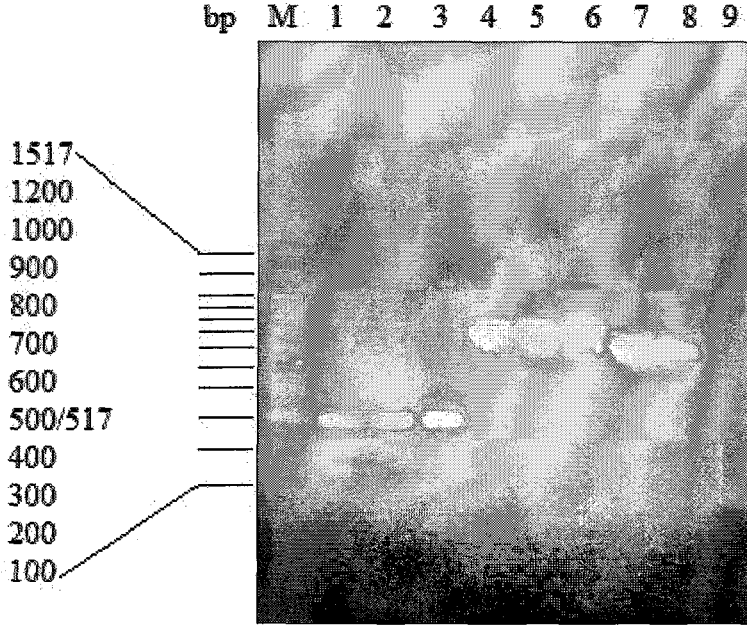
Şekil 14. *B. thuringiensis* izolatlarının ISR-PCR analizleri. 1) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 2) *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 3) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 4) BnBt izolatu, 5) MnÖ izolatu, 6) Mm2 izolatu, 7) 6 numaralı izolat, 8) 11 numaralı izolat, 9) 27 numaralı izolat, 10) 29 numaralı izolat, 11) 40 numaralı izolat, 12) 46 numaralı izolat

3.2.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının *cry* Gen İçerikleri

B. thuringiensis izolatlarının kristal proteinlerini kodlayan *cry* genler PCR ile belirlendi. Bunun için 4 çift genel primer (*cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*) sentez ettirildi. Bu primerlerin oluşturdukları PCR ürünlerinin büyüklükleri Tablo 6'de görülmektedir. PCR sonucunda, *B. thuringiensis* izolatları kontrol *B. thuringiensis* suşları ile benzer bantlar oluşturdu (Şekil 15, 16). *cry1* primeri kullanılarak yapılan PCR çalışmalarında *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşu ile BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı izolatlar yaklaşık 277 bp'lik, *cry2* primeri ile yapılan PCR'da ise BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı izolatlarda yaklaşık 700 bp'lik bant, *cry3* primeri ile yapılan PCR'da *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ile Mm2 izolatu 589 bp'lik ve *cry4* primeri kullanılarak yapılan PCR'da *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* suşu ile 6 numaralı izolatu yaklaşık 439 bp uzunluğunda bant oluşturduğu görüldü.



Şekil 15. Topraktan izole edilen *B. thuringiensis*' lerin *cry1* (1, 2, 3), *cry2* (4, 5, 6) ve *cry4* (7, 8) gen primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri. M) Markır (100 bp'lik DNA Markır), 1) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 2) 11 numaralı izolat, 3) 29 numaralı izolat, 4) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 5) 11 numaralı izolat, 6) 29 numaralı izolat, 7) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 8) 6 numaralı izolat, 9) DNA'sız negatif kontrol

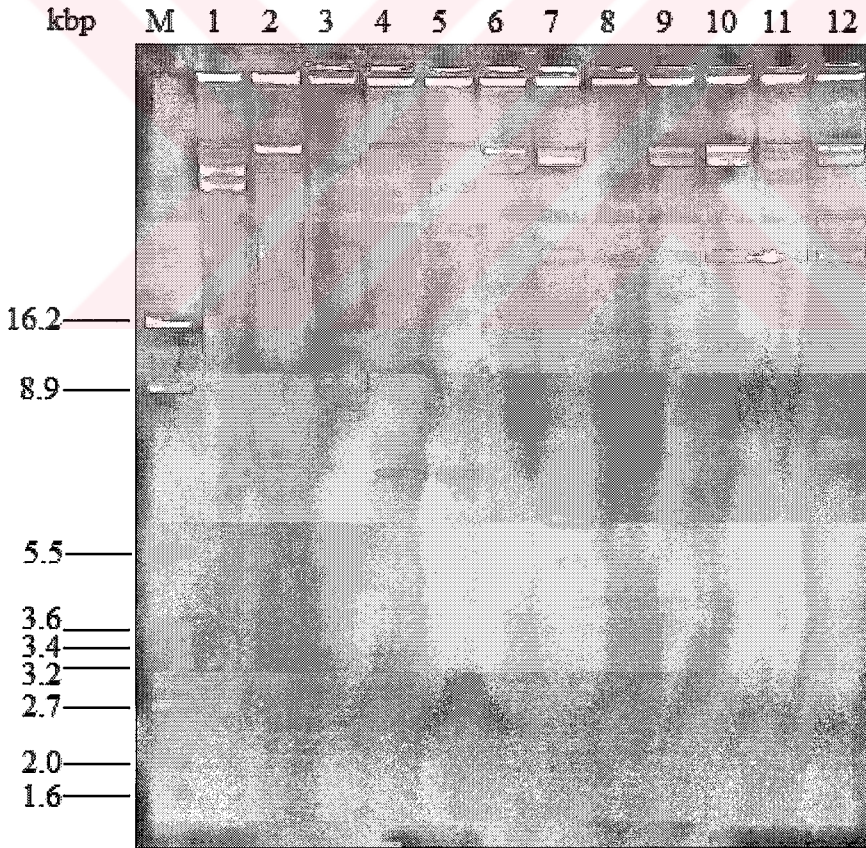


Şekil 16. Böcekten izole edilen *B. thuringiensis*'lerin *cry1* (1, 2, 3), *cry2* (4, 5, 6) ve *cry3* (7, 8) gen primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri. M) Markır (100 bp'lik DNA Markır), 1) *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 2) BnBt izolatu, 3) MnÖ izolatu, 4) *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 5) BnBt izolatu, 6) MnÖ izolatu, 7) *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 8) Mm2 izolatu, 9) DNA'sız negatif kontrol

3.2.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Plazmit İçerikleri

B. thuringiensis izolatlarının plazmit sayıları ve büyüklükleri kontrol *B. thuringiensis* suşları ile karşılaştırıldı (Şekil 17). Plazmit izolasyonu için kullanılan bu yöntemde plazmitler linear olarak elde edilemezler. Bu yüzden bazı plazmitler agaroz jelde üç farklı bantdan daha fazla olabilmektedirler. *B. thuringiensis*'den izole edilen plazmitlerin tam sayısını belirlemek oldukça zordur. Bu nedenle, burada plazmitlerin kendilerinden ziyade plazmidik bantların sayısı ve büyüklükleri verilecektir. Ayrıca bazı izolatlarda büyük plazmitlerin miktarları düşüktür. Bunun nedeni ise büyük plazmitlerin izole edilmesi esnasında kırılmalar meydana gelmektedir ya da izolatların biyokimyasal özellikleri ile ilgili olmaktadır. Bir izolatta (11 numaralı izolat) bir tane plazmit tespit edilirken diğer izolatlarda 4 ve üzeri plazmit bulundu. Buna göre; BnBt izolatında 7 plazmit bulunurken en büyük plazmidin moleküler ağırlığı 38,6 kbp, en küçük plazmit ise 5,8 kbp'dir. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 izolatu ile karşılaştırıldığında en büyük ve en küçük plazmitlerin moleküler ağırlıkları aynıdır. Ancak BnBt izolatında *B.*

thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 suşunda mevcut olan iki büyük plazmit bulunmamaktadır. MnÖ izolatu da 7 plazmit içermektedir ve *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'de bulunan bir büyük plazmidi içermemektedir. Mm2 izolatu *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* izolatu ile benzer plazmitlere sahiptirler. 6 numaralı izolatta *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ile benzer plazmit profilleri gösterdi. Ancak 6 numaralı izolatta *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* izolatında bulunan moleküler ağırlığı küçük bir plazmit bulunmamaktadır. 11 numaralı izolatta 29,7 kbp'lik bir plazmit tespit edildi. Diğer izolatlarda birbirlerine yakın büyük moleküler ağırlıklı plazmitler içermektedir. Fakat 40 numaralı izolatta 3 tane büyük moleküler ağırlıklı plazmit bulunmamaktadır. Ayrıca bu izolatta diğerlerinden daha küçük moleküler ağırlıklı plazmit de tespit edildi.

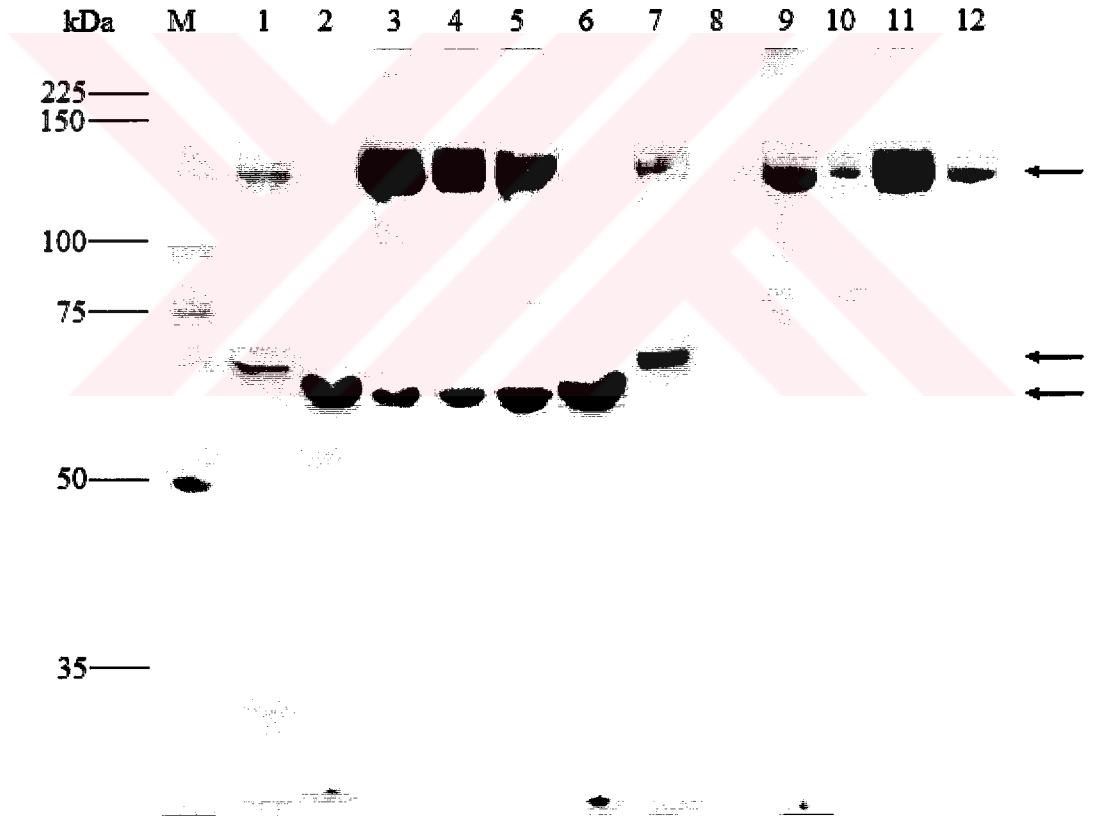


Şekil 17. *B. thuringiensis* izolatlarının plazmit içerikleri. M) Markır (λ DNA'sı *EcoRI*, *HindIII* ve *BamHI* ile kesilmiştir) 1) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 2) *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 3) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 4) BnBt izolatu, 5) MnÖ izolatu, 6) Mm2 izolatu, 7) 6 numaralı izolat, 8) 11 numaralı izolat, 9) 27 numaralı izolat, 10) 29 numaralı izolat, 11) 40 numaralı izolat, 12) 46 numaralı izolat

3.3. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri

3.3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kristal Protein Profilleri

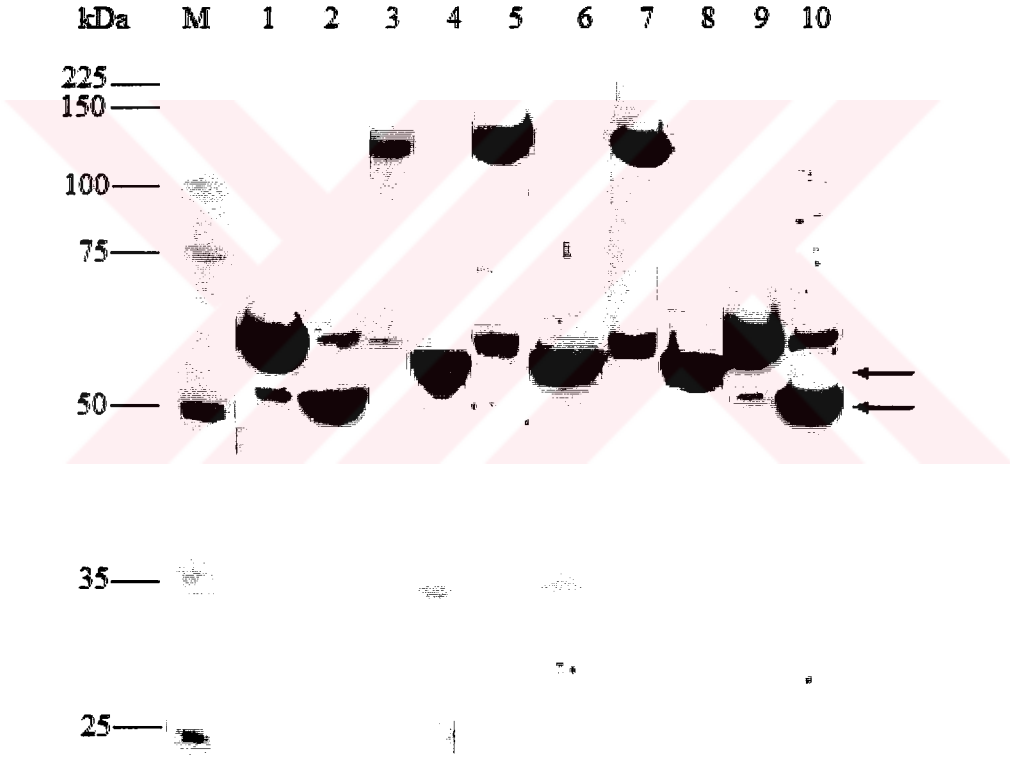
B. thuringiensis izolatlarının kristal proteinlerini tespit etmek için hazırlanan kristal-spor karışımları %10'luk SDS-PAGE'de analiz edildi (Şekil 18). BnBt ve MnÖ izolatlarında yaklaşık 65 ile 130 kDa'lık iki protein bandı, Mm2 izolatında yaklaşık 65 kDa'lık protein bandı, 6 numaralı izolatta yaklaşık 70 ve 130 kDa'lık protein bantları ve 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatlarda ise yaklaşık 130 kDa'lık protein bantları tespit edildi. Sadece bir (11 numaralı) izolatta kristal proteini tespit edilemedi.



Şekil 18. *B. thuringiensis* izolatlarının spor-kristal karışımlarının protein profilleri. 1) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 2) *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 3) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 4) BnBt izolatı, 5) MnÖ izolatı, 6) Mm2 izolatı, 7) 6 numaralı izolat, 8) 11 numaralı izolat, 9) 27 numaralı izolat, 10) 29 numaralı izolat, 11) 40 numaralı izolat, 12) 46 numaralı izolat, ok ile gösterilen bantlar kristal proteinlerdir

3.3.1.1. Kristal Proteinlerinin Tripsin ile Muamele Edilmesi

Kristallerin toksik olabilmesi için böcek bağırsağında tripsin benzeri proteazlarla parçalanıp aktif toksinlerin oluşması gerekir. Çözünmüş kristaller *in vitro* tripsin ile muamele edilerek tripsine dirençli peptidler elde edildi. Buna göre BnBt ve MnÖ izolatları yaklaşık 60 kDa'lık, Mm2 izolatu yaklaşık 50 kDa'lık, 27, 29 ve 46 numaralı izolatlar yaklaşık 65 kDa'lık ve 46 numaralı izolat 60 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluştuğu görüldü. 6 numaralı izolat ise yaklaşık 20-45 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluşturdu (Şekil 19, 20).



Şekil 19. Böceklerden izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarına ait çözünmüş kristallerin (1, 3, 5, 7) tripsin ile proteolizi (2, 4, 6, 8). *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (1, 2), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (3, 4), BnBt izolatu (5, 6), MnÖ izolatu (7, 8), Mm2 izolatu (9, 10), ok ile gösterilen bantlar tripsine dirençli peptidlerdir



Şekil 20. Topraktan izole edilen *B. thuringiensis* izolatlarına ait çözünmüş kristallerin (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) tripsin ile proteolizi (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16). *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (1, 2), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (3, 4), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (5, 6), 6 numaralı izolat (7, 8), 27 numaralı izolat (9,10), 29 numaralı izolat (11, 12), 40 numaralı izolat (13, 14), 46 numaralı izolat (15, 16), ok ile gösterilen bantlar tripsine dirençli peptidlerdir

3.4. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Testleri

B. thuringiensis izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılığı farklı olmaktadır. Yapılan antibiyotik testlerinin sonuçları Tablo 13’de görülmektedir. BnBt izolatı gentamisine dirençli iken diğer antibiyotiklere karşı hassastır. Ayrıca bütün izolatlar penisiline dirençli iken kloromfenikola hassastır.

4. İRDELEME

Böceklerin doğal düşmanları düşünüldüğünde bütün mikroorganizmalar arasında, *B. thuringiensis* önemli bir yer oluşturmaktadır. Günümüzde bu bakteriler ile ilgili ürünler mikrobiyal insektisidlerin yaklaşık %90'nını oluşturmaktadır (Wadman, 1997).

B. thuringiensis Gram-olumlu, spor oluşturan ve farklı habitatlarda yaşayabilen bir bakteridir (Goldberg ve Margalit, 1977; Heimpel, 1967; Martin ve Travers, 1989; Meadows vd., 1992; Smith ve Couche, 1991). Bu bakteri yakın ilişki içerisinde bulunduğu bakterilerden spor oluşumu esnasında ürettiği kristal yapıları sayesinde ayrılmaktadır. *B. thuringiensis* bakterisinin kristal proteinleri özellikle Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gruplarındaki böceklerle karşı toksik aktivite göstermektedir (Höfte ve Whiteley, 1989).

Tarım zararlılarına karşı kullanılmak üzere yeni insektisidal özelliklere sahip *B. thuringiensis* suşları izole edilmektedir. Bu çalışmada, yapılan ön denemeler sonucunda kristal ihtiva eden ve ISR-PCR sonuçlarına göre kontrol *B. thuringiensis*'lerle benzer bantlar oluşturan 6 tanesi toprak örneklerinden 3 tanesi böcekten izole edilen 9 *B. thuringiensis* izolatının fenotipik, moleküler ve kemotaksonomik karakterizasyonu yapıldı.

Karakterize edilen *B. thuringiensis* izolatlarının morfolojik şekli literatürde yer alan *B. thuringiensis* suşları ile benzerlik göstermektedir (Sneath, 1986). Fakat 11 numaralı izolat nutrient agar besiyerinde sarımtırak bir renk ve yuvarlak bir koloni oluşturmaktadır. Bu da mevcut *B. thuringiensis* izolatları ile uyuşmamaktadır. Iriarte ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada da *B. thuringiensis* izolatlarından birinin diğerinden farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Yapılan tarama elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda izolatlardan üç tanesinde (BnBt, MnÖ ve 27) bipiramidal ve kübik kristaller, üç tanesinde (29, 40 ve 46 numaralı izolatlar) bipiramidal kristaller, bir izolatta (6 numaralı izolat) küresel şekilli kristaller, bir izolatta (Mm2) düz kare kristaller ve bir izolatta (11 numaralı izolat) da düzensiz şekilli kristaller tespit edildi. Bipiramidal ihtiva eden izolatlar *cryI* genleri içeren *B. thuringiensis* izolatlarına benzemektedirler (Lereclus vd., 1993). *B. thuringiensis* suşlarının kristal şekilleri; kristal proteinleri, parasporal inklüzyonlarının çözünme şartları, tripsin-dirençli proteinlerin büyüklüğü, plazmit içerikleri, *cry* genleri ve toksik olma özellikleri ile ilişkilidir (Höfte ve Whiteley, 1989). Bernhard ve arkadaşları (1997) yaptığı

literatür çalışmalarında ilk tespit edilen *B. thuringiensis* izolatlarının bipiramidal kristaller içerdiğini ve bu izolatların Lepidoptera larvalarına karşı toksik olduğunu rapor etmişlerdir.

B. thuringiensis izolatlarının Intergenik 16S-23S ara bölgelerini tespit etmek için yapılan PCR sonuçlarına göre yaklaşık 300 bp'lik bantlar elde edildi. Bu sonuç Nalçacıoğlu ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışma ile uyusmaktadır. Bu sonuçlar mevcut izolatların *B. thuringiensis* olduklarını göstermektedir.

B. thuringiensis izolatlarının *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genlerinin varlığını tespit etmek için PCR çalışmaları yapıldı (Ben-Dov vd., 1997). Bu çalışmada, *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genlerinin korunan bölgelerine göre Ben-Dov ve arkadaşları (1997) tarafından tasarlanan primerler kullanıldı. *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genlerinin oluşturdukları fragmentlerin büyüklükleri Ben-Dov ve arkadaşlarının (1997) yaptığı çalışmadaki ile benzerlik göstermektedir (Tablo 7). BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı izolatlar *cry1* ve *cry2* geni, Mm2 izolatı *cry3* geni ve 6 numaralı izolatın *cry4* geni içerdiği tespit edildi (Şekil 15, 16). Bu izolatlar kontrol *B. thuringiensis*'ler ile aynı bantları oluşturdu. BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı *B. thuringiensis* izolatları *cry1* genleri içeren mevcut *B. thuringiensis* suşlarına benzemektedirler (Lereclus vd., 1993).

B. thuringiensis izolatlarının kristal-spor karışımlarındaki kristal proteinlerin varlığını belirlemek için SDS-PAGE'ler yapıldı. Şekil 18'de görülen sonuçlar *B. thuringiensis* izolatlarından sadece biri (11 numaralı) hariç diğerlerinin kristal proteinleri içerdikleri göstermektedir. BnBt ve MnÖ izolatlarında yaklaşık 65 ve 130 kDa'lık kristal proteinleri tespit edildi. Bu izolatların *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ile benzer protein bantları oluşturduğu görüldü (Lopez-Meza ve Ibarra, 1996). 6 numaralı izolat *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Lopez-Meza ve Ibarra, 1996) suşu ile, Mm2 izolatı *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Lopez-Meza ve Ibarra, 1996) izolatı ile benzer kristal proteinlerine sahiptir. 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatlarda yaklaşık 130 kDa'lık kristal proteinler belirlendi. Bu izolatlar Höfte ve Whiteley (1989) adlı araştırmacıların yaptığı çalışmada Cry1 ve Cry4A-Cry4B proteinleri için rapor edilenlere benzemektedirler. Sadece 11 numaralı izolatta kristal proteinler tespit edilemedi. Böyle bir sonuç Ohba ve arkadaşları (1987) tarafından rapor edildiği gibi kristallerin degradasyonundan kaynaklanmış olabilir.

29 numaralı izolatta PCR sonuçlarına göre *cry2* geni tespit edilmesine rağmen SDS-PAGE analizlerinde *cry2* geninin kodladığı 65 kDa'lık kristal proteini belirlenemedi. Bu sonuç Bobrowski ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada olduğu gibi

PCR ile *cry2* geni tespit edilen bir izolatta Cry2 proteinine SDS-PAGE analizde tespit edilememiştir. PCR ile belirlenen *cry2* geninin bu izolatta baskın olmadığı görülmektedir.

B. thuringiensis izolatlarından elde edilen kristal proteinlerinin tripsin ile proteolizi araştırıldı. Bu çalışmada böcek bağırsak proteazları tripsin benzeri enzimlere sahip olduğundan tripsin kullanıldı (Lilley vd., 1980). BnBt, MnÖ, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatların tripsin ile kesilmeleri sonucu 60-70 kDa arasında değişen Cry1 benzeri tripsine dirençli peptidler olduğu görüldü (Adang, 1991). Mm2 izolatının tripsin ile muamelesi sonucu yaklaşık 50 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluşturdu. Bu sonuçta Carroll ve arkadaşlarının (1989) yaptığı çalışmadakine benzemektedir. Diğer yandan 6 numaralı izolatın tripsin ile muamelesi sonucu yaklaşık 20 ile 45 kDa'lık tripsine dirençli peptidler tespit edildi.

B. thuringiensis izolatlarından biri hariç (11 numaralı izolat) diğerlerinde 4-8 arası plazmitler olduğu belirlendi. Literatürde büyük ve küçük plazmitlerin sayısı 2-11 arasında değişmektedir (Gonzalez vd., 1981). Büyüklükleri ise 2-272 kbp olmaktadır (Lereclus vd., 1993). İzolatların plazmit profilleri rapor edilen diğer *B. thuringiensis* suşları ile benzerlik göstermektedir (Gonzales ve Carlton, 1980). Bütün izolatların *cry* genlerinin büyük plazmitlerde olduğu düşünülmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalara göre *cry* genleri yaklaşık 40 kbp'lik büyük plazmitlerde bulunmaktadır (Lereclus vd., 1993). 11 numaralı izolatta bir tane 29,7 kbp ağırlığında plazmit tespit edildi. Muhtemelen bu izolatta diğer büyük plazmitlerin izole edilememe sebebi plazmit izolasyonu sırasında büyük plazmitlerin kırılmış olmasından olabilir ya da bu izolatın bazı biyokimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Porcar vd., 1999).

Bipiramidal kristaller ihtiva eden BnBt ve MnÖ izolatlarının Lepidoptera grubu *Malacosoma neustria* ve *Lymantria dispar* üzerinde 10 gün sonunda % 90-100'lere varan yüksek bir insektisidal etki tespit edildi. Diğer bipiramidal kristaller ihtiva eden *B. thuringiensis* suşlarının Lepidoptera grubu böcekler üzerinde etkili olması bekleniyordu. Çünkü bipiramidal kristalleri içeren *B. thuringiensis* suşlarının Lepidoptera grubu böcekler üzerinde insektisidal etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Lereclus vd., 1993). Ayrıca bipiramidal kristal ihtiva eden *B. thuringiensis* suşlarının kristal proteinlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık 130 kDa'dır. Bu da Cry1 proteinlerinki ile uyuşmaktadır (Höfte ve Whiteley, 1989). Aynı zamanda *B. thuringiensis* suşlarının kristallerinin çoğu ile karşılaştırıldığında, alkali şartlar altında benzer şekilde çözünme meydana gelmiştir. Lilley

ve arkadaşları (1980) kristal proteinlerin tripsin ile muamelesi sonucu 55-70 kDa'lık tripsine dirençli peptidler elde etmişlerdir.

Böceklerden izole edilen izolatlar ile yapılan bioassaylerde insektisidal etki tespit edilirken toprak izolatlarında herhangi bir insektisidal etki belirlenemedi. Böceklerden izole edilen izolatların böcekler üzerinde meydana getirdiği insektisidal etkinin sebebinin tripsine dirençli peptidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Toprakta izole edilen izolatların insektisidal aktiviteli olanlarının az sayıda olduğu rapor edilmiştir (Martin ve Travers, 1989; Ohba ve Aizawa, 1986; Ohba vd., 1988). Bazı izolatlarda toksik özelliğinin olmamasının sebebi kristal proteinlerinin tripsin bölgelerinin eksikliği ile ilgili de olabilmektedir (Pietrantonio ve Gill, 1992). Diğer bir görüşe göre de, bu izolatların kristal yapıları toksik olmayabilir. Bu yüzden de farklı gruplara ait çok sayıda böceğin bioassaylerini yapmak zaman kaybettirmektedir. Sonuçta kristaller hiçbir böcek üzerinde toksik etki göstermeyecektir. Nitekim, Martin ve Travers (1989) adlı araştırmacılar doğal ortamlardan izole edilen *B. thuringiensis* izolatların çoğunun toksik olmadığını rapor etmişlerdir. Yine de izolatların çoğunda insektisidal aktivitenin olmamasının sebebi tam olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak; BnBt ve MnÖ izolatları bipiramidal şekilli kristaller bulundurması, *cry1* ve *cry2* genleri içermesi, 65 ve 130 kDa'lık kristal proteinleri ihtiva etmesi ve bu kristallerin tripsin ile hidrolizi sonucu 60 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluşturması, benzer plazmit bantlarına ve benzer bioassay sonuçlarına sahip olması sebebiyle *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşuna benzemektedirler. Mm2 izolatın düz kare şekilli kristal göstermesi, *cry3* geni içermesi, 65 kDa'lık kristal proteini ihtiva etmesi ve kristal proteinin tripsin ile muamelesi sonucu yaklaşık 50 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluşturması, benzer plazmit bantları içermesi ve insektisidal özellikleri bakımından *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*'in bir suşu olma ihtimali çok yüksektir. 6 numaralı izolat küresel şekilli kristaller ihtiva etmesi, *cry4* geni içermesi, 70 ve 130 kDa'lık kristal proteinleri ihtiva etmesi, 20-45 kDa'lık tripsine dirençli peptidler oluşturması ve plazmit içeriklerinin benzer olması sebebiyle *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'in suşu olabileceği kanısına varıldı. 11, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatların ise yeni *B. thuringiensis* izolatları olabileceği düşünülmektedir (Tablo 14).

Tablo 14. Çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* izolatları ile kontrol *B. thuringiensis* izolatlarının karşılaştırılması

<i>B. thuringiensis</i> İzolatları	Lepidoptera										Coleoptera		Diptera		Benzedeği <i>B. thuringiensis</i> izolatı
	ISR-PCR (bp)	Koloni Rengi	Koloni şekli	Kristal şekli	cry genleri	Kristal Proteinleri (kDa)	Tripsin proteolizi	Plazmit sayısı	<i>Malacosoma neustria</i>	<i>Lymantria dispar</i>	<i>Hyphantria cunea</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Agelastica alni</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	
BnBt	300	K	D	Bp	cry1, cry2	65,130	60	7	100	90	50	-	-	-	Bt. <i>kurstaki</i>
MnÖ	300	K	D	Bp	cry1, cry2	65,130	60	7	100	100	50	-	-	-	Bt. <i>kurstaki</i>
Mm2	300	K	D	Dk	cry3	65	50	4	-	-	-	90	76	-	Bt. <i>tenebrionis</i>
6	300	K	D	k	cry4	70, 130	20-45	7	-	-	-	-	-	-	Bt. <i>israelensis</i>
11	300	S	Y	Ş	cry1, cry2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	Belirlenemedi
27	300	K	D	Bp	-	130	65	7	-	-	-	-	-	-	Belirlenemedi
29	300	K	D	Bp	cry1, cry2	130	65	5	-	-	-	-	-	-	Belirlenemedi
40	300	K	D	Bp	-	130	60	5	-	-	-	-	-	-	Belirlenemedi
46	300	K	D	Bp	-	130	65	7	-	-	-	-	-	-	Belirlenemedi
Bt <i>kurstaki</i>	300	K	D	Bp	cry1, cry2	65,130	60	8	100	100	77	-	-	-	Kontrol
Bt <i>israelensis</i>	300	K	D	k	cry4	70, 130	20-45	6	-	-	-	-	-	-	Kontrol
Bt <i>tenebrionis</i>	300	K	D	Dk	cry3	65	50	4	-	-	-	76	60	-	Kontrol

K: Krem S: Sarımtırak D: Dalgalı Y: Yuvarlak Bp: Bipiramidal Dk: Düz kübik k: küresel Ş: Şekilsiz -: Tespit edilemedi

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, 6 tanesi toprak örneklerinden 3 tanesi böcekten izole edilen 9 *B. thuringiensis* izolatının karakterizasyonu yapıldı. Buna göre;

1. Yapılan çalışmalar sonucunda, BnBt, MnÖ, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatlarda bipiramidal, Mm2 izolatında düz kare, 6 numaralı izolatta küresel ve 11 numaralı izolat ta ise şekilsiz kristaller tespit edildi.
2. PCR sonuçlarına göre BnBt, MnÖ, 11 ve 29 numaralı izolatlarda *cry1* ve *cry2* genleri tespit edildi. Mm2 izolatında *cry3*, 6 numaralı izolatta ise *cry4* geni bulundu.
3. Biri (11 numaralı izolat) hariç bütün izolatlarda SDS-PAGE analizlerinde yaklaşık 60-130 kDa'lık kristal proteinleri belirlendi. Tripsine dirençli peptidleri elde etmek için tripsine maruz bırakılan izolatlarda 50-65 kDa'lık peptidler tespit edildi.
4. BnBt ve MnÖ izolatların Lepidoptera grubuna ait *Malacosoma neustria*, *Lymantria dispar* ve *Hyphantria cunea* larvalarına, Mm2 izolatının *Leptinotarsa decemlineata* ve *Agelastica alni* larvalarına karşı insektisidal aktiviteleri tespit edildi.
5. Plazmit izolasyonu sonucu bir izolat (11 numaralı) hariç diğer izolatlarda 4-8 arası plazmit bantları görüldü. İzolatların hepsinde yaklaşık 3,8 kbp'lik büyük moleküler ağırlıklı plazmitler tespit edildi.
6. Bu izolatlardan BnBt ve MnÖ izolatlarının *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye, Mm2 izolatının *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* suşuna ve 6 numaralı izolatın *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* suşuna benzer oldukları tespit edildi.
7. 11, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatların yeni *B. thuringiensis* izolatları olabileceği düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

Karakterizasyonu yapılan *B. thuringiensis* izolatlarının özellikle de insektisidal aktivitesi yüksek olan BnBt, MnÖ ve Mm2 izolatlarının ileride mikrobiyal kontrol ajanı olarak geliştirilmeleri mümkün olabilecektir.

Bu izolatların H-serotiplendirilmesi yapılarak mevcut serotipler ile karşılaştırılması sonucu yeni serotipler literatüre kazandırılmış olacaktır. *cry1*, *cry2*, *cry3* ve *cry4* genleri tespit edilen izolatlarda spesifik *cry* primerleri kullanılarak alt sınıfların belirlenmesi veya yeni *cry* genlerinin araştırılması literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. İnsektisidal özelliği yüksek olan izolatların *cry* genlerinin *E. coli*'ye klonlanıp ekspresyon seviyelerini artırmak mümkün olabilir. *cry* genleri tespit edilen izolatların plazmitlerinde hibridizasyon yöntemiyle *cry* genlerinin mevcudiyeti aranabilir. İnsektisidal aktivitesi bulunmayan izolatların farklı böcekler üzerindeki etkileri araştırılabilir. 11, 27, 29, 40 ve 46 numaralı izolatların hangi *B. thuringiensis* izolatına benzer olduğunu anlamak için H-serotiplendirme yapılarak o grup suşlar ile karşılaştırılması gerekmektedir.

Ayrıca, bu tez çalışması *B. thuringiensis* karakterizasyonu ile ilgili yapılacak çalışmalarda yardımcı kaynak olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Adang, M.J., 1991. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: Gene Structure, Action and Utilization. In *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors* ed. Maramorosch, K., Boston: CRC Press, Pp. 3-24.
- Adang, M.J., Brody, M.S., Cardinau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.J., Jones, A., Okes, J.V. ve McBride, K.C., 1993. The Reconstitution and Expression of a *Bacillus thuringiensis* Cry III Gene in Protoplasts and Protoplasts, Plant Mol. Biol., 21, 1131-1145
- Akiba, Y., 1986. Microbial Ecology of *Bacillus thuringiensis*: VI. Germination of *Bacillus thuringiensis* Spores in the Soil, Appl. Entomol. Zool., 21, 76-80.
- Aly, C., 1985. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Spores in the Gut of *Aedes* larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 45, 1-8.
- Aly, C., Mulla, M.S. ve Federici B.A., 1985. Sporulation and Toxin Production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Cadavers of Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 46, 251-258.
- Angus, T.A., 1954. A Bacterial Toxin Paralyzing Silkworm Larvae, Nature (Lond), 173, 545-546.
- Angus, T.A., 1956. Association of Toxicity with Protein Crystalline Inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata, Can. J. Microbiol., 2, 122-131.
- Aoki, K. ve Chigasaki, Y., 1915. Ueber die Pathogenitat der Sog Sotto Bacillen (Ishawata) bei Seidenraupen. Mitt. Med. Fak Kais, Univ., Tokyo. 13, 419-440.
- Aptosoglou, S.G., Sivropoulou, A. ve Koliais, S.I., 1997. Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Strains and Isolates, Microbios, 91, 203-214.
- Aronson, A.I., 1993. Two Faces of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins and Post-Exponential Survival, Mol. Microbiol., 7, 489-496.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. ve Gresshoff, P.M., 1992. DNA Amplification Fingerprinting of Bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 70-76.
- Baum, J., 1994. Tn5401: A New Class II Transposable Element from *Bacillus thuringiensis*, J. Bacteriol., 176, 2835.

- Baum, J.A. ve Malvar, T., 1995. Regulation of Insecticidal Crystal Protein Production in *Bacillus thuringiensis*, Mol. Microbiol., 18, 1–12.
- Becker, N. ve Margalit, J., 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against Mosquitoes and Blackflies, p. 145-170. In P. F. Entwistle, P.F. Cory, J.S., M.J. Bailey, Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practise. J. Willey and Sons, New York, N.Y.
- Beegle, C.C., ve Yamamoto, T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124, 587-616.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. ve Margalith, Y., 1997. Extended Screening by PCR for Seven *cry*-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4883-4890.
- Berliner, E., 1911. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe, Z. Gesamte, Getreidewes, 3, 63-70.
- Berliner, E., 1915. About the Sleep Sickness of the *Ephestia kühniella* Zell and Its Vector *Bacillus thuringiensis*, Z. Angew. Entomol., 2, 29-56.
- Berhnard, K., Jarret, P., Meadows, M., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P. ve Burges, H.D., 1997. Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization and Activity against Insects Pests, J. Invertebr. Pathol., 70, 59-68.
- Bobrowski, V.L., Pasquali, G.B.M.H., Pinto, L.M.N. ve Fiuza, L.M., 2002. Characterization of Two *Bacillus thuringiensis* Isolates from South Brazil and Their Toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), Biol. Control, 25, 129-135.
- Borisova, S., Grochulski, P., Van Faassen, H., Pusztai-Carey, M., Masson, L. ve Cygler, M., 1994. Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of the Lepidopteran-Specific Insecticidal Crystal Protein Cry1A(a), J. Mol. Biol., 243, 530.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Bravo, A, Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F.J., Pena, G., Nunez-Valdez, M-E., Soberón, M. ve Quintero, R., 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4965-4972.
- Brousseau, R., Saint-Onge, A., Prefontaine, G., Mason, L. ve Cabana, J., 1993. Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction, a Powerful Method to Identify *Bacillus thuringiensis* Serovars and Strains, Appl. Environ. Microbiol., 59, 114-119.

- Burges, H.D. ve Hurst, J.A., 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in Strobe Moths, J. Invertebr. Pathol., 30, 131-139.
- Cannon, R.J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* Use in Agriculture: A Molecular Perspective, Biol. Rev., 71, 561-636.
- Carlson, C.R., Cagant, D.A. ve Kolsto, A.B., 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1719-1725.
- Carlton, B., 1988. Development of Genetically Improved Strains of *Bacillus thuringiensis*. IN: Biotechnology for Crop Protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.). American Chemical Society, Washington, D.C., 260-279.
- Carlton, B.C., 1996. Development and Commercialization of New and Improved Biopesticides, Ann. New York Acad. Sc., 792, 154.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. ve Koziel, M.G., 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles, Appl. Environ. Microbiol., 57, 3057-3061.
- Carroll, J., Li, J. ve Ellar, D.J., 1989. Proteolytic Processing of Coleopteran Specific δ -endotoxin Produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, Biochem. J., 261, 99-105.
- CDMS., 1998. "Crop Data Management Systems." <http://www.cdms.net/manuf/manuf.asp>, 12/10/1998.
- CEPA/DPR., 1998. "USEPA/OPP Pesticide Products Database." <http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/m2.htm>, 12/10/1998.
- Chaufaux, J., Marchal, M., Gilois, N., Jehanno, I. ve Buisson, C., 1997. Investigation of Natural Strains of *Bacillus thuringiensis* in Different Biotopes throughout the World, Can. J. Microbiol., 43, 337-343.
- Copping, L.G. (ed.), 1998. The Biopestiticide Manual, British Crop Protection Council, Franham, Surrey, U.K.
- Cooksey, K.E., 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and Mode of Action. In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (ed.), Microbial Control of Insects and Mites. New York, London, Academic Press Inc., pp 247-274.
- Cody, V., Luft, J.E., Pangborn, W., ve English, L., 1992. Purification and Crystallization of Insecticidal δ -endotoxin CryIIIB2 from *Bacillus thuringiensis*, Proteins: Struct. Funct. Genet., 14, 324.
- CPCR., 1998. "Crop Protection Chemicals Reference." <http://www.greenbook.net/welcome.htm>, 12/10/1998.

- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. ve D.H. Dean., 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 807-813
- Daffonchio, D., Borin, S., Frova, G., Manachini, P.L. ve Sorlini, C., 1998. PCR Fingerprinting of Whole Genomes: The Spacers between The 16S-23S rRNA Genes of Intergenic tRNA Gene Regions Reveal a Different Intraspecific Genomic Variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 107-116.
- de Barjac, H. ve Bonnefoi, A., 1962. Essai de Classification Biochimique et Sérologique de 24 Souches de *Bacillus* de Type *thuringiensis*, Entomophaga, 7, 5-31.
- de Barjac, H., 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., pp 35-43.
- de Barjac, H. ve Frachon, E., 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains, Entomophaga, 35, 233-240
- DeLucca, A.J. II, Simonson, J.G. ve Larson, A.D., 1979. Two New Serovars of *Bacillus thuringiensis*: serovars *dakota* and *indiana* (serovars 15 and 16), J. Invertebr. Pathol., 34, 323-324.
- DeLucca, A.J. II, Simonson, J.G. ve Larson, A.D., 1981. *Bacillus thuringiensis* Distribution in Soils of the United States, Can. J. Microbiol., 27, 865-870.
- DeLucca, A.J. II, Palmgren, M.S. ve de Barjac, H., 1984. A New Serovar of *Bacillus thuringiensis* from Grain Dust: *Bacillus thuringiensis* serovar *colmeri* (serovar 21), J. Invertebr. Pathol., 43, 437-438.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. ve Vanrie, J., 1997. Cloning and Characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* Midgut Aminopeptidase N Enzymes Related to *Bacillus thuringiensis* Toxin-Binding Proteins, Eur. J. Biochem., 248: 748-761.
- Donovan, W.P., Rupa, M.J., Slaney, A.C., Malvar, T., Gawron-Burke, M.C. ve Johnson, T.B., 1992. Characterization of Two Genes Encoding *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins Toxic to Coleopteran Species, Appl. Environ. Microbiol., 58, 3921-3927.
- Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, J. Invertebr. Pathol., 15, 232-239.
- Fast, P.G., 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., pp 223-248.

- Faust, R. M., Spizizen, J., Cage, V., ve Travers, R. S., 1979. Extrachromosomal DNA in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *finitimus*, var. *sotto*, and in *Bacillus popilliae*, J. Invertebr. Pathol., 33, 232-238.
- Feitelson, J.S., Payne, J. ve Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond, Bio/Technology, 10, 271-275.
- Feitelson, J.S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, p. 63-71. In Kim, L. (ed.), *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y.
- Ferrandis, M.D., Andrew, R., Porcar, M., Iriarte, J., Dumanoir, V.C., Lecadet, M-M., Caballero, P. ve Ferre, J., 1999. Characterization of *Bacillus thuringiensis* serovar *bolivia* (serotype H63), a Novel Serovar Isolated from the Bolivian High Valleys, Lett. Appl. Microbiol., 87, 640-648.
- Goldberg, L.J. ve Margalit, J., 1977. A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*, Mosq. News, 37, 355-358.
- González, J.M. Jr. ve Carlton, B.C., 1980. Patterns of Plasmid DNA in Crystalliferous and AcrySTALLIFEROUS Strains of *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 3, 92-98.
- Gonzales, J.M. Jr., Dulmage, H.T. ve Carlton, B.C., 1981. Correlation between Specific Plasmids and δ -endotoxin Production in *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 5, 351-365.
- González, J.M. Jr., Brown, B.J. ve Carlton, B.C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* Plasmids Coding for δ -endotoxin among Strains of *B. thuringiensis* and *B. Cereus*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79, 6951-6955.
- Grassi, S. ve Deseö, K.V., 1984. [The Natural Occurrence of *Bacillus thuringiensis* Berl. and Its Importance in the Plant Protection.] In: [Proceedings of Seminar on Phytopathology, Sorrento, Italy, 26-29 March 1984.] Bologna, Italy, Clueb Publishing Co., 2, 424-433.
- Gray, M.W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA, Nucleic Acids Res., 12, 5837-5852.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. ve Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation, J. Mol. Biol., 254, 447-464.
- Hadrys, H., Balick, M. ve Schierwater, B., 1992. Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology, Mol. Ecol., 1, 55-63.
- Hannay, C.L., 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Sporeforming Bacteria, Nature, 172, 1004.

- Hannay, C.L. ve Fitz-James, P.C., 1955. The Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner, Can. J. Microbiol., 1, 694.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* Ecology and Environmental Effects of its Use for Microbial Pest Control (Environmental Project No. 316). Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, J. Invertebr. Pathol., 71, 106-114.
- Hastowo, S., Lay, B. W. ve Ohba, M., 1992. Naturally Occuring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia, J. Appl. Bacteriol., 73, 108-113.
- Heimpel, A. M. ve Angus, T.A., 1958. The Taxonomy of Insect Pathogens Related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland, Can. J. Microbiol., 4, 531-541.
- Heimpel, A.M., 1967. A Toxonomic Key Proposed for the Species of "Crystalliferous" Bacteria. J. Invertebr. Pathol., 9, 364-375.
- Hernstadt, C., Soares, G.C., Wilcox, E.R. ve Edwards, D.L., 1986. A New Strain of *Bacillus thuringiensis* with Activity against Coleopteran Insects, Bio/Technology, 4, 305-308.
- Hernstadt, C., Gilroy, T.E., Solesk, D.A., Bennet, B.D. ve Gautner, F.H., 1987. Nucleotide Sequence and Deduced Amino Acid Sequence of a Coleopteran Active δ -endotoxin Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sandiego*, Gene, 57, 81-116.
- Höfte, H. ve Whiteley HR., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rev., 53, 242-255.
- Honee, G., Vrizen, W. ve Visser, B., 1990. Translation Fusion Product of Two Different Insecticidal Crystal Protein Genes of *Bacillus thuringiensis* Exhibits an Enlarged Insecticidal Spectrum, Appl. Environ. Microbiol., 56, 823.
- Huber, H.E. ve Lüthy, P., 1981. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: Composition and Activation. In: Davidson, E.W. (ed.), Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Totowa, New Jersey, Allanheld-Osmun Publishers, pp 209-234.
- Hurley, J.M., Lee, S.G.L., Andrews, R.E. Jr., Khowder, M.J. ve Bulla, L.A. Jr., 1985. Separation of the Cytolytic and Mosquitocidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 961-965.
- Iriarte, J., Dumanoir, V.C., Bel, Y., Porcar, M., Ferrandis, M.D., Lecadet, M-M., Ferre, J. ve Caballero, P., 2000. Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (Serotype H48) and ser. *navarrensis* (Serotype 50): Two Novel Serovars Isolated in Spain, Curr. Microbiol., 40, 17-22.

- Ishiwata, S., 1901. On a Kind of Severe Flacherie (sotto disease), Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.
- Jarrett, P. ve Stephenson, M., 1990. Plasmid Transfer between Strains of *Bacillus thuringiensis* Infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1608-1614.
- Jensen, G.B., Wilcks, A., Petersen, S.S., Damgaard, J., Baum, J.A. ve Andrup, L., 1995. The Genetic Basis of the Aggregation System in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Is Located on the Large Conjugative Plasmid pXO16, J. Bacteriol., 177, 2914-2917.
- Juarez-Perez, V.M., Ferrandis, M.D. ve Frutos, R., 1997. PCR-based Approach for Detection of Novel *Bacillus thuringiensis* cry Genes, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2997-3002.
- Kaelin, P., Morel, P. ve Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.), Appl. Environ. Microbiol., 60, 19-25.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineaux, I. ve Khorana, H.G., 1971. Studies on Polynucleotides. XCVI. Repair Replications of Short Synthetic DNA's Catalyzed by DNA Polymerases, J. Mol. Biol., 56, 341-361.
- Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. ve Schnetter, W., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a New Pathotype Effective against Larvae of Coleoptera, Z. Angew. Entomol., 96, 5, 500-508.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -endotoxin, In *Advances in Insect Physiology*, Volume 24. Evans, P.D. (ed.), pp. 275-308. Academic Press, London.
- Koziel, M.G., Carozzi, N.B., Currier, T.C., Warren, G.W., ve Evola, S.V., 1993. The Insecticidal Crystal Proteins from *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future Uses, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 11, 171.
- Kronstad, J.W., Schnepf H.E. ve Whiteley, H.R., 1983. Diversity of Locations for *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Genes, J. Bact., 154, 419-428.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lambert, B., Theunis W., Ageda K.R., Van Audenhove K., Dewell K.C., Janssens S., Seurin K.J. ve Peferoen M., 1992. Nucleotide Sequence of Gene cry III D Encoding a Novel Coleopteran-Active Crystal Protein from Strain BT109p of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Gene, 110, 131-132.

- Lecadet, M-M., Lereclus, D., Blondel, M.O. ve Ribier, J., 1981. *Bacillus thuringiensis*: Studies on Chromosomal and Extrachromosomal DNA. In Levinson, H.S., A.L. Sonenshein, Tipper, D.J. (ed.), Sporulation and Germination. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüss, B.M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B. ve Scherer, S., 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. Nov. Is a New Psychrotolerant Species of the *Bacillus cereus* group, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1373-1382.
- Lee, S.G., Eckbald, W. ve Bulla, L.A., 1985. Diversity of Protein Inclusion Bodies and Identification of Mosquitocidal Protein in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 126, 953-960.
- Lee, H.H., Lee J.A., Lee K.Y., Chung J.D., de Barjac H., Charles J.F., Dumanoir V.C, ve Franchon, E., 1994. New Serovars of *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis* ser. *coreanensis* (serotype H25), *B. thuringiensis* ser. *leesis* (serotype H33), and *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (serotype H34), J. Invertebr. Pathol., 63, 217-219.
- Lereclus, D., Lecadet, M-M., Riber, J. ve Dedonder, R., 1982. Molecular Relationships among Plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved Sequences through 11 Crystalliferous Strains, Mol. Gen. Genet., 186, 391-398.
- Lereclus, D., Delecluse, A. ve Lecadet, M-M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practise. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., pp 37-70.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. ve Chaufaux, J., 1995. Over Production of Encapsulated Insecticidal Crystal Proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spOA* Mutant, Bio/Technology, 13, 67-71.
- Li, J., Carroll, J. ve Ellar, D.J., 1991. Crystal Structure of the Insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution, Nature, 353, 815-821.
- Lilley, M., Ruffell, R.N. ve Somerville, H.J., 1980. Purification of the Insecticidal Toxin in Crystals of *Bacillus thuringiensis*, J. Gen. Microbiol., 118, 11.
- Lopez-Meza ve Ibarra, J.E. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 1306-1310.
- Lüthy, P. ve Ebersold, H.R., 1981. The Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*, Pharmacol. Ther., 13, 257-283.
- Lüthy, P. Cordies, J.C. ve Fischer, H.M., 1982. *Bacillus thuringiensis* as a Bacterial Insecticide: Basic Considerations and Application. In: Kurstak, E. (ed.), Microbial and Viral Pesticides. New York: Marcel Dekker, pp 35-74.

- Lynch, M.J. ve Baumann, P., 1985. Immunological Comparisons of the Crystal Protein from Strains of *Bacillus thuringiensis*, J. Invert. Pathol., 46, 47-57.
- Mahillon, J., Resohazy, R., Hallet, B. ve Delcour, J., 1994. IS231 and Other *Bacillus thuringiensis* Transposable Elements: a Review, Genetica, 93, 13-26.
- Martin, P.A.W. ve Travers, R.S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2437-2442.
- Mattes, O., 1927. Parasitare Krankheiten der Mehmotten Larven und Versuche uber ihre Verwendbarkeit als Biologisches Bekämpfungsmittel. Gesell. F. Beford., Ges. Naturw. Sitzber., Marburg, 62, 381-417.
- McClelland, M. ve Welsh, J., 1994. DNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed PCR, PCR Methods Appl., 4, S59-S65.
- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. ve Burges, H.D., 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1344-1350
- Meadows, M.P., 1993. *Bacillus thuringiensis* in the Environment: Ecology and Risk Assessment. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice. Chichester, New York, Toronto, Wiley & Sons, pp 193-220.
- Molloy, D., 1990. Progress in the Biological Control of Blackflies with *Bacillus thuringiensis*, with Emphasis on Temperate Elimates. In: de Barjac, H., Sutherland, D.J. (eds.), *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*. New Brunswick: Rutgers University Press, pp 161-186.
- Mulla, M.S., 1990. Activity, Field Efficacy, and Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against Mosquitoes. In: de Barjac, H., Sutherland, D.J. (eds.), *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*. New Brunswick: Rutgers University Press, pp 134-160.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. ve Tenover, R.H., 1995. *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 6. ASM, Washington, DC.
- Nakamura, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycoloides* sp., Nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1031-1035.
- Nalçacıoğlu, R. Yaman, M., Dulger, S., Beldüz, A.O. ve Demirbağ, Z., 2002. Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Hazelnut Fields in Turkey, Fresen. Environ. Bull., 11, 337-341.

- Narva, K.E., Payne, J.M., Schwab, G.E., Hickie, L.A., Galasan, T. ve Sick, A.J., 1991. Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active against Nematodes, and Genes Encoding Novel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates: European Patent Application EP0462 721A2. Munich, Germany, European Patent Office.
- Norris, J.R., 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and Physical Structure. In: Burges, H.D., Mussey, N.W. (ed.), Microbial Control of Insects and Mites. New York, London, Academic Press Inc, pp 229-246.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, No:8 (1. Baskı) Isparta, 98-101s.
- Ohba, M., Yu, Y.M. ve Aizawa, K., 1988. Occurrence of Non-Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Flagellar Serotype 14 in the Soil in Japan. Syst. Appl. Microbiol., 11, 85-89.
- Ohba, M. ve Aizawa, K., 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Soils of Japan, J. Invertebr. Pathol., 47, 277-282.
- Ohba, M., Yu, Y.M. ve Aizawa, K., 1987. Non-toxic Isolates of *Bacillus thuringiensis* Producing Parasporal Inclusions with Unusual Protein Components, Lett. Appl. Microbiol., 5, 29-32.
- Pietrantonio, P.V. ve Gill, S.S. 1992. The Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongiensis*: Characterization and Screening for Insecticidal Activity, J. Invertebr. Pathol., 59, 295-302.
- Prasertphon, S., Areekul, P. ve Tanada, Y., 1973. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in Host Cadavers, J. Invertebr. Pathol., 21, 205-207.
- Prefontaine, G., Fast, P., Lau, P.C.K., Hefford, M.A., Hanna, Z. ve Brousseau, R., 1987. Use of Oligonucleotide Probes to Study the Relatedness of δ -endotoxin Genes among *Bacillus thuringiensis* Subspecies and Strains, Appl. Environ. Microbiol., 53, 2808-2814.
- Porcar, M., Iriarte, J., Dumanoir, V.C., Ferrandis, M.D., Lecadet, M-M., Ferre, J. ve Caballero, P., 1999. Identification and Characterization of the New *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59), J. Appl. Microbiol., 87, 640-648.
- Porcar, M. ve Juarez-Perez, V., 2003. PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes, FEMS Microbiol. Rev., 26, 419-432.
- Rajamohan, F., Lee, M.K. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, vol. 60. Academic Press, New York, N.Y.

- Reddy, A., Battisti, L. ve Thorne, C.B., 1987. Identification of Self-Transmissible Plasmids in Four *Bacillus thuringiensis* Subspecies, J. Bacteriol., 169, 5263-5270.
- Riffard, S., 1998. Species Identification of *Legionella* Via Intergenic 16S-23S Ribosomal Spacer PCR Analysis, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 723-730.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. ve Erlich, H.A., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, Science, 239, 487-489.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 775-806.
- Sekar, I. ve Carlton, B.C., 1985. Molecular Cloning of the δ -endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Gene, 33, 151-158.
- Serez, M., 2003. Böcekler Bildiğiniz Gibi Değil. <http://www.evrensel.net/03/01/28/toplum.html#2>, 28 Ocak 2003.
- Sharif, F.A. ve Alaeddinoglu, N.G., 1988. A Rapid and Simple Method for Staining of the Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*, J. Indust. Microbiol., 3, 227-229.
- Shevelev, A.B., Lewitin, E., Novikova, S.I., Wojciechowska, Y.A.A., Usacheva, E.A., Chestukhina, G.G. ve Stepanov, V.M., 1998. A New PCR-Based Approach to a Fast Search of a Wide Spectrum of *cry* Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains, Biochem. Mol. Biol. Int., 45, 1265-1271.
- Smedley, D.P. ve Ellar, D.J., 1996. Mutagenesis of 3 Surface-Exposed Loops of a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Reveals Residues Important for Toxicity, Recognition and Possibly Membrane Insertion, Microbiology, 142, 1617-1624.
- Smith, R.A. ve Couche, G.A., 1991. The Phyllophane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants, Appl. Environ. Microbiol., 57, 311-315.
- Sneath, P.H.A., 1986. Sporeforming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Butler, J.P. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 1104-1207.
- Tailor, L.R., Tippet, J., Gibb, G., Ells, S., Pike, D., Jordan, L. ve Ely, S., 1992. Identification and Characterisation of a Novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae, Mol. Microbiol., 6, 1211-1217.
- Tanada, Y. ve Kaya, H.K., 1993. Insect Pathology, Academic Pres, San Diego.

- Thomas, W.E. ve Ellar, D.J., 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Crystal δ -endotoxin: Effects on Insect and Mammalian Cells *in vitro* and *in vivo*, J. Cell Sci., 60, 181-197.
- Thompson, M.A., Schnepf, H.E. ve Feitelson, J.S., 1995. Structure, Function and Engineering of *Bacillus thuringiensis* Toxins, in: Setlow, J.K. (ed.), Genetic Engineering: Principles and Methods, vol. 17, Plenum Press, New York, pp. 99-117.
- Travers, R.S., Martin, P.A.W. ve Reichelderfer, C.F., 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp., Appl. Environ. Microbiol., 53, 1263-1266.
- Turnbull, P., Kramer, J. ve Melling, J., 1990. *Bacillus*. In: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Vol. 2, Systematic Bacteriology, 8th edn. Parker, M.T. Duerden, B.I., (eds.), pp. 187-210. Edward Arnold, London.
- URL-1, www.bioc.cam.ac.uk/UTOs/Ellar.html, Prof. David J. Ellar, 09 Mayıs 2002.
- URL-2, www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm, *Bacillus thuringiensis*, 22 Haziran 2002.
- URL-3, www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, δ -Endotoksinlerin Tam Listesi, 03 Ağustos 2003.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. ve Van Mellaert, H., 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-Gut of Target Insects, Eur. J. Biochem., 186, 239-247.
- Visser, B., Bosch, D. ve Honée, G., 1993. Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Pesticide: Theory and Practice. Chichester, New York, Toronto, Wiley and Sons, pp 71-88.
- Wadman, M., 1997. Dispute over Insect Resistance to Crops, Nature, 388-817.
- Waheed, I.B. ve Kogan, M., 2003. Integrated Plant Protection Center (IPPC) Oregon State University, Corvallis. *Bacillus thuringiensis*-Based Biological Control of Insect Pests. <http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt>, 20/08/2003.
- Welsh, J. ve McClelland, M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, Nucleic Acids Res., 18, 1713-1718.
- Wider, W.R. ve Whitely, K.H.R., 1990. Two Highly Related Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Possess Different Host Range Specificities, J. Bacteriol., 72, 965-974.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.

Zukowski, K., 1995. Laboratory Examination of the Effectiveness of New Biological Preparations for Reducing Populations of Cockroaches (*Blattella germanica* L.), Rocz. Panstw. Zakl. Hig., 46, 293-297.



EKLER

Ek Tablo 1. *B. thuringiensis* suşlarının kristal proteinleri (URL-3, 2003).

Adı	Acc No.	Yazarlar	Yıl	Kaynak Suş
Cry1Aa1	M11250	Schnepf vd.,	1985	Bt kurstaki HD1
Cry1Aa2	M10917	Shibano vd.,	1985	Bt sotto
Cry1Aa3	D00348	Shimizu vd.,	1988	Bt aizawai IPL7
Cry1Aa4	X13535	Masson vd.,	1989	Bt entomocidus
Cry1Aa5	D17518	Udayasuriyan vd.,	1994	Bt Fu-2-7
Cry1Aa6	U43605	Masson vd.,	1994	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Aa7	AF081790	Osman vd.,	1999	Bt C12
Cry1Aa8	I26149	Liu	1996	
Cry1Aa9	AB026261	Nagamatsu vd.,	1999	Bt dendrolimus T84A1
Cry1Aa10	AF154676	Hou ve Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02
Cry1Aa11	Y09663	Tounsi vd.,	1999	Bt kurstaki
Cry1Aa12	AF384211	Yao vd.,	2001	Bt Ly30
Cry1Aa13	AF510713	Zhong vd.,	2002	Bt sotto
Cry1Aa14	AY197341	Yingbo vd.,	2002	unpublished
Cry1Ab1	M13898	Wabiko vd.,	1986	Bt berliner 1715
Cry1Ab2	M12661	Thorne vd.,	1986	Bt kurstaki
Cry1Ab3	M15271	Geiser vd.,	1986	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab4	D00117	Kondo vd.,	1987	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab5	X04698	Hofte vd.,	1986	Bt berliner 1715
Cry1Ab6	M37263	Hefford vd.,	1987	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Ab7	X13233	Haider ve Ellar	1988	Bt aizawai IC1
Cry1Ab8	M16463	Oeda vd.,	1987	Bt aizawai IPL7
Cry1Ab9	X54939	Chak ve Jen	1993	Bt aizawai HD133
Cry1Ab10	A29125	Fischhoff vd.,	1987	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab11	I12419	Ely ve Tippet	1995	Bt A20
Cry1Ab12	AF059670	Silva-Werneck vd.,	1998	Bt kurstaki S93
Cry1Ab13	AF254640	Tan vd.,	2002	Bt c005
Cry1Ab14	U94191	Meza-Basso ve Theoduloz	2000	Native Chilean Bt
Cry1Ab15	AF358861	Li, Zhang vd.,	2001	Bt B-Hm-16
Cry1Ab16	AF375608	Yu vd.,	2002	Bt AC-11
Cry1Ab-like	AF327924	Nagarathinam vd.,	2001	Bt kunthala RX24
Cry1Ab-like	AF327925	Nagarathinam vd.,	2001	Bt kunthala RX28

Cry1Ab-like	AF327926	Nagarathinam vd.,	2001	Bt kunthala RX27
Cry1Ac1	M11068	Adang vd.,	1985	Bt kurstaki HD73
Cry1Ac2	M35524	Von Tersch vd.,	1991	Bt kenya
Cry1Ac3	X54159	Dardenne vd.,	1990	Bt BTS89A
Cry1Ac4	M73249	Payne vd.,	1991	Bt kurstaki PS85A1
Cry1Ac5	M73248	Payne vd.,	1992	Bt kurstaki PS81GG
Cry1Ac6	U43606	Masson vd.,	1994	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Ac7	U87793	Herrera vd.,	1994	Bt kurstaki HD73
Cry1Ac8	U87397	Omolo vd.,	1997	Bt kurstaki HD73
Cry1Ac9	U89872	Gleave vd.,	1992	Bt DSIR732
Cry1Ac10	AJ002514	Sun ve Yu	1997	Bt kurstaki YBT-1520
Cry1Ac11	AJ130970	Makhdoom ve Riazuddin	1998	
Cry1Ac12	I12418	Ely ve Tippet	1995	Bt A20
Cry1Ac13	AF148644	Qiao vd.,	1999	Bt kurstaki HD1
Cry1Ac14	AF492767	Yao vd.,	2002	Bt Ly30
Cry1Ac15	AY122057	Tzeng vd.,	2001	Bt from Taiwan
Cry1Ad1	M73250	Payne ve Sick	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Ad2	A27531		1995	Bt PS81RR1
Cry1Ae1	M65252	Lee ve Aronson	1991	Bt aletsi
Cry1Af1	U82003	Kang vd.,	1997	Bt NT0423
Cry1Ag1	AF081248	Mustafa	1999	
Cry1Ah1	AF281866	Tan vd.,	2000	
Cry1Ai1	AY174873	Wang vd.,	2002	
Cry1A-like	AF327927	Nagarathinam vd.,	2001	Bt kunthala nags3
Cry1Ba1	X06711	Brizzard ve Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2
Cry1Ba2	X95704	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110
Cry1Ba3	AF368257	Zhang vd.,	2001	
Cry1Ba4	AF363025	Mat Isa vd.,	2001	Bt entomocidus HD9
Cry1Bb1	L32020	Donovan vd.,	1994	Bt EG5847
Cry1Bc1	Z46442	Bishop vd.,	1994	Bt morrisoni
Cry1Bd1	U70726	Kuo vd.,	2000	Bt wuhanensis HD525
Cry1Bd2	AY138457	Isakova vd.,	2002	Bt 834
Cry1Be1	AF077326	Payne vd.,	1998	Bt PS158C2
Cry1Bf1	AX189649	Arnaut vd.,	2001	
Cry1Bg1	AY176063	Wang vd.,	2002	
Cry1Ca1	X07518	Honee vd.,	1988	Bt entomocidus 60.5
Cry1Ca2	X13620	Sanchis vd.,	1989	Bt aizawai 7.29
Cry1Ca3	M73251	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Ca4	A27642	Van Mellaert vd.,	1990	Bt entomocidus HD110
Cry1Ca5	X96682	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29

Cry1Ca6 [1]	AF215647	Yu vd.,	2000	Bt AF-2
Cry1Ca7	AY015492	Aixing vd.,	2000	
Cry1Ca8	AF362020	Chen vd.,	2001	
Cry1Cb1	M97880	Kalman vd.,	1993	Bt galleriae HD29
Cry1Cb2	AY007686	Song vd.,	2000	
Cry1Da1	X54160	Hofte vd.,	1990	Bt aizawai HD68
Cry1Da2	I76415	Payne ve Sick	1997	
Cry1Db1	Z22511	Lambert	1993	Bt BTS00349A
Cry1Db2	AF358862	Li vd.,	2001	Bt B-Pr-88
Cry1Ea1	X53985	Visser vd.,	1990	Bt kenyae 4F1
Cry1Ea2	X56144	Bosse vd.,	1990	Bt kenyae
Cry1Ea3	M73252	Payne ve Sick	1991	Bt kenyae PS81F
Cry1Ea4	U94323	Barboza-Corona vd.,	1998	Bt kenyae LBIT-147
Cry1Ea5	A15535	Botterman vd.,	1994	
Cry1Ea6	AF202531	Sun vd.,	1999	
Cry1Eb1	M73253	Payne ve Sick	1993	Bt aizawai PS81A2
Cry1Fa1	M63897	Chambers vd.,	1991	Bt aizawai EG6346
Cry1Fa2	M73254	Payne ve Sick	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Fb1	Z22512	Lambert	1993	Bt BTS00349A
Cry1Fb2	AB012288	Masuda ve Asano	1998	Bt morrisoni INA67
Cry1Fb3	AF062350	Song ve Zhang	1998	Bt morrisoni
Cry1Fb4	I73895	Payne vd.,	1997	
Cry1Fb5	AF336114	Li vd.,	2001	Bt B-Pr-88
Cry1Ga1	Z22510	Lambert	1993	Bt BTS0349A
Cry1Ga2	Y09326	Shevelev vd.,	1997	Bt wuhanensis
Cry1Gb1	U70725	Kuo ve Chak	1999	Bt wuhanensis HD525
Cry1Gb2	AF288683	Li vd.,	2000	Bt B-Pr-88
Cry1Ha1	Z22513	Lambert	1993	Bt BTS02069AA
Cry1Hb1	U35780	Koo vd.,	1995	Bt morrisoni BF190
Cry1H-like	AF182196	Srifah vd.,	1999	Bt JC291
Cry1Ia1	X62821	Tailor vd.,	1992	Bt kurstaki
Cry1Ia2	M98544	Gleave vd.,	1993	Bt kurstaki
Cry1Ia3	L36338	Shin vd.,	1995	Bt kurstaki HD1
Cry1Ia4	L49391	Kostichka vd.,	1996	Bt AB88
Cry1Ia5	Y08920	Selvapandiyan	1996	Bt 61
Cry1Ia6	AF076953	Zhong vd.,	1998	Bt kurstaki S101
Cry1Ia7	AF278797	Porcar	2000	Bt
Cry1Ia8	AF373207	Song vd.,	2001	
Cry1Ia9	AF521013	Yao vd.,	2002	Bt Ly30
Cry1Ia10	AY262167	Espindola	2003	Bt thuringiensis

Cry1Ia1	AJ315121	Tounsi	2003	Bt kurstaki BNS3
Cry1Ib1	U07642	Shin vd.,	1995	Bt entomocidus BP465
Cry1Ic1	AF056933	Osman vd.,	1998	Bt C18
Cry1Ic2	AAE71691	Osman vd.,	2001	
Cry1Id1	AF047579	Choi	2000	
Cry1Ie1	AF211190	Song vd.,	2000	Bt BTC007
Cry1I-like	I90732	Payne vd.,	1998	
Cry1Ja1	L32019	Donovan vd.,	1994	Bt EG5847
Cry1Jb1	U31527	Von Tersch ve Gonzalez	1994	Bt EG5092
Cry1Jc1	I90730	Payne vd.,	1998	
Cry1Jd1	AX189651	Arnaut vd.,	2001	
Cry1Ka1	U28801	Koo vd.,	1995	Bt morrisoni BF190
Cry1-like	I90729	Payne vd.,	1998	
Cry2Aa1	M31738	Donovan vd.,	1989	Bt kurstaki
Cry2Aa2	M23723	Widner ve Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
Cry2Aa3	D86064	Sasaki vd.,	1997	Bt sotto
Cry2Aa4	AF047038	Misra vd.,	1998	Bt kenya HD549
Cry2Aa5	AJ132464	Yu ve Pang	1999	Bt SL39
Cry2Aa6	AJ132465	Yu ve Pang	1999	Bt YZ71
Cry2Aa7	AJ132463	Yu ve Pang	1999	Bt CY29
Cry2Aa8	AF252262	Wei vd.,	2000	Bt Dongbei 66
Cry2Aa9	AF273218	Zhang vd.,	2000	
Cry2Aa10	AF433645	Yao vd.,	2001	
Cry2Ab1	M23724	Widner ve Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab2	X55416	Dankocsik vd.,	1990	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab3	AF164666	Chen vd.,	1999	Bt BTC002
Cry2Ab4	AF336115	Li vd.,	2001	Bt B-Pr-88
Cry2Ab5	AF441855	Yao vd.,	2001	
Cry2Ab6	AY297091	Wang vd.,	2003	Bt WZ-7
Cry2Ac1	X57252	Wu vd.,	1991	Bt shanghai S1
Cry2Ac2	AY007687	Song vd.,	2000	
Cry2Ad1	AF200816	Choi vd.,	1999	Bt BR30
Cry3Aa1	M22472	Herrnstadt vd.,	1987	Bt san diego
Cry3Aa2	J02978	Sekar vd.,	1987	Bt tenebrionis
Cry3Aa3	Y00420	Hofte vd.,	1987	
Cry3Aa4	M30503	McPherson vd.,	1988	Bt tenebrionis
Cry3Aa5	M37207	Donovan vd.,	1988	Bt morrisoni EG2158
Cry3Aa6	U10985	Adams vd.,	1994	Bt tenebrionis
Cry3Aa7	AJ237900	Zhang vd.,	1999	Bt 22

Cry3Ba1	X17123	Sick vd.,	1990	Bt tolworthi 43F
Cry3Ba2	A07234	Peferoen vd.,	1990	Bt PGSI208
Cry3Bb1	M89794	Donovan vd.,	1992	Bt EG4961
Cry3Bb2	U31633	Donovan vd.,	1995	Bt EG5144
Cry3Bb3	I15475	Peferoen vd.,	1995	
Cry3Ca1	X59797	Lambert vd.,	1992	Bt kurstaki BtI109P
Cry4Aa1	Y00423	Ward ve Ellar	1987	Bt israelensis
Cry4Aa2	D00248	Sen vd.,	1988	Bt israelensis HD522
Cry4Aa3	AL731825	Berry vd.,	2002	Bt israelensis
Cry4Ba1	X07423	Chungjatpornchai vd.,	1988	Bt israelensis 4Q2-72
Cry4Ba2	X07082	Tungpradubkul vd.,	1988	Bt israelensis
Cry4Ba3	M20242	Yamamoto vd.,	1988	Bt israelensis
Cry4Ba4	D00247	Sen vd.,	1988	Bt israelensis HD522
Cry4Ba5	AL731825	Berry vd.,	2002	Bt israelensis
Cry5Aa1	L07025	Narva vd.,	1994	Bt darmstadiensis PS17
Cry5Ab1	L07026	Narva vd.,	1991	Bt darmstadiensis PS17
Cry5Ac1	I34543	Payne vd.,	1997	
Cry5Ba1	U19725	Foncerrada veNarva	1997	Bt PS86Q3
Cry6Aa1	L07022	Narva vd.,	1993	Bt PS52A1
Cry6Aa2	AF499736	Bai vd.,	2001	Bt YBT1518
Cry6Ba1	L07024	Narva vd.,	1991	Bt PS69D1
Cry7Aa1	M64478	Lambert vd.,	1992	Bt galleriae PGSI245
Cry7Ab1	U04367	Payne ve Fu	1994	Bt dakota HD511
Cry7Ab2	U04368	Payne ve Fu	1994	Bt kumamotoensis 867
Cry8Aa1	U04364	Narva ve Fu	1992	Bt kumamotoensis
Cry8Ba1	U04365	Narva ve Fu	1993	Bt kumamotoensis
Cry8Bb1	AX543924	Abad vd.,	2002	
Cry8Bc1	AX543926	Abad vd.,	2002	
Cry8Ca1	U04366	Ogiwara vd.,	1995	Bt japonensis Buibui
Cry8Da1	AB089299	Yamamoto ve Asano	2002	Bt galleriae
Cry8Da2	BD133574	Asano vd.,	2002	Bt
Cry8Da3	BD133575	Asano vd.,	2002	Bt
Cry8Ea1	AY329081	Fuping vd.,	2003	Bt 185
Cry9Aa1	X58120	Smulevitch vd.,	1991	Bt galleriae
Cry9Aa2	X58534	Gleave vd.,	1992	Bt DSIR517
Cry9Ba1	X75019	Shevelev vd.,	1993	Bt galleriae
Cry9Ca1	Z37527	Lambert vd.,	1996	Bt tolworthi
Cry9Da1	D85560	Asano vd.,	1997	Bt japonensis N141
Cry9Da2	AF042733	Wasano ve Ohba	1998	Bt japonensis

Cry9Ea1	AB011496	Midoh ve Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10
Cry9Ea2	AF358863	Li vd.,	2001	Bt B-Hm-16
Cry9Eb1	AX189653	Arnaut vd.,	2001	
Cry9 like	AF093107	Wasano vd.,	1998	Bt galleriae
Cry10Aa1	M12662	Thorne vd.,	1986	Bt israelensis
Cry10Aa2	E00614	Aran ve Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A
Cry10Aa3	AL731825	Berry vd.,	2002	Bt israelensis
Cry11Aa1	M31737	Donovan vd.,	1988	Bt israelensis
Cry11Aa2	M22860	Adams vd.,	1989	Bt israelensis
Cry11Aa3	AL731825	Berry vd.,	2002	Bt israelensis
Cry11Ba1	X86902	Delecluse vd.,	1995	Bt jegathesan 367
Cry11Bb1	AF017416	Orduz vd.,	1998	Bt medellin
Cry12Aa1	L07027	Narva vd.,	1991	Bt PS33F2
Cry13Aa1	L07023	Narva vd.,	1992	Bt PS63B
Cry14Aa1	U13955	Narva vd.,	1994	Bt sotto PS80JJ1
Cry15Aa1	M76442	Brown ve Whiteley	1992	Bt thompsoni
Cry16Aa1	X94146	Barloy vd.,	1996	Cb malaysia CH18
Cry17Aa1	X99478	Barloy vd.,	1998	Cb malaysia CH18
Cry18Aa1	X99049	Zhang vd.,	1997	Paenibacillus popilliae
Cry18Ba1	AF169250	Patel vd.,	1999	Paenibacillus popilliae
Cry18Ca1	AF169251	Patel vd.,	1999	Paenibacillus popilliae
Cry19Aa1	Y07603	Rosso ve Delecluse	1996	Bt jegathesan 367
Cry19Ba1	D88381	Hwang vd.,	1998	Bt higo
Cry20Aa1	U82518	Lee ve Gill	1997	Bt fukuokaensis
Cry21Aa1	I32932	Payne vd.,	1996	
Cry21Aa2	I66477	Feitelson	1997	
Cry21Ba1	AB088406	Sato ve Asano	2002	Bt roskildiensis
Cry22Aa1	I34547	Payne vd.,	1997	
Cry22Aa2	AX472772	Isaac vd.,	2002	Bt
Cry22Ab1	AAK50456	Baum vd.,	2000	Bt EG4140
Cry22Ab2	AX472764	Isaac vd.,	2002	Bt
Cry22Ba1	AX472770	Isaac vd.,	2002	Bt
Cry23Aa1	AAF76375	Donovan vd.,	2000	Bt
Cry24Aa1	U88188	Kawalek ve Gill	1998	Bt jegathesan
Cry25Aa1	U88189	Kawalek ve Gill	1998	Bt jegathesan
Cry26Aa1	AF122897	Wojciechowska vd.,	1999	Bt finitimus B-1166
Cry27Aa1	AB023293	Saitoh	1999	Bt higo
Cry28Aa1	AF132928	Wojciechowska vd.,	1999	Bt finitimus B-1161
Cry28Aa2	AF285775	Moore ve Debro	2000	Bt finitimus
Cry29Aa1	AJ251977	Delecluse vd.,	2000	

Cry30Aa1	AJ251978	Delecluse vd.,	2000	
Cry31Aa1	AB031065	Mizuki vd.,	2000	Bt 84-HS-1-11
Cry31Aa2		Jung ve Cote	2000	
Cry32Aa1	AY008143	Balasubramanian vd.,	2001	Bt yunnanensis
Cry32Ba1	BAB78601	Takebe vd.,	2001	Bt
Cry32Ca1	BAB78602	Takebe vd.,	2001	Bt
Cry32Da1	BAB78603	Takebe vd.,	2001	Bt
Cry33Aa1	AAL26871	Kim vd.,	2001	Bt dakota
Cry34Aa1	AAG50341	Ellis vd.,	2001	Bt PS80JJ1
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar vd.,	2001	Bt EG5899
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck vd.,	2001	Bt PS149B1
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis vd.,	2001	Bt PS167H2
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar vd.,	2001	Bt EG9444
Cry34Ba1	AAK64566	Rupar vd.,	2001	Bt EG4851
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis vd.,	2001	Bt PS80JJ1
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar vd.,	2001	Bt EG5899
Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck vd.,	2001	Bt PS149B1
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar vd.,	2001	Bt EG9444
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis vd.,	2001	Bt PS167H2
Cry35Ba1	AAK64566	Rupar vd.,	2001	Bt EG4851
Cry36Aa1	AAK64558	Rupar vd.,	2001	Bt
Cry37Aa1	AAF76376	Donovan vd.,	2000	Bt
Cry38Aa1	AAK64559	Rupar vd.,	2000	Bt
Cry39Aa1	BAB72016	Ito vd.,	2001	Bt aizawai
Cry40Aa1	BAB72018	Ito vd.,	2001	Bt aizawai
Cry40Aa1	BAC77648	Ito vd.,	2003	Bun1-14

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Sürmene’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Karabük’te tamamladıktan sonra 1991-1992 öğretim yılında K.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 1995 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 1996 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1998 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora eğitimine başladı ve 1996-2003 yılları arasında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalıştı.

