

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MALACOSOMA NEUSTRIA* ORJİNLİ *BACILLUS THURINGIENSIS*'E AİT *cry2Ab*
GENİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYONU VE İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine ERYÜZLÜ

OCAK 2010
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALACOSOMA NEUSTRIA ORJİNLİ *BACILLUS THURINGIENSIS*'E AİT *cry2Ab*
GENİNİN KARAKTERİZASYONU, EKSPRESYONU VE İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine ERYÜZLÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.12.2009
Tezin Savunma Tarihi : 26.01.2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. İsmail DEMİR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ersan KALAY

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Malacosoma neustria* orjinli *Bacillus thuringiensis*'e ait *cry2Ab* geninin karakterizasyonu, ekspresyonu ve insektisidal aktivitesinin araştırılması” başlıklı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstleneli, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım hocam Sayın Doç. Dr. İsmail DEMİR'e, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkânları sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na, Arş. Gör. Hacer MURATOĞLU'na, tez süresi boyunca laboratuar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, değerli arkadaşlarım Mehtap YAKUPOĞLU'na, Arş. Gör. Yeşim AKTÜRK'e, Arş. Gör. Emine DEMİR'e, Demet MERT TATAR'a, Şerife İŞÇİ'ye, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuarları çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman inanan, güvenen ve varlıklarından her zaman güç aldığım değerli hocam Prof. Dr. Orhan AYDIN'a, Koordinatörüm Sayın Ümit ORHAN'a ve Trabzon Ticaret Sanayi Odası Proje Koordinasyon Ofisinde çalışan değerli iş arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, maddi ve manevi destekleri ve ilgileriyle hayatım boyunca yanımda olan sevgili anneme, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen eşim Hakan ERYÜZLÜ'ye de sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Emine ERYÜZLÜ
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Zararlılara Karşı Mücadele Yöntemleri.....	3
1.2.1. Doğal Mücadele.....	4
1.2.2. Yasal Mücadele.....	4
1.2.3. Mekanik Mücadele.....	4
1.2.4. Fiziksel Mücadele.....	4
1.2.5. Kültürel Mücadele.....	5
1.2.6. Kimyasal Mücadele.....	5
1.2.7. Biyolojik Mücadele.....	7
1.3. <i>Bacillus</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	10
1.4. <i>Bacillus</i> Türlerinin Tanımlanmaları.....	11
1.4.1. Geleneksel Tanımlama.....	11
1.4.2. API Test Kitleri ile Tanımlama.....	12
1.4.3. Moleküler Yöntemlerle Tanımlama.....	12
1.4.3.1. 16S rRNA Dizi Analizi.....	13
1.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	13
1.4.3.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi(RFLP).....	14
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
1.5.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Genel Özellikleri.....	14
1.5.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Tarihi.....	15
1.5.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Plazmitleri.....	16
1.5.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması.....	16
1.5.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin İnsektisidal Genleri.....	18

1.5.5.1.	<i>cry1</i> Genleri	18
1.5.5.2.	<i>cry2</i> Genleri	19
1.5.5.3.	<i>cry3</i> Genleri	19
1.5.5.4.	<i>cry4</i> ve <i>cyt</i> Genleri.....	20
1.5.6.	<i>cry</i> Genlerinin Klonlanması.....	20
1.5.7.	<i>cry</i> Genlerinin Ekspresyonu	21
1.5.8.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'ler Tarafından Üretilen Bileşikler	22
1.5.8.1.	Beta-Ekzotoksinler	22
1.5.8.2.	Hemolizinler	24
1.5.8.3.	Enterotoksinler.....	24
1.5.8.4.	Ekzoenzimler	24
1.5.8.5.	Vejetatif İnsektisidal Proteinler (VIP).....	25
1.5.8.6.	İnsektisidal Kristal Proteinler (ICP)	25
1.5.9.	İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Yapısı	27
1.5.10.	İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması	29
1.5.11.	İnsektisidal Kristal Protein (ICP)'lerin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması.....	33
1.5.12.	Böcek Populasyonlarının <i>Bacillus thuringiensis</i> 'e Dirençliliği	35
1.5.13.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Suşlarının Biyoteknolojisi	36
1.6.	Çalışmanın Amacı	40
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	41
2.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> MnD Bakterisi ve Büyüme Koşulları	41
2.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> MnD'den DNA İzolasyonu	41
2.3.	<i>cry2Ab</i> Geninin Çoğaltılması.....	42
2.4.	<i>cry2Ab</i> Geninin pGEM-T Easy Vektöre Klonlanması.....	43
2.5.	<i>cry2Ab</i> Geninin Elektrokompotent <i>E. coli</i> DH10 β 'ya Aktarımı.....	43
2.6.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi	44
2.7.	Klonların İçerdiği <i>cry2Ab</i> Geninin Dizi Analizi	45
2.8.	Elde Edilen DNA Baz Sıralarının İncelenmesi	45
2.9.	Belirlenen <i>Cry2Ab</i> Proteinin Literatürdeki Diğer <i>Cry2Ab</i> Proteinleri ile Karşılaştırılması ve MEGA Programı ile Ağaç Çizimi	45
2.10.	<i>cry2Ab</i> geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	46
2.10.1.	pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün <i>NdeI</i> ve <i>HindIII</i> Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.....	46

2.10.2.	<i>cry2Ab</i> Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılması.....	46
2.10.3	<i>cry2Ab</i> Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı	47
2.11.	pET-28a(+)’ya Klonlanan <i>cry2Ab</i> Geninin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hüresine Aktarımı.....	47
2.12.	<i>cry2Ab</i> Proteinin, Ekspresyonu ve İzolasyonu.....	47
2.13.	Protein Miktarının Belirlenmesi	48
2.14.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	48
2.15.	İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	49
3.	BULGULAR	50
3.1.	<i>cry2Ab</i> Genin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi.....	50
3.2.	<i>cry2Ab</i> Geninin Klonlanması ve Baz Sırasının Belirlenmesi	51
3.3.	<i>cry2Ab</i> Geninin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması	54
3.4.	Cry2Ab Proteinin Literatürdeki Diğer Cry2Ab Proteinleri ile Akralık Derecelerinin Belirlenmesi için MEGA Programı ile Ağaç Çizimi	59
3.5.	<i>cry2Ab</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	60
3.6.	Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi	61
3.7.	Cry2Ab Proteinin <i>Malacosoma neustria</i> ve <i>Rhagoletis cerasi</i> Larvaları Üzerinde İnsektisidal Aktivitesi	62
4.	TARTIŞMA.....	65
5.	SONUÇLAR.....	70
6.	ÖNERİLER	71
7.	KAYNAKLAR.....	72
8.	EKLER	80
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bacillus thuringiensis, Gram-pozitif, sporlanabilen, fakültatif anaerop bir toprak bakterisidir. Sporlanma esnasında üretilen, parasporal kristal yapıdaki δ -endotoksinler, bunların çok sayıda tarım zararlılarıyla mücadelede etkili ve yaygın bir şekilde kullanılmalarını sağlamaktadır. Bu potansiyelleri nedeniyle bugün, tüm dünyada en çok üretilen ve en fazla market satışlarına sahip ticari mikrobiyal mücadele preparatları *B. thuringiensis*'lerden geliştirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis* MnD izolatu, doğal olarak ölmüş *Malacosoma neustria* larvalarından izole edildi. Bu izolata ait *cry2Ab* geni, dejenerat primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Çoğaltılan genlerin nükleotid sıralarının belirlenmesi için PZR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve dizin analizine gönderildi. Dizin analizi yapılan *cry2Ab* geninin DNA ve aminoasit sıraları literatürdeki mevcut *cry2Ab* genlerinin DNA ve aminoasit sıraları ile karşılaştırıldı.

Analiz sonuçları, çalışmada kullanılan yerel *Bacillus thuringiensis* izolatına ait *cry2Ab* geninin 1902 bp uzunluğunda olduğunu, 633 aminoasit dizisi kodladığını ve literatürdeki *B. thuringiensis* ly30 bakterisinin *cry2Ab* genine %99 oranında benzerlik gösterdiğini ortaya koydu. Dizin analizi yapılan bu *cry2Ab* geni, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *Escherichia coli*'de ekspres edildi. Ekspresyon sonucu, SDS-PAGE analizine tabi tutuldu ve *cry2Ab* proteininin 70 kDa büyüklüğünde olduğu belirlendi. Üretimi yapılan *cry2Ab* proteinin insektisidal aktivitesi, *Malacosoma neustria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) ve *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) zararlıları üzerinde test edildi. Yüz μ g konsantrasyonundaki *cry2Ab* proteinin *M. neustria* larvaları üzerinde %73 ve *R. cerasi* larvalarında ise %75'lik insektisidal etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab* Geni, Kristal Proteinler, İsektisidal Aktivite

SUMMARY

Characterization, Expression and Investigation of the Insecticidal Activities of *cry2Ab* Gene Which Belongs to *Bacillus thuringiensis* Bacteria Origin *Malacosoma neustria*

Bacillus thuringiensis is a gram-positive, facultative anaerob soil bacterium can be sporulated. During sporulation, it produces different δ -endotoxins that have a parasporal crystal structure because of the *B. thuringiensis*, an important insect pathogen, is effectively and widely used in combating pests. Because of their potential, *B. thuringiensis* is the most produced and most marketed commercial microbial control prepare around the world today.

B. thuringiensis MnD isolate used in this study was isolated from a naturally dead *M. neustria* larvae. *cry2Ab* gene belonging to that isolate was amplified with the PCR method by using degenerate primers. The amplified gene was cloned to pGEM-T Easy Vector and its sequence analysis was performed in order to identify the nucleotide sequence. DNA and aminoacid sequence of *cry2Ab* gene that underwent a sequence analysis, was compared with the DNA and aminoacid sequences of existent *cry2Ab* gene in literature.

The results of anaysis show that *cry2Ab* gene belonging to the local *B. thuringiensis* isolates used in this study has a length of 1902 bp and 633 aminoacid sequence. Besides, it has %99 homology with the *cry2Ab* gene of *B. thuringiensis* ly30 bacterium in literature. The sequenced *cry2Ab* gene was cloned to the pET-28a(+) expression vector and their proteins were expressed in *Escherichia coli*. The result was exposed to SDS-PAGE analysis and it was found that *cry2Ab* protein had the size of 70 kDa. The insecticidal activity of the *cry2Ab* protein produced was tested on *Malacosoma neustria* L. (Diptera: Lasiocampidae) and *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae). It was found that *cry2Ab* protein in 100 μ g concentration showed 73% insecticidal effect on *M. neustria* larvae and 75% insecticidal effect on *R. cerasi* larvae.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab* Gene, Crystal Proteins, Insecticidal Activity

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Zararlılara karşı kullanılan mücadele yöntemleri.....	3
Şekil 2. Biyolojik mücadele kapsamında kullanılan organizmaların ilişki şeması.....	8
Şekil 3. Biyolojik mücadelede kullanılan entomopatojen mikroorganizma grupları.....	9
Şekil 4. Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait koloni şekilleri	10
Şekil 5. <i>B. thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskopik görünümü	15
Şekil 6. <i>B. thuringiensis</i> MnD kristal yapılarının SEM görüntüsü	26
Şekil 7. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı.....	28
Şekil 8. Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü	30
Şekil 9. Tüm cry proteinlerinin aminoasit dizi benzerlik filogramı	32
Şekil 10. <i>B. thuringiensis</i> 'in hedef böceklerdeki mekanizması.....	34
Şekil 11. <i>cry2Ab</i> geninin PZR yöntemiyle çoğaltılması	50
Şekil 12. pGEM-T/ <i>cry2Ab</i> klonunun restriksiyon analizi.....	51
Şekil 13. <i>cry2Ab</i> geninin DNA sırası (1902bp)	52
Şekil 14. <i>cry2Ab</i> geninin aminoasit sırası (633aa).....	53
Şekil 15. <i>cry2Ab</i> geninin korunmuş bölgeleri	54
Şekil 16. Cry2Ab proteinin literatürde bulunan diğer cry2Ab proteinler ile blast sonucu.....	56
Şekil 17. Cry2Ab proteinin evrimsel analizi (Neighbour Joining Analizi)	59
Şekil 18. pET-28a(+) ve <i>cry2Ab</i> 'nin restriksiyon analizi.....	60
Şekil 19. <i>NdeI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve <i>cry2Ab</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	61
Şekil 20. <i>E. coli</i> BL21(DE3)'de üretilen cry2Ab proteinine ait SDS-PAGE analizi	62
Şekil 21. Cry2Ab proteinin (100 µg) <i>M. neustria</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	63
Şekil 22. Cry2Ab proteinin (100 µg) <i>R. cerasi</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi.....	64

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo1. Dünya pestisit piyasasında kullanılan kimyasal pestisitler.....	7
Tablo 2. Mevcut <i>B. thuringiensis</i> 'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması	17
Tablo 3. <i>cry</i> genlerinin farklı konaklarda ekspresyonu ve avantajları.....	23
Tablo 4. Aktivitelerine göre <i>B. thuringiensis</i> δ -endotoksinler.....	26
Tablo 5. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları	27
Tablo 6. Etkili oldukları hedef böcek türlerine göre kristal proteinler ve bu böcek türlerinin ait oldukları böcek grupları.....	29
Tablo 7. Lepidoptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari <i>B. thuringiensis</i> preparatları	36
Tablo 8. Diptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari <i>B. thuringiensis</i> preparatları.....	38
Tablo 9. Coleoptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari <i>B. thuringiensis</i> preparatları	38
Tablo 10. <i>cry2A</i> genlerine ait ileri ve geri dejenerat primer dizileri	42
Tablo 11. <i>Cry2Ab</i> proteininin aminoasit içerikleri.....	54
Tablo 12. <i>M. neustria</i> orijinli <i>B. thuringiensis</i> 'e ait <i>cry2Ab</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>cry2Ab</i> sıraları ile karşılaştırılması.....	55
Tablo 13. <i>Cry2Ab</i> proteininin literatürde bulunan diğer <i>cry2Ab</i> proteinleri ile benzerliği	55

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz Çifti
cry	: Kristal
cyt	: Sitolitik
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
dNTP	: Deoksinükleosit Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamit Tetra Asetikasit
ICP	: İnsektisidal Kristal Protein
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit
kDa	: Kilo Dalton
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: Tetra Etilen Diamit
X-gal	:5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid
VIP	: Vejetatif İnsektisidal Protein

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hızlı nüfus artışının beraberinde getirmiş olduğu kentleşmeyle birlikte her geçen gün tarım alanları azalmakta ve kişi başına düşen tarım ürünü miktarında düşüş olmaktadır. Geçmişte tarımsal ürün bakımından kendi kendine yeten ülke konumunda olan Türkiye şimdi birçok ülkeden tarımsal ürün ithal etmektedir. Bunun en önemli sebeplerinden biri ekonomik değeri yüksek olan bitkilerde zararlı böcekler ile mücadelenin bilinçli ve tam bir şekilde yapılamamasıdır (Bülbüoğlu, 2000).

Bugün dünyada zararlıların neden olduğu ürün kayıplarının % 35 civarında olduğu, bu kaybın % 12'sinin böcek ve akarlardan, % 12'sinin bitki patojenlerinden, % 10'nun yabancı otlardan ve % 1'nin ise kuş ve memeli zararlılarından kaynaklandığı ve bunun maliyetinin yaklaşık olarak 400 milyar dolar civarında olduğu belirtilmiştir (Özgür, 1990).

Tarım zararlıları başta olmak üzere çeşitli zararlılarla yıllardan beri mücadele edilmekte ve bu mücadelede kimyasal insektisidler yoğun olarak kullanılmaktadır. Hedef canlıya karşı kullanılan kimyasal insektisidlerin büyük bir kısmı toprak ve bitki üzerinde kalıp, yağışlarla yıkanarak yer altı ve yerüstü su kaynaklarına karışmaktadır. Sonuçta, biyolojik besin zincirine dahil olarak ekosistemdeki canlıları ve insan yaşamını tehdit edici bir unsur olarak ortaya çıkmaktadır. Pek çok böcek türünün kimyasal insektisidlere karşı direnç kazanması ve her geçen gün kullanılan dozun arttırılması yeni problemleri beraberinde getirmektedir (Öztürk, 2007).

Kimyasal insektisitlerin kullanımının olumsuz etkileri nedeniyle bu konuya kamoyunun ilgisi artmış ve kimyasal insektisitlere karşı alternatif yöntem geliştirmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerin başında da biyolojik mücadele gelmektedir. Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını onlara karşı kullanma olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele, predatörler, parazitler ve hastalık oluşturan mikroorganizmaları kapsamaktadır. Ancak, böceklerde hastalık oluşturan mikroorganizmaların biyolojik mücadelede kullanımı mikrobiyal mücadele olarak adlandırılır. Biyolojik mücadele, kimyasal mücadeleye göre doğal dengenin kurulmasına yardımcı olması, uzun vadede kalıcı sonuçlar vermesi ve nihai

hedefe ulaştırabilmesi bakımından en çok tercih edilmesi gereken mücadele yöntemidir (Oğurly, 2000).

Doğada b6ceklerin hastalanmasına ve sonra da 6lmelerine neden olan b6cek orijinli pek 6ok bakteri, vir6s, mantar, nematod ve protozoa vardır (Demirbağ vd., 2008). Bu mikroorganizmalar entomopatojen olarak adlandırılır. Entomopatojen bakteriler, g6n6m6zde zararlı b6ceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. B6ceklerde hastalık oluşturan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmeyenler olmak 6zere iki gruba ayırmak m6mk6nd6r. Spor oluşturmeyen b6cek patojeni bakteriler, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* ve *Micrococcaceae* familyalarına dahildir. B6ceklere 6nemli zarar veren bakteriler daha 6ok spor meydana getiren bakterilerdir. Spor oluşturan bakteriler *Bacillaceae* familyasından *Clostridium* ve *Bacillus* cinsleri i6ersinde yer almaktadır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve y6ksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu g6stermiştir. Spor oluşturmeyen bakteriler ise zor koşullar karşısında olduk6a dayanıksız ve hassas yapıdadırlar. Buna g6re, zararlı b6ceklere karşı yapılacak m6cadelede, daha 6ok spor oluşturan ve fak6ltatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurly, 2000).

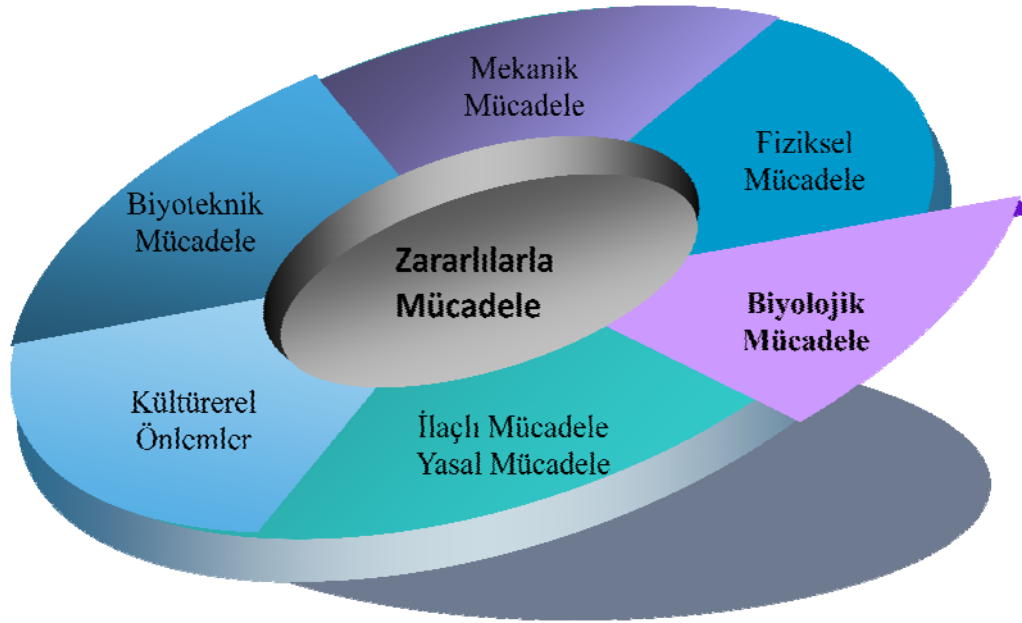
Son yıllarda patojenite potansiyeli olduk6a y6ksek bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* 6zerinde durulmaktadır. Bu bakterinin biyolojik m6cadelede, diğer bir6ok bakteriye oranla daha 6mit verici olduğu ifade edilmektedir. Pek 6ok gelişmiş ve gelişmekte olan 6lkede bu konu ele alınmakta, başta Lepidoptera olmak 6zere Diptera ve Coleoptera takımlarındaki zararlılara karşı *B. thuringiensis* preparatları ticari 6l6de 6retilerek kullanılmaktadır. Hedef canlıya spesifik olmaları, 6evre kirliliğine yol a6mamaları, insan ve diğer omurgalılara zararlı olmamaları ve ekonomik olmaları bu preparatların biyolojik m6cadele 6alışmalarında tercih edilmelerine neden olmaktadır. Ayrıca, bu preparatlara karşı diren6 gelişimindeki bu oranın d6ř6k olması da bunların kullanımını artırmaktadır.

B. thuringiensis preparatlarının tamamı, t6m 6evre koşullarında aynı etkiye sahip değildir. Bunların etkinliği, mikroorganizmaların dağılımı ve adaptasyonu, h6cresel ve populasyon d6zeyindeki gelişmeler, mikroorganizmalar arası rekabet ve diğer organizmalarla interaksiyonlar ve 6evresel fakt6rlere bağlıdır. Ayrıca, mevcut preparatlara diren6 geliştirilmesi ve bunların 6evre koşullarına uyum sağlamaması, yeni preparatlar geliştirilmesi 6alışmalarını zorunlu kılmaktadır. Bu sebeple, doğal 6evreye adapte olmuş, rekabet ve etki g6c6 y6ksek, diren6lilik problemi ortadan kalkmış yeni ve yerel bir *B.*

thuringiensis'in belirlenmesi ve mikrobiyal mücadele preparatlarına dönüştürülmesi ayrı bir önem taşımaktadır.

1.2. Zararlılara Karşı Mücadele Yöntemleri

Zararlılara karşı mücadele yöntemleri, koruyucu önlemler ve iyileştirici önlemler diye iki ana başlık altında incelenmektedir. Koruyucu önlemler ana başlığı altında yer almakta olan kültürel önlemler, fiziksel ve yasal mücadele yöntemleri zararlılarla mücadelede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, biyolojik mücadelenin yer aldığı iyileştirici yöntemlerde ise mekanik, biyoteknik mücadelenin yanında ilaçla mücadelenin yapıldığı kimyasal mücadele yöntemi de bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Zararlılara karşı kullanılan mücadele yöntemleri (Demirbağ vd., 2008).

Günümüzde çeşitli mücadele yöntemleri ve preparatları kullanılmasına rağmen, daha etkili, çevreye zararı daha az olan ve daha ekonomik mücadele yöntemleri araştırma ve geliştirme çalışmaları halen daha devam etmektedir. Çoğu zaman birden fazla yöntemin bir arada kullanıldığı entegre mücadele yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir.

Zararlı böcekler ile mücadele, kitle üremesi yapan veya yapma yeteneğinde olan böcek popülasyonlarının sayısının artmasını engellemek için gerçekleştirilen mücadele

olarak bilinir. Tarımda ve ormancılıkta uygulanan 5 çeşitli zararlı böcekle mücadele yöntemi vardır (Demirbağ vd., 2008).

1.2.1. Doğal Mücadele

İnsanın herhangi bir yardımı olmadan doğal kuvvetlerle böcek popülasyonlarının kontrol altında tutulması doğal mücadele olarak tanımlanmaktadır. Çevre direncinin bir sonucu olarak böceklerin önemli bir kısmı ya çoğalmadan ya da çoğaldıktan sonra ölürlür. Böylece, zarar oluşturan böceğin ortamdaki sayısı ve oluşturduğu zarar düşük seviyelerde kalmış olur.

1.2.2. Yasal Mücadele

Yasal yollardan yararlanılarak, zararlıların yayılmasının önlenmesidir. Karantina, ambargo, muayene ve sertifika uygulamak yasal mücadelenin başında gelmektedir. Bu uygulamalar bazen kıtalar ve ülkeler arasında olurken, bazen de ülkenin içerisinde bölgeye özgü uygulanabilir.

1.2.3. Mekanik Mücadele

Böcekleri çeşitli yöntemlerle toplamak, yem tuzakları kurmak, feromonlar kullanmak, tuzak odunları hazırlamak veya gıda değişimi yapmak suretiyle gerçekleştirilen mekanik mücadele yöntemleridir. Mekanik mücadele yöntemleri içerisinde günümüzde en çok feromon uygulamaları kullanılmaktadır. Feromonlar, böcekler ve diğer hayvan grupları tarafından kimyasal iletişimi sağlamak amacıyla salınan kokusuz, doğal moleküllerdir. Feromonların kullanılmasının nedeni ise orman alanlarında uygulanması nispeten yaygın olmasıdır.

1.2.4. Fiziksel Mücadele

Sıcak ve nemden yararlanarak böceklerin öldürülmesi, elektrik ve radyoaktivite kullanarak böceklerin kısırlaştırılması işlemlerini içeren mücadele yöntemidir. Fiziksel

mücadele daha çok tarımsal alanlara uygulanan mücadele yöntemidir. Bu mücadele yönteminde zararlının doğrudan toplanması, öldürülmesi ya da davranışlarının bozulması, çevrelerinin bir dereceye kadar kendileri için uygun olmayacak koşullara çevrilmesi gibi işlemler yapılır.

1.2.5. Kültürel Mücadele

Toprak bakımı, işlenmesi ve gübrenmesi, yabancı ot ve atıkların temizlenmesi ve bitki nöbetleşmesi gibi toprakla yapılması gereken işleri kapsayan mücadele yöntemidir. Kültürel faaliyetler, birinci derecede esas hastalık kaynaklarını azaltmayı ve de ortadan kaldırmayı ayrıca da bitki dayanıklılığını arttırmayı amaçlamaktadır.

Kültürel mücadele, diğer metotlar ile bir arada ele alındığında daha etkili olabilmektedir. Kültürel yöntemlerle sağlanan başarılar, özellikle kimyasal mücadele yöntemindeki gibi ani ve yüksek düzeyde etki değildir. Bu nedenle de yetiştirici tarafından hemen benimsenen bir yöntem olamamaktadır. Ancak, daha düşük harcama gerektiren pratik işlemler olması nedeniyle uygulanmakta ve zararlılarla mücadelede diğer yöntemlere destek olmaktadır.

1.2.6. Kimyasal Mücadele

Kimyasal mücadelede kullanılan pestisitler, besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besinin kalitesini bozan ve ürünlerin değerlerini düşüren zararlıları (böcekler, mikroorganizmalar ve diğer organizmalar) yok etmek için kullanılmaktadır. Tarım ürünlerinin yetiştirilmesinde ve depolanmasında özellikle böceklerin meydana getirmiş olduğu zararlar insanlar için büyük sorunlar oluşturulmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak ve böcekleri etkisiz hale getirebilmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal insektisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadele yöntemiyle zararlı populasyonların % 95'i yok edilebilmektedir (Vural, 1996).

Pestisitler hedef zararlılara göre herbisitler (yabancı otlara karşı), fungusitler (mantarlara karşı), rodendisitler (kemiricilere karşı) ve insektisitler (böceklere karşı) olmak üzere sınıflandırılabilirler (Vural, 1996).

Zararlı böceklerin meydana getirdiği ürün kayıplarını önlemek için kullanılan kimyasal ilaçların insan sağlığına olumsuz etkisi vardır. İlaç üretiminde bulunan, ilaç uygulaması yapan ve uygulamanın yapıldığı alanda çalışan işçiden başlayıp ilaçlı ürünü yiyen kişiye, hatta doğacak çocuğa kadar toplumun farklı kesimleri kimyasallardan etkilenmektedir. Ayrıca, hedef dışı canlılara olan etkileri sonucunda doğal dengenin bozulması, hava, toprak ve su kirliliğinin oluşması da sorunun önemli bir boyutunu oluşturmaktadır. Zararlı popülasyonlarını dengede tutan doğal düşman popülasyonları da tarım ilaçlarından etkilenmekte ve böylece doğal düşmanı ortadan kalkan zararlılar problem haline gelmektedir. Kimyasal ilaçların tarım zararlılarına karşı çoğu kez aşırı ve bilinçsiz kullanımları, zararlıların bunlara karşı dayanıklılık kazanmalarına sebep olmaktadır.

Böceklerle karşı kullanılan kimyasal insektisitlerin hemen hemen hepsi norotoksiktir. Yani vücuda hangi yolla girerlerse girsinler mutlaka sinir sistemi üzerine etki ederek canlının ölmesine neden olmaktadır (Öztürk, 2001).

Özellikle de 1945 yılında DDT'nin bulunmasıyla sentetik kimyasal insektisitlere yönelim artmıştır. Bunun neticesinde tarımsal üretimde ve ayrıca insanlarda hastalık yapıcı vektör böceklerin mücadelesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Fakat kimyasal insektisit kullanımı tamamıyla kusursuz olmamış ve birçok problemi de beraberinde getirmiştir. Aşırı insektisit kullanımı yeraltı sularının kirlenmesine, flora ve faunada hedef olmayan organizmaların zehirlenerek yok olmasına, besin zincirlerinin olumsuz etkilenmesine neden olmuş ve ayrıca, insektisitlere karşı dirençli zararlıları ortaya çıkarmıştır. Böceklerde direncin oluşması insektisit dozunun artırılmasını ve yeni insektisitlerin üretimini gerektirmiştir. Bu zararlı etkilerinden dolayı bazı insektisitlerin kullanımı Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından yasaklanmıştır (Chang vd., 2003).

Kimyasal pestisitlerin kullanıldığı kimyasal mücadele, çevreye verdiği olumsuz etkilerden dolayı, günümüzde gelişmiş ülkelerde yerini biyolojik mücadele ve integre mücadele yöntemlerine bırakmıştır (Demirbağ vd., 2008). Ancak, kimyasal mücadele yine de dünya piyasasında zirai mücadelede önemli bir yer tutmaya devam etmektedir (Tablo 1).

Tablo1. Dünya pestisit piyasasında kullanılan kimyasal pestisitler (Demirbağ vd., 2008).

PESTİSİTLER	MİLYON US)
Herbisitler	14,829X10 ⁶
İnsektisitler	8,984X10⁶
Fungisitler	7,088X10 ⁶
Diğer	1,764X10 ⁶
TOPLAM	32,665X10⁶

1.2.7. Biyolojik Mücadele

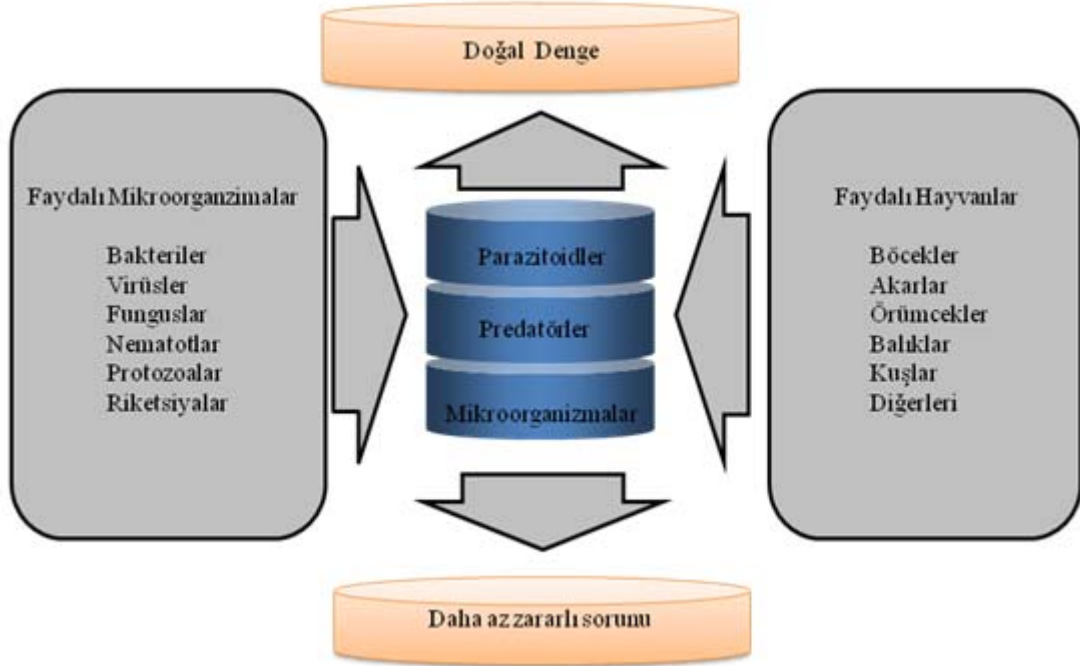
Biyolojik mücadele “böceklerin meydana getirmiş olduğu zararları en aza indirmek amacıyla bu böceklerin tabii düşmanlarını kullanma” olarak tanımlanabilir. Tabii düşman terimi, parazitler ve predatörlerle birlikte hastalık oluşturan organizmaları da kapsar (Şekil 2).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde kimyasal ilaçların yerini biyoinsektisitler almıştır. Biyoinsektisitler üretim teknolojilerinin kolay ve sürekli olması, sadece hedef canlıya etki etmeleri, zararlılarla mücadelede güvenilir olmaları, çevre kirliliği ile ilgili problemler yaratmamaları ve endosporlarının doğada uzun süre kalmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Smith, 1980).

Biyolojik mücadele, çevrede mevcut ve etkili olan biyotik etmenlerin insan faktörünün yardımı ile zararlı ve hastalıklar üzerinde etkinliklerinin artırılması için yapılan çalışmalardan oluşmaktadır. Temel olarak zararlılara karşı yapılan biyolojik mücadele uygulamalarında parazitoid, predatör ve patojen olmak üzere 3 temel ögeden yararlanılmaktadır (Şekil 2). Bu ögelerden birisi olan patojenler olarak bilinen böcek hastalık etmenleri “Entomopatojen Mikroorganizmalar” olarak adlandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalar ile yapılan mücadeleye ise “Mikrobiyal Mücadele” adı verilmektedir. Entomopatojen mikroorganizmalar içerisinde bakteriler, funguslar, virüsler, protozoa ve nematodlar olmak üzere 5 ana grup karşımıza çıkmaktadır (Şekil 3). Diğer doğal düşmanlarda olduğu gibi entomopatojenik mikroorganizmalar içerisinde yer alan entomopatojenik bakteriler hedef zararlı populasyonlarının mücadelesinde önemli etkilere sahiptirler (Mc Coy vd., 1988).

Entomopatojenik bakteriler arasında, toprak grubu bakteriler en çok gelecek vaat eden biyolojik mücadele etmenleridir. Entomopatojenlerin yakın gelecekte, mikrobiyal

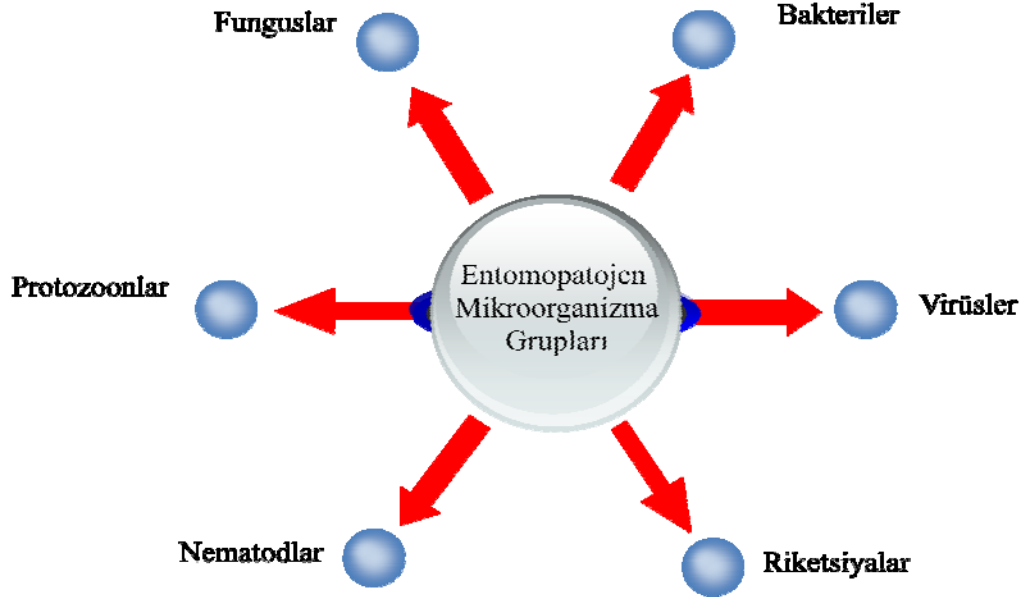
mücadele etmeni olarak, sadece fiyat ve etkinlik bakımından değerlendirildiğinde bile kimyasal insektisidlere göre daha kullanışlı hale geleceği düşünülmektedir. Entomopatojenik bakteriler, böceklerde kitle halinde ölümlere neden olmaktadır (Demir vd., 2002; Sezen vd., 2007). Böceklerde hastalık oluşturan bakterileri spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Spor oluşturmayan böcek patojeni bakteriler, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* ve *Micrococcaceae* familyalarına dahildir. Böceklere önemli zarar veren bakteriler daha çok spor meydana getiren bakterilerdir. Spor oluşturan bakteriler *Bacillaceae* familyasından *Clostridium* ve *Bacillus* cinsleri içerisinde yer alırlar. Yapılan araştırmalar sporların kuraklığa ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Fakat spor oluşturmayan bakteriler ekstrem fiziksel koşullara karşı daha hassastır. Bu nedenle mikrobiyal mücadelede daha çok spor oluşturan bakteriler tercih edilmektedir.



Şekil 2. Biyolojik Mücadele kapsamında kullanılan organizmaların ilişki şeması

Mikrobiyal mücadelede özellikle spor oluşturan *Bacillus* grubu bakteriler önemli bir yer tutar ve bu bakteriler Lepidoptera (kelebekler), Diptera (sinekler, sivisinekler) ve Coleptera (kın kanatlılar) takımlarına ait çeşitli böcekleri hedef alırlar (National Research Council, 1984). Biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler arasında *Bacillus thuringiensis*

yüksek patojenite potansiyelinden dolayı son yıllarda çok ilgi çeken bir etmen haline geldi ve günümüzde kullanılan mikroorganizmaların % 90'nını *B. thuringiensis* oluşturmaktadır (Chattopadhyay vd., 2004).



Şekil 3. Biyolojik mücadelede kullanılan entomopatojen mikroorganizma grupları

B. thuringiensis bir toprak bakterisi olmasına rağmen, hastalıklı ve sağlıklı böceklerden, bitkilerin yaprak yüzeylerinden ve depolanmış ürünlerden de izole edilmiştir (Carozzi vd., 1991; Kaelin vd., 1994; Sezen vd., 2007; İnce vd., 2008).

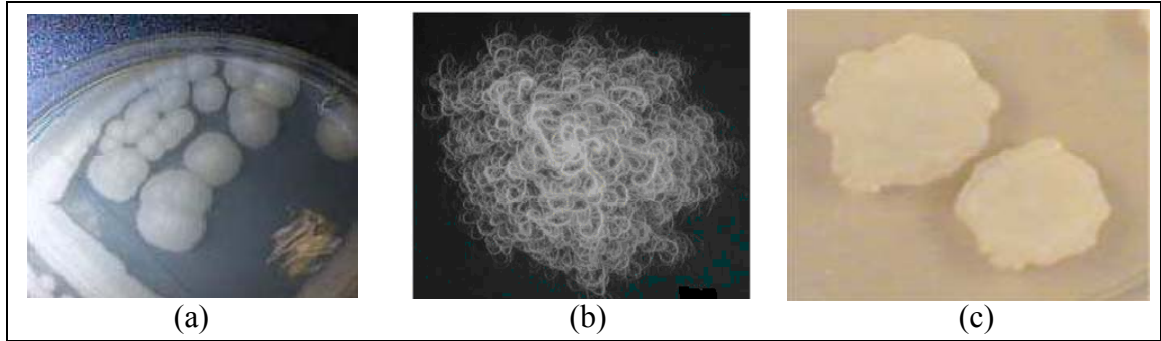
B. thuringiensis, δ -endotoksin olarak isimlendirilen protein yapısında ve biyolojik olarak kolayca parçalanabilen ve böylece böceğin orta bağırsağında kısa bir yarılanma ömrü olan insektisidal toksinler üretirler. Kimyasal insektisitler ile kıyaslandığında *B. thuringiensis* ürünleri, diğer ilaçlara göre etki şekli farklı olduğundan hedef organizmada daha az bir dirence neden olur. Kimyasal insektisitler gibi ortamda birikip toksik etki oluşturmazlar. İnsanlar üzerinde herhangi bir patojenite göstermezler. Ayrıca, arılara, kuşlara ve faydalı böceklere de zararsızdır. Bu nedenle biyolojik mücadelede, kimyasal insektisitler ile karşılaştırıldığında çevresel dengeyi bozmayan alternatif bir mücadele yöntemidir (Chattopadhyay vd., 2004).

1.3. *Bacillus* Türlerinin Genel Özellikleri

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).

Optimum büyüme sıcaklıkları 25°C ile 37°C arasında değişmektedir. Ancak, termofilik ve psikofilik türleri 75°C'den daha yüksek ve 3°C'den daha düşük sıcaklık derecelerinde büyüebilme yeteneklerine sahiptirler (Tanada ve Kaya, 1993).

Bacillus türlerinin koloni özellikleri çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi ve koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir (Şekil 4). Çoğu *Bacillus* türleri pigment oluşturmaz, ancak bazı türler farklı besiyerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah pigmentler üretebilirler (Rosovitz vd., 1998).



Şekil 4. Bazı *Bacillus* türlerine ait koloni şekilleri a) *B. megaterium* b) *B. mycoides*, c) *B. subtilis* (Rosovitz vd., 1998).

Bacillus türlerinin en önemli özelliklerinden biri de büyüme evresinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturmalarıdır. Endospor oluşturan hücrelerin şekli *Bacillus* türleri için karakteristiktir. *Bacillus*'lar sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler (Rosovitz vd., 1998). Endosporlar silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlaktır. Endosporlar, vejetatif hücrelerden optik kırılma, ince yapı, kimyasal pozisyon, kimyasal ve fiziksel strese dirençlilik gibi pek çok yönden farklıdır. Cinsin asıl habitatı, topraktır. Endospor oluşturan *Bacillus* türleri

toprak, bitki rizosferi, gıda, su ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinin yanı sıra, sivrisinek, kelebek, sinek ve kınkanatlı gibi çeşitli böcek ergin ve larvalarından da izole edilmişlerdir (Demir vd., 2002; İnce vd., 2008). *Bacillus* türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularla, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus* türleri ise uygun olmayan koşullarda büyüebilme kapasitesindedirler (Rosovitz vd., 1998).

Yapılan çalışmalarda genelde *Bacillus* cinsi bakterilerin içerdiği plazmitlerin kriptomik plazmitler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, *B. thuringiensis*'in bir plazmitinin insektisidal kristal proteinin üretimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. *B. thuringiensis*'in toksin genleri ve *B. anthracis*'in antraks toksin genleri plazmitler üzerinde yerleştiği için *B. cereus* grubunun plazmitleri grup üyelerinin tanımlanması için önemli bir faktördür. Plazmitler *B. cereus* grubunda çok yaygındır ve tek bir tür 6'dan daha fazla farklı plazmit türü taşıyabilir (Yoshimura,1983).

1.4. *Bacillus* Türlerinin Tanımlanmaları

1.4.1. Geleneksel Tanımlama

Bacillus türlerinin tanımlanmaları ve sınıflandırılmalarında spor morfolojilerinden yararlanılmaktadır. Sporum hücre içindeki yerleşimi ve şekli türler arasında farklılık göstermektedir. Spor morfolojilerine bağlı olarak *Bacillus* türleri üç büyük gruba ayrılır. *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* ve *B. cereus* var. *mycoides* büyük hücreli birinci grupta yer alır. Gram pozitif çubuk şekilli hücre ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit ya da silindirik sporlar oluştururlar. Parasporal kristaller gibi protoplazmik inklüzyonlar büyük hücreli türlerde bulunur. Klinik olarak önemli *Bacillus* izolatlarının çoğu birinci grupta yer alır (Turnbull vd., 1990). İkinci grup türleri Gram değişkendir ve merkezde ya da uç kısımda elipsoit sporlara sahiptirler. Bu grupta başlıca *B. circulans*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. popillae*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. alvei*, *B. stearothermophilus* ve *B. brevis* yer alır. Üçüncü grup Gram değişken ve heterojen *B. sphaericus* türlerince baskındır. Bunlar uç kısımda ya da uca yakın yerde küresel sporlar ihtiva ederler.

1.4.2. API Test Kitleri ile Tanımlama

Spor morfolojilerine ilave olarak *Bacillus* türlerinin tanımlanması için çeşitli biyokimyasal testler geliştirilmiştir. Bu klasik testler için özel besiyerleri ve kimyasal maddelerin kullanılmasını gerektirmektedir. Cins içerisindeki yüksek heterojenlik standart testlerle tanımlama yapmayı zorlaştırmaktadır (Rosovitz vd., 1998).

Logan ve Berkeley (1984) API stripleri kullanarak *Bacillus* türlerinin tanımlanması için hızlı ve kesin bir sistem geliştirmişlerdir. 12 testlik API 20 E ve 49 testlik API 50 CHB test kitlerinin kullanılması ile *Bacillus* türlerinin tanımlanmaları daha hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Logan vd., 1984). API20E panel test sistemi bir panel içerisine yan yana yerleştirilmiş kuyucuklardan oluşmaktadır. Her bir kuyucuk farklı bir biyokimyasal özelliği belirlemek amacı ile çeşitli substrat veya indikatörleri içermektedir. Testlerden bazıları inkübasyondan sonra direk olarak testin sonucunun çeşitli renklerle belirlenmesini sağlarken, diğer bir kısmı ise ayıraç damlatıldığında renk değişikliği yada kabarcık oluşumu gibi gözle görülebilen değerlendirmeler yapılabilmesini sağlar.

1.4.3. Moleküler Yöntemlerle Tanımlama

Klasik testlere ve API sistemine ilave olarak çeşitli moleküler yöntemler türler arasındaki farklılığı belirlemek için geliştirilmiştir. Kromozomal DNA baz bileşimi ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri tanımlama için kullanılmaktadır. Özel DNA problemleri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), plazmit ve toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi, 16S rRNA dizi analizi, Southern blotlama gibi moleküler yöntemler tanımlamanın kesin ve hızlı bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır. Southern blotlama herhangi bir kaynaktan elde edilen DNA'nın analizi için kullanılan membran blotlama ve görüntüleme tekniğidir. Bu metotla önce çalışılan DNA'nın izolasyonu ve çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemi takiben oluşan DNA parçaları elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilmekte ve nitroselüloz membrana aktarılmaktadır. En son işaretli DNA veya RNA problemleri kullanılarak görüntülenmektedir (Rosovitz vd., 1998; Chang vd., 2003).

1.4.3.1. 16S rRNA Dizi Analizi

Bakterilerin tanımlanması için 1980 yılından itibaren yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Woese ve arkadaşları (1983) bakteriler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için genetik kodun değişmeyen bölgelerini kıyaslamışlardır. Bakterilerdeki bu gen bölgeleri 16S rRNA geni (ribozomun küçük alt birimine özgü RNA) ve 23S ve 5S rRNA (büyük alt birimler) genleri ve bu genler arasında yer alan bölgelerdir (Woese vd., 1983).

Bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan gen bölgesi 16S rRNA'dır. 16S rRNA gen bölgesi yaklaşık olarak 1550 bp uzunluğundadır ve hem değişebilen hem de korunmuş bölgelerden oluşur (Joung vd., 2001). 16S rRNA dizilerinin kıyaslanması bakteriler, arkebakteriler ve ökaryotik organizmalar arasındaki filogenetik ve evrimsel yakınlığın belirlenmesi için kullanılan güçlü bir araçtır. Bu diziler öncelikli olarak oligonükleotid kataloglama, klonların dizilenmesi, revers transkriptaz kullanılarak RNA'nın doğrudan dizilenmesi ve PZR ile çoğaltılmış materyalin dizilenmesini içeren yöntemlerle elde edilmiştir (Weisburg, 1991).

Ash ve arkadaşları (1991), 51 *Bacillus* türünün 16S rRNA gen bölgelerinin karşılaştırılması ile ilgili yapmış oldukları çalışmada cins içerisinde filogenetik olarak en az beş farklı grubun oluştuğunu belirlemişlerdir. DNA hibridizasyon yöntemiyle *B. antracis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'in 16S rRNA dizi analizlerinin çok yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (>% 99).

1.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, özgün DNA dizilerinin in vitro ortamda enzimatik olarak sentezleme yöntemidir. Polimeraz zincir reaksiyonu hedef DNA'nın milyonlarca kez çoğalmasını sağlayan güçlü bir tekniktir. Bu teknik DNA'nın bilinen bölgesinin çoğaltılmasında ya da hakkında çok az şey bilinen izolatların genetik olarak kıyaslanmasında kullanılabilir (Glare vd., 2000).

PZR, *B. thuringiensis* ve diğer bakterilerde *cry* genlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve belirlenmesi için kullanılan çok güçlü ve yaygın bir yöntemdir. *B. thuringiensis* ait birçok toksin geni analiz edilmiş ve özelleşmiş primerler şeklinde PZR tekniğinde toksin genlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılmıştır (Zeigler, 1999; Glare ve

O'Callaghan, 2000). Carozzi ve arkadaşları (1991), farklı δ -endotoksinleri tanımlamak için PZR analizini geliştirmişler ve toksin genlerinin üç büyük sınıfı arasındaki farklılığı belirleyen 12 adet primer geliştirmişlerdir. Yeni suşların tanımlanması ve insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi için PZR'ın hızlı ve kesin sonuç veren bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, PZR yöntemi çok daha az bulunmasına rağmen, *cyt* genlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Glare vd., 2000).

1.4.3.3. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan birisi sıkça kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamele edilerek incelenmesidir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon endonükleaz enzimi sentezler. Esas görevleri dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markırları taşıyan genetik materyalleri parçalayarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır. Bu, gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA'yı iki parçaya ayırır. Bu enzimlerin birçoğunun tanıdığı bölge tekrarlayan diziler şeklindedir. Yeni oluşan parçalar palindromiktir (Akar, 1998).

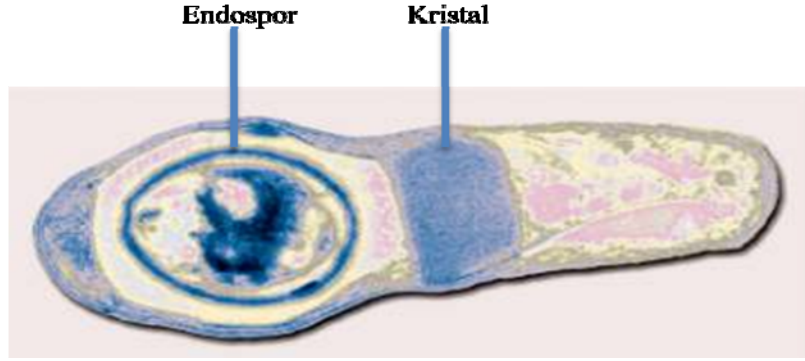
RFLP *cry* toksin genlerinin yeni varyantlarını belirlemek için PZR ile birlikte kullanılmaktadır (Kuo vd., 1996)

1.5. *Bacillus thuringiensis*

1.5.1. *Bacillus thuringiensis*'lerin Genel Özellikleri

Bacillus thuringiensis, *Bacillaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. *B. thuringiensis* Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarındaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin üreten, spor oluşturan, Gram-olumlu ve aerobik bir toprak bakterisidir (Şekil 5). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga böcek grupları üzerinde ve ayrıca

nematodlar, keneler ve protozoonlar üzerinde de etkili oldukları tespit edilmiştir (Feitelson,1993).



Şekil 5. *B. thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskopik görünümü

B. thuringiensis, *B. cereus*, *B. mycoides* ve *B. anthracis*' ile içeren *Bacillus cereus* grubunun bir üyesidir. *B. thuringiensis* yalnızca sporulasyon sırasında özellikle Lepidoptera (kelebekler), Coleoptera (kırkanatlılar) ve Diptera (iki kanatlılar, sinekler) takımı böcekler üzerinde toksik etki gösteren bir ya da daha fazla inklüzyon cisimcikler üretmeleriyle *B. cereus*'dan ayrılır (De Barjac, 1981).

1.5.2. *Bacillus thuringiensis*'lerin Tarihi

B. thuringiensis ilk kez 1901 yılında Japon bakteriologu Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Hannay (1955) *B. thuringiensis*'in spor morfolojisini ve parasporal yapı olarak adlandırılan inklüzyon yapılarını açıkladı. Ayrıca, parasporal yapının böcek toksiditesi ile ilgili olduğunu gösterdi. İpek böceği larvalarının orta bağırsaklarında *B. thuringiensis*'in spor oluşmuş hücrelerinde toksik bir maddenin meydana geldiğini tespit etti. Daha sonra aynı araştırmacı toksik maddenin parasporal yapı içinde olduğunu keşfetti. Hannay (1955) adlı araştırmacı bu yapının protein yapıda olduğunu belirledi.

1.5.3. *Bacillus thuringiensis*'lerin Plazmitleri

B. thuringiensis suşları yaklaşık 2,4 ile 5,7 milyon baz çifti uzunluğunda bir genomu sahiptir (Carlson, 1994). *B. thuringiensis* 2 ile 11 tane plazmit içermektedir (Gonzalez, 1981). İnsektisidal proteini kodlayan genler plazmitler üzerinde yer almaktadır. Büyük ve küçük plazmitler üzerinde bulunan *cry* genlerinin etrafında çok sayıda hareketli bölgeler bulunmaktadır. Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*'den diğerine kendiliğinden transfer olabilme yeteneğine sahiptir.

1.5.4. *Bacillus thuringiensis*'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

Erken zamanlarda *B. thuringiensis* türleri morfolojik ve biyokimyasal karakterleri esas alınarak alt türler sınıflandırılmaktaydı. Son zamanlarda ise sınıflandırma için farklı yöntemler kullanmaya başlanmıştır. Bu yöntemler; faj tiplemesi, vejetatif hücrelerin esteraz görünümleri, kristal serolojileri, plazmit şekilleri, oligonükleotid probing ve H-flagella serotipleridir. *B. thuringiensis*'lerin sınıflandırmaları için bu metotlardan, H-flagella antijenleri kullanılarak yapılan serotiplendirme yöntemi en geniş kullanılan, basit ve pratik bir metottur (Hansen, 1998).

Serotip ile sınıflandırma morfolojik ve biyokimyasal kriterler ile desteklenmektedir (de Barjac, 1981). Bin dokuz yüz yetmiş yedi yılına kadar, sadece 13 *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır ve bunların da Lepidoptera larvalarına karşı toksik olduğu bulunmuştur. Daha sonra Diptera takımına, Coleoptera takımına (Krieg vd., 1983) ve nematodlara (Narva vd., 1991) karşı toksik olan diğer alttürlerin keşfi *B. thuringiensis* alttürlerinin sayısını artırmıştır. Lenin ve arkadaşları (2007), flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 80 *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır (Tablo 2). Serovarların mevcut listesi Paris'deki Pasteur Enstitüsü'nden elde edilebilmektedir (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, France).

Tablo 2. Mevcut *B. thuringiensis*'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması (Lenin vd., 2007).

Sıra No	<i>B. thuringiensis</i> subsp.	Flagella antijenleri	Toksisite *	Sıra No	<i>B. thuringiensis</i> subsp.	Flagella antijenleri
1	<i>thuringiensis</i>	1	L, D	41	<i>jegathesan</i>	28a, 28c
2	<i>finitimus</i>	2		42	<i>amagiensis</i>	29
3	<i>alesti</i>	3a, 3c	L	43	<i>medellin</i>	30
4	<i>kurstaki</i>	3a, 3b, 3c		44	<i>toguchini</i>	31
5	<i>sumiyoshiensis</i>	3a, 3d		45	<i>cameroun</i>	32
6	<i>fukuokaensis</i>	3a, 3d, 3e	D	46	<i>leesis</i>	33
7	<i>sotto</i>	4a, 4b	L	47	<i>konkukian</i>	34
8	<i>kenyae</i>	4a, 4c	L, D	48	<i>seoulensis</i>	35
9	<i>galleriae</i>	5a, 5c		49	<i>malaysiensis</i>	36
10	<i>canadensis</i>	5a, 5c	L	50	<i>anadalousiensis</i>	37
11	<i>entomocidus</i>	6	L	51	<i>oswaldocruzi</i>	38
12	<i>aizawai</i>	7	L, D	52	<i>brasiliensis</i>	39
13	<i>morrisoni</i>	8a, 8b	L, D, C	53	<i>huazhongensis</i>	40
14	<i>ostrinae</i>	8a, 8c	L	54	<i>sooncheon</i>	41
15	<i>nigeriensis</i>	8b, 8d		55	<i>jinghongiensis</i>	42
16	<i>tolworthi</i>	9	L, D	56	<i>guiyanguesbus</i>	43
17	<i>darmstadiensis</i>	10a, 10b	L, D	57	<i>higo</i>	44
18	<i>londrina</i>	10a, 10c		58	<i>roskildiensis</i>	45
19	<i>toumanoffi</i>	11a, 11b		59	<i>chanpaisis</i>	46
20	<i>kyushuensis</i>	11a, 11c	L, D	60	<i>wratislaviensis</i>	47
21	<i>thompsoni</i>	12	L, D	61	<i>balearica</i>	48
22	<i>pakistani</i>	13		62	<i>muju</i>	49
23	<i>israelensis</i>	14	D	63	<i>navarrensensis</i>	50
24	<i>dakota</i>	15		64	<i>xiaguangiensis</i>	51
25	<i>indiana</i>	16		65	<i>kim</i>	52
26	<i>tohokuensis</i>	17		66	<i>asturiensis</i>	53
27	<i>kumamotoensis</i>	18a, 18b	C	67	<i>poloniensis</i>	54
28	<i>yosoo</i>	18a, 18c		68	<i>palmanyolensis</i>	55
29	<i>tochigiensis</i>	19		69	<i>rongseni</i>	56
30	<i>yunnanensis</i>	20a, 20b	L	70	<i>pirenaica</i>	57
31	<i>pondicheriensis</i>	20a, 20c	L	71	<i>argentinensis</i>	58
32	<i>colmeri</i>	21		72	<i>iberica</i>	59
33	<i>shandongiensis</i>	22	L	73	<i>pingluonsis</i>	60
34	<i>japonensis</i>	23	C	74	<i>sylvestriensis</i>	61
35	<i>neoleonensis</i>	24a, 24b		75	<i>zhaodongensis</i>	62
36	<i>novosibirsk</i>	24a, 24c		76	<i>bolivia</i>	63
37	<i>coreanensis</i>	25		77	<i>azorensis</i>	64
38	<i>silo</i>	26		78	<i>pulsiensis</i>	65
39	<i>mexicanensis</i>	27	L	79	<i>gracioensis</i>	66
40	<i>monterrey</i>	28a, 28b		80	<i>vazensis</i>	67

L: Lepidoptera larvaları, D: Diptera larvaları, C: Coleoptera larvaları

1.5.5. *Bacillus thuringiensis*'lerin İnektisidal Genleri

B. thuringiensis'ler büyüme döngüsünün durgun fazı süresince inektisidal kristal protein içeren kristal yapıda parasporal inklüzyonlar üretir. Bu toksinler çoğunlukla *B. thuringiensis*'e özgüdür. Ancak, bu proteinlerin *Bacillus popilliae* ve *Clostridium bifermentas* gibi diğer bakteriler tarafından da üretilebildiği belirlenmiştir (Schnepf vd., 1998). Şu ana kadar bu proteinleri kodlayan 89 farklı genin analizi yapılmıştır. Bu genler, *B. thuringiensis*'in büyüme döngüsünün durgun fazı sırasında ifade olurlar. Bu genlerin ifade edilmesi mRNA sentezi, mRNA sentezi sonrası ve protein sentezi sonrası seviyelerde kontrol edilir (Schnepf vd., 1998). Sporulasyon mRNA sentezi aşamasında σ faktörünün aktivasyonu ile kontrol edilir ve bu nedenle de *cry* genlerin ifadesi eş zamanlı olarak kontrol edilmiş olur. Çünkü, çoğu kristal genler büyümenin yalnızca sporulasyon aşamasında sentezlenir (Schnepf vd., 1998).

Höfte ve Whiteley (1989), *cry* toksinlerini kodlayan 50'den fazla genin analizini yapmış ve bu genler dizilerindeki benzerliğe dayanarak 15 gruba ayrılmıştır. Bununla birlikte *cry* toksin genleri *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5* olmak üzere 5 büyük grup halinde incelenmektedir. Son zamanlarda Neil Crickmore *Bacillus* genetik stok merkezinin başkanlığını yapmakta olup, yeni *cry* ve *cyt* genlerinin isimlendirilmesinde rol almaktadır. Neil Crickmore (2009)'un başkanlığını yaptığı "full toksin" verilerine bakıldığında *cry* genleri *cry1*'den *cry58*'e kadar sınıflandırıldığı gözlenmektedir (Ek Tablo 1).

1.5.5.1. *cry1* Genleri

Lepidoptera takımına özgü kristal proteinler şüphesiz en iyi çalışılmış olan proteinlerdir. Bu proteinler plazmit DNA üzerinde bulunan *cry1* genleri tarafından sentezlenmektedir. Analizi yapılan *cry1* genlerinin hepsinin de *B. thuringiensis*'in sporulasyonu sırasında baklava dilimi şeklinde kristal yapıda inklüzyonlar içerisinde biriken 130–140 kDa ağırlığında proteinler kodladığı belirlenmiştir. Protoksinler, proteolitik olarak kristalle ilgili ya da larva orta bağırsak proteazları tarafından 60–70 kDa ağırlığında toksik fragmentlerine dönüşürler (Höfte and whitely, 1989).

cry1 genleri benzer homolojileri ile diğer *cry* genlerden ayrılabilirler. *cry1A(a)*, *cry1A(b)* ve *cry1A(c)* genleri % 80'den daha fazla aminoasit benzerliği gösterirler ve bu

nedenle ayrı bir alt grup olarak değerlendirilirler. Tanımlanan *cry1B*, *cry1C* ve *cry1D* genleri *cry1A* genlerinden ve birbirlerinden oldukça farklıdır (Kronstad vd., 1986).

1.5.5.2. *cry2* Genleri

cry2 genleri *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis berliner* ve *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* ve *kenyae* gibi çeşitli alt türlerde bulunmaktadır. Bu gen 65 kDa ağırlığında bir proteini kodlar ve bu protein kübik yapıli kristallerde toplanır. Bu kristal proteinler ilk olarak aynı suşta bulunan 130 kDa ağırlığındaki P1 proteinine karşılık P2 proteini olarak tanımlanmıştır (Yamamoto ve McLaughlin, 1981). Widner ve Whiteley (1989), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1'den *cry2A* ve *cry2B* genlerini klonladılar. Her iki gen de 633 aminoasit dizisine sahip 71 kDa ağırlığında birer proteini kodlar. Bu genler *E. coli*'de ifade edilmiş ve rekombinant proteinler saflaştırılmıştır. İki protein oldukça benzer olmalarına rağmen, insektisidal etkileri farklı bulunmuştur. *cry2A*'nın hem Lepidoptera (*Manduca sexta*) hem de Diptera (*Aedes aegypti*) larvalarına karşı, *cry2B*'nin ise sadece Lepidoptera larvalarına karşı toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu iki toksin, % 87 oranında birbirine benzerdir (Widner ve Whiteley, 1989).

1.5.5.3. *cry3* Genleri

Şimdiye kadar *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* subsp. *san diego* ve *B. thuringiensis* EG2158 olmak üzere Coleoptera takımına özgü 3 *B. thuringiensis* suşu tanımlanmıştır. Suşların her biri bir büyük protein içeren eşkenarlı kristaller üretir. Klonlama ve dizi analizleri üç türün hepsinde de aynı kristal protein geninin bulunduğunu göstermektedir. *cry3* genleri Cry3 A, B, C, D ve E toksinlerini oluştururlar (Sekar ve Carlton, 1985). *cry3* genleri yaklaşık 73 kDa büyüklüğünde protoksinleri kodlamaktadır. Bu protoksinler, proteolitik parçalanmada ilk olarak 67 kDa'na dönüşürler. Daha sonra larvanın bağırsağında 55 kDa'lık toksini oluştururlar (Carroll vd., 1989). Cry3A ve Cry3B proteinleri % 75 oranında benzerdir. Cry3D proteini % 74 Cry3A'ya, % 61 Cry3B ve % 33 Cry3C proteinlerine benzerdir (Lambert vd., 1994).

E. coli'de ifade edilen bu gen Colorado patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) için toksik olan 72 kDa ağırlığında bir proteini sentezler. Bu protein, sporla ilgili proteazlar tarafından 66 kDa ağırlığında bir proteine dönüştürülür (Höfte ve Whiteley, 1989).

1.5.5.4. *cry4* ve *cyt* Genleri

Kristal protein genlerinin *cry4* sınıfı, Diptera takımına özgü kristal protein genlerinin oldukça heterojen bir grubundan oluşur. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* suşunda bulunan 72 MDa büyüklüğündeki plazmitten izole edilen *cry4A*, *cry4B*, *cry4C* ve *cry4D* genlerinin kodladığı proteinler sırasıyla 135, 128, 78 ve 72 kDa ağırlıklarındadır. Bu proteinler, 27 kDa ağırlığındaki *cyt* geninin ürünü ile birlikte yuvarlak yapılı kristallerde toplanırlar (Höfte ve Whiteley, 1989).

1.5.6. *cry* Genlerinin Klonlanması

Rekombinant DNA yöntemi kullanılarak *cry* geninin klonlanmasındaki asıl amaç *B. thuringiensis* suşların üretim açısından daha uygun hale getirmek ve toksisiteyi artırmaktır. Schenpf ve Whiteley (1981), ilk kez 1981 yılında *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* bakterisinden *cry* geni klonladı ve bu gen *E. coli* bakterisinde ekspres edildi. Rekombinant *E. coli* suşu, *B. thuringiensis* kristallerinden aynı boyuta sahip bir peptitten geliştirilmiş bir antikor ile pozitif reaksiyon gösteren 130 kDa bir protein sentezledi. Kalman ve arkadaşları (1993), spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan PZR ürünlerinin farklı elektroforetik hareketliliğine dayalı olarak, *B. thuringiensis gallariae*'den yeni bir *cry1C* geni (*cry1Cb*) klonladı. Chak ve arkadaşları (1994), *cry1C* genini klonlama vektörü olan pSB 744 ve pSB 745 rekombinant plasmidi içerisindeki *B. subtilis*'ten alfa-amilaz promotörü boyunca yerleştirdi ve *B. thuringiensis* subsp *kurstaki cry-B* genini HD73'de ekspres etti. Shin ve arkadaşları (1995), *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 ve *B. thuringiensis* subsp *entomocidus* BP 465'ten sırasıyla *cryV1* ve *cryV465* olmak üzere iki *cryV* tipi gen klonladı ve nükleotid sırasını belirlediler. *cryV465* proteini yalnızca *Plutella xylostella*'ya karşı toksisite gösterirken, klonlanan *cryV1* proteini, *P. xylostella* Lin ve *Bombyx mori*'nin ikisine birden toksik özellik gösterdi.

Delecluse ve arkadaşları (1995), sivrisineklere karşı öldürücü olan *B. thuringiensis* subsp *jegathesan* bakterisinden 81 kDa kristal proteinini kodlayan *cry11B* genini klonladılar. *cry11B* proteininin dizilimi *B. thuringiensis* subsp *israelensis*'ten *cry11A* toksini (CryIVD)'ne karşı yüksek homojenlik gösterdi. Yeni geliştirilen sivrisinek öldürücü bir protein geni olan *cry20Aa*, *B. thuringiensis* subsp *fukuokaensis* (H-3a; 3d: 3e)'den klonlanmıştı. Gen ürünü 86 kDa'lık yüksek bir moleküler ağırlığa sahiptir. Aminoasit karşılaştırmaları *cry20Aa*'nın tamamen farklı bir protein olduğunu ortaya koydu. İki yeni kristal proteini (*cry19A* ve Orf2), sırasıyla 74,7 kDa protein ve 60 kDa proteinlerini kodlayan *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*'dan izole edilmiştir. Sasaki ve arkadaşları (1997) *B. thuringiensis* serovar *sotto* SKWO1-10.2-06'dan bir *cry2A* geni klonladı ve *cry2* (SKW) olarak adlandırdı. Klonlanan gen tarafından üretilen proteinin *Bombyx mori*'ye karşı toksik olduğu belirlendi. *cry11a* hem *P. xylostella* hem de *B. mori* üzerinde etkiliydi. Yeni bir *cry11d* proteini *P. xylostella*'a karşı *cry11a* kadar toksikti ancak *B. mori*'ye karşı etkinliği daha azdı. Yeni *B. thuringiensis* suşundan (47-8) elde edilen *cry2A* proteini, *Helicoverpa armigera* (Yeşilkurt)'ya karşı etkili olduğu bulundu.

1.5.7. *cry* Genlerinin Ekspresyonu

Rekombinant plazmitlerin transferinde konjugasyon ve transdüksiyon yöntemleri yıllardır kullanılmaktadır. Günümüzde klonlanmış *cry* genlerinin *B. thuringiensis*'e girişini kolaylaştırmak için birçok *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle vektörleri geliştirilmiştir. Bu plazmitlerden bazıları, başka gram pozitif bakterilerden elde edilen replikonları kullanırken, bazıları öz *B. thuringiensis* plazmitlerinden izole edilmiş replikonları kullanır. Klonlanmış *cry* genlerini, yerleşik plazmitlerin içine veya kromozoma, homolog rekombinasyon aracılığıyla yerleştirmek için bu shuttle vektörlerine ilave olarak integrasyonel vektörler kullanılmaktadır.

Birçok durumda *B. thuringiensis* konak suşuna, klonlanmış *cry* geni transferi toksisite için gelişmiş bir spektrum oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. *cry3Aa* ve *cry3Bb* genlerinin tek özelliği, sporlanmadan bağımsız olmasıdır ve durgun faz boyunca muhtemelen faz regülatörleri tarafından indirgenebilir veya baskılanabilir olmasıdır. Bu sporlanmada bağımsız promotörler, *cry* proteinlerine bağımlı sporlasyonun üretimini geliştirmede yararlı olabilir.

Heterojen rekombinasyon, sadece cry genlerini ev sahibi plazmide veya kromozoma entegre etmek için değil, ilgili genleri parçalamak için de ayrıca kullanılabilir. Son zamanlarda kristal proteinlerin kararlılığının alan koşulları altındaki iyileştirilmesi konusu büyük dikkat çekmişti. Bununla mücadele etmek için bilim adamları DNA manipülasyonları yoluna gittiler ve klonlanmış cry genlerini başka mikroorganizmalarda ekspres ettiler. Bu tür bir ekspresyon, Monsanto bilim adamları tarafından cry1Ab genini köklerde kolonize olan *Pseudomonas fluorescens* bakterisinde ekspresyon gerçekleştirilmiştir. Bunun ardından cry proteinlerinin gelişmiş çevresel iletimlerini sağlamak amacıyla çok çeşitli organizmalara cry geni aktarılması için birçok denemelerde bulunulmuştur. Başarılı bir şekilde farklı konağa aktarılan ve ekspres edilen cry proteinleri mevcut olup, doğadaki canlılara pozitif özellik kazandırmaktadır (Tablo 3).

1.5.8. *Bacillus thuringiensis*'ler Tarafından Üretilen Bileşikler

B. thuringiensis suşlarının farklı toksinler ürettikleri bilinmektedir. 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 vd., 1998).

1.5.8.1. Beta-Ekzotoksinler

Beta-ekzotoksinler (β -ekzotoksin) *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* gibi bazı *B. thuringiensis* alttürleri ile ilgilidir. Bu alttürler tarafından sentezlenen ürünler toksin içerirler. β -ekzotoksinler adenin, glukoz ve allarik asitten oluşur. RNA polimeraz enzimini inhibe ederek RNA'nın sentezlenmesini engeller. Bu nedenle de Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera takımındaki çeşitli böceklere karşı toksik etki gösterir (Glare vd., 2000; Damgaard vd., 1996).

Tip I ve tip II olmak üzere iki tip β -ekzotoksin bulunmaktadır. Tip I β -ekzotoksinler *B. thuringiensis* serotip 1, 9 ve 10 nolu suşlarından, tip II β -ekzotoksinler, *B. thuringiensis* suşunda yapılan araştırma sonucunda β -ekzotoksinlerin δ -endotoksinleri kodlayan bir plazmit tarafından kodlandığı belirlenmiştir. β -ekzotoksinler böceğin sindirim sisteminde etkisiz hale getirilmektedir. Ancak, etkili yüksek bir doz kullanıldığında böcekler üzerinde etki gösterebilmektedir (Tanada ve Kaya, 1993).

Tablo 3. *cry* genlerinin farklı konaklarda ekspresyonu ve avantajları (Lenin vd., 2007)

Cry proteinleri	Mikrobiyal Konak	Avantajları	Referans
Cry1Ac	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Yaprak direnci	1987'den berin Mykogen ürünün ürünleri
Cry3A	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Baklagillerin kökleriyle böceklerin beslenmesinin kontrolü	(Stock vd., 1990)
Cry1Ac	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Tütünde <i>Maduca sexta</i> ve <i>Heliothis virescens</i> 'in kontrolü	(Stock vd., 1990)
Cry4B	<i>Caulobacter crescentus</i>	Su içerisinde sivrisinek larvalarının kontrolü	(Thanabalu vd., 1992)
CryIVD	<i>Agmenellum quadruplicatum</i> PR-6 (<i>Cyanobacterium</i>)	Sivrisinek larvalarının kontrolü	(Murphy ve Stevens, 1992)
Cry1Aa	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>H. armigera</i> 'ya karşı tütün bitkisinin uzun süreli korunması	(Bora vd., 1992)
Cry1Ac	<i>Clavibacter xyli</i>	Böceklerin beslenmesinin kontrolü	(Lambert vd., 1994)
Cry2A	<i>Bacillus cereus</i>	Domates bitkisinde <i>Heliothis virescens</i> 'in kontrolü	(Moar vd., 1994)
Cry1Aa	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Gizli zararlıların kontrolünü amaçlamıştır fakat transgene kararlı değildi	(Udayasuriyan vd., 1995)
Cry4A Cry11A	<i>Anabaena sp.</i> PCC 7120	Sivrisineklerin kontrolü	(Xiao Qiang vd., 1997)
Cry1Ac	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Şeker kamışına karşı <i>Eldana saccharina</i> 'nın kontrolü	(Herrera vd., 1997)
Cry11A	<i>Bacillus sphaericus</i>	Sivrisineklerin kontrolü	(Poncet vd., 1997)

1.5.8.2. Hemolizinler

Omurgalı eritrositlerini parçalayan hemolizinler, omurgalı bakteriyel patojenler içinde önemli virulans faktörlerdendir. Genel olarak insanlarda sistematik hastalıkların belirlenmesinde önemli bir faktördür. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'den saflaştırılan bir hemolizinin *B. cereus*'da bulunan hemolizin ile aynı olduğu belirlenmiştir (Matsuyama vd., 1995).

1.5.8.3. Enterotoksinler

B. thuringiensis izolatlarının *B. cereus*-diyarel tip enterotoksin ürettikleri bulunmuştur. *B. cereus* enterotoksinleri *B. cereus*'un sindirimini izleyen besin zehirlenmesi belirtilerinden sorumludur (Abdel Hamed ve Landen, 1994; Carlson vd., 1994). Abdel-Hameed ve Landen (1994), İsveç topraklarından izole edilen 40 *B. thuringiensis* suşundan 23'ünün (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *thuringiensis*, *galleria*, *dendrolimus*, *darmstadiensis* ve *israelensis* olarak tiplendirilen) *B. cereus* diyarel enterotoksin ürettiklerini belirlemişlerdir. Damgaard ve arkadaşları (1996) çeşitli yiyeceklerden enterotoksin üreten *B. thuringiensis* suşları izole etmişler ve enterotoksin aktivitelerini belirlemek için susların Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Te-Giffel ve arkadaşları (1997) enterotoksin üreten iki suşu ilk olarak *B. cereus* olarak tanımladıklarını daha sonra 16S rRNA problemleri kullanılarak yapılan tanımlama sonucunda *B. thuringiensis* olarak tanımladıklarını rapor etmişlerdir.

1.5.8.4. Ekzoenzimler

B. thuringiensis böceklere karşı patojenik etkiye sahip çeşitli ekzoenzimler üretirler. Örneğin, *B. thuringiensis* tarafından proteaz ve kitinaz peritrofik zarın yapısını bozarak bağırsak epitelinden rahatlıkla geçebilmektedir (Sampson vd., 1998).

1.5.8.5. Vejetatif İnektisidal Proteinler (VIP)

Son yıllarda, bazı *B. thuringiensis* izolatlarının sporulasyon aşaması sırasında üretilen cry proteinlere ilave olarak, vejetatif büyüme döneminde bir takım proteinler ürettikleri belirlenmiştir. Vejetatif inektisidal proteinler (VIP) olarak isimlendirilen bu proteinler Lepidoptera takımı böceklerin büyük bir kısmına karşı inektisidal aktivite gösterirler (Estruch vd., 1996).

1.5.8.6. İnektisidal Kristal Proteinler (ICP)

Bazı *B. thuringiensis* suşları küçük yapıda 25–28 kDa ağırlığında sitolitik (cyt) endotoksinler üretirler. Bunlar *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ve *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG14' den izole edilmiş Cyt1A ve *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*'den izole edilmiş Cyt2A toksinlerini içerirler (Glare ve O'Callaghan, 2000).

Cyt endotoksinler kristal yapıdaki inklüzyon cisimciklerinde Cry δ -endotoksinlerle birlikte depo edilirler. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'den izole edilen Cyt1A endotoksini karakterize edilen ilk Cyt endotoksindir. Cyt1A endotoksini (27,3 kDa) total kristal proteinin % 40'nı oluşturur. Cyt1A proteinini kodlayan genler 125 kb büyüklüğündeki bir plazmit üzerinde taşınır. Kristaller alkali ortam koşullarında çözülürler. Çözülen Cyt1A toksini hem eritrositler hem de böcek hücre kültürlerine karşı sitolitik aktivite gösterirken, çözünmeyen Cyt1A toksinleri hiçbir sitolitik aktivite göstermezler (Glare ve O'Callaghan, 2000).

Sporulasyon sırasında, *B. thuringiensis* suşlarının büyük bir kısmı inektisidal δ -endotoksinleri içeren kristal yapıda inklüzyonlar üretir. Bu proteinleri taşıyan kristaller sporulasyondaki toplam bakteri proteininin % 20–30'unu oluşturur (Boucias ve Pendland, 1998). Bu kristal inklüzyonlar monomerik yapıdaki 130–140 kDa ağırlığındaki proteinlerden oluşur. Proteolitik enzimler tarafından inklüzyonların parçalanması sonucunda daha küçük toksik proteinler (δ -endotoksinler) açığa çıkar. Bunlar, suşlar arasında çeşitlilik gösterirler fakat, çoğu durumlarda *B. thuringiensis* suşları δ -endotoksinlerin karışımını içeren inklüzyonlar üretir. Örneğin, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 suşu aynı kristalde 3 tane Cry1 (130 kDa) ve iki tane Cry2 (70 kDa) endotoksini içerir. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*'de olduğu gibi diğer *B. thuringiensis*

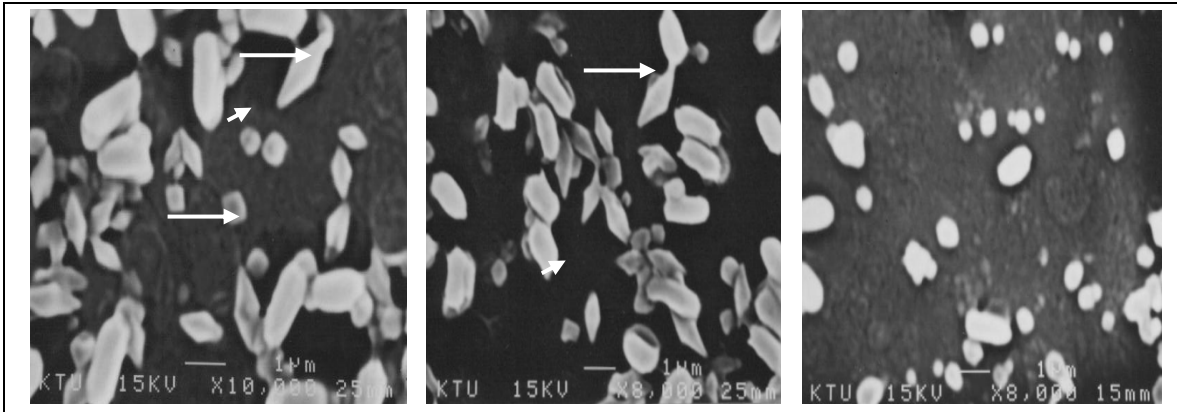
suşları da tek bir endotoksin taşıyabilirler (Glare ve O'Callaghan, 2000). *B. thuringiensis*'e ait δ -endotoksinler, aktivitelerine göre beş önemli sınıfa ayrılırlar (Tablo 4).

Tablo 4. Aktivitelerine göre *B. thuringiensis* δ -endotoksinler

Gen Sınıfı	Etkilediği Böcek Takımı	Referans
<i>cry1</i>	Lepidoptera takımına özgül	Schnepf vd., 1981
<i>cry2</i>	Lepidoptera ve Diptera takımına özgül	Schnepf vd., 1981
<i>cry3</i>	Coleoptera takımına özgül	Krieg vd., 1983
<i>cry4</i>	Diptera takımına özgül	Widner ve Whiteley, 1989
<i>cry5</i>	Nematodlara özgül	Narva vd., 1991

İnsektisidal kristal protein bileşimine bağlı olarak, kristaller farklı şekillerde bulunabilirler. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucunda baklava dilimli (bipiramidal), kübik ve yuvarlak olmak üzere çeşitli şekillerde kristal yapıları belirlenmiştir (Şekil 6). Baklava dilimli kristaller daha çok Lepidoptera larvalarına karşı aktif iken, kübik ve yuvarlak yapıları kristaller hem Lepidoptera hem de Diptera larvalarına karşı toksik etki gösterirler (Tanada ve Kaya, 1993).

Kristal morfolojisi, insektisidal kristal protein bileşimi ve hedef böceğe karşı olan biyolojik aktivite arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Höfte ve Whiteley, 1989).



Şekil 6. Baklava dilimi şeklindeki kristal yapıların SEM görüntüsü (Kati., 2003).

Protoksinlerin, multijenik yapısı, moleküler büyüklüğü ve konak özgünlüğü Tablo 5'de görülmektedir. Sınıf 1'in *cry* genleri kristal inklüzyon içinde C ve N-uçlarında 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).

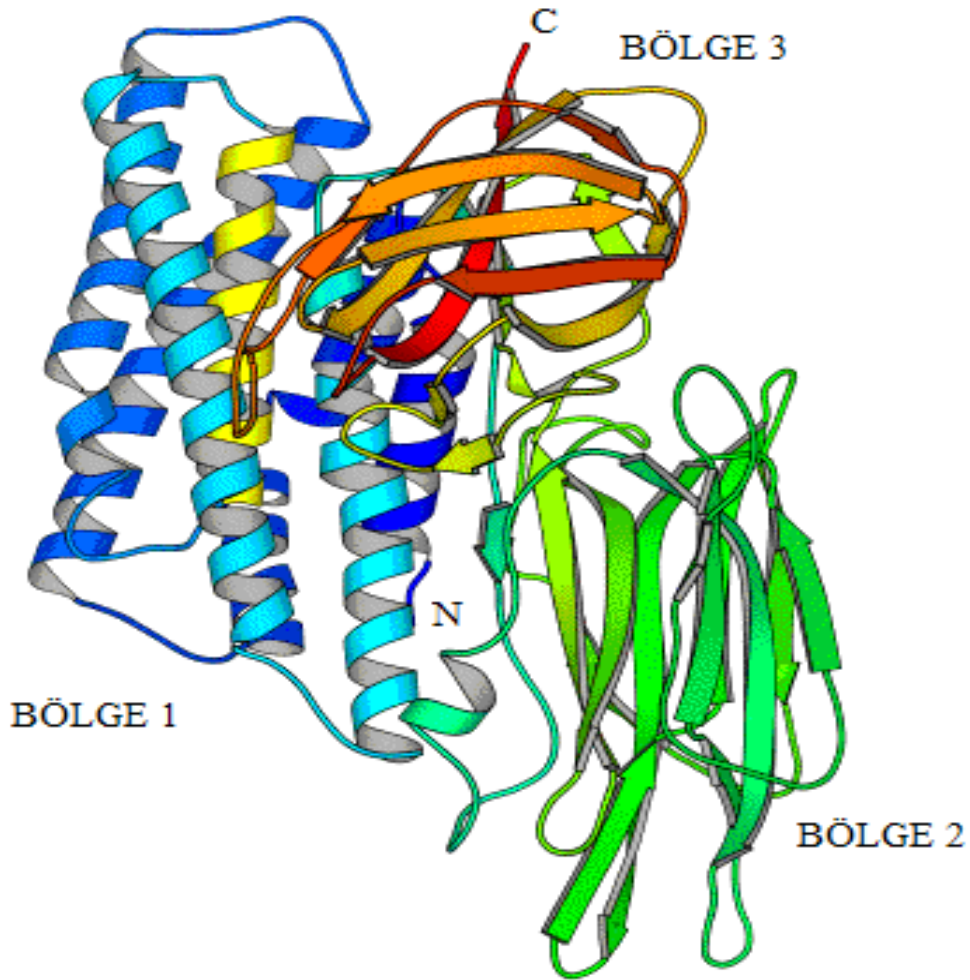
Tablo 5. Protoksin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı (Rukmini vd., 2000).

Gen	Alt Sınıf	Etkilediği Canlı 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	Nematod	72	30
<i>cry5</i>	5	Nematod	81.2	?

1.5.9. İnsektisidal Kristal Proteinlerinin Yapısı

B. thuringiensis'in Cry ve Cyt proteinleri por oluşturan toksinler olarak isimlendirilen bakteri toksinleri sınıfına aittir. Por oluşturan toksinler α -sarmal ve β -tabakalı toksinler olmak üzere iki temel grupta incelenirler. α -sarmal toksin grubunda kolisinler, ekzotoksin A ve üç bölgeli Cry toksinler yer almaktadır. β -tabakalı toksin grubunda ise aerolizin, α -hemolizin, antraks koruyucu antijen ve Cyt toksinleri yer almaktadır (Parker ve Feil, 2005).

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 7) (Höfte ve Whiteley, 1989; Li vd., 1991). Bölge I, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumludur. Bölge II'nin böcek bağırsağındaki epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanma ile ilgili görevi vardır. Bölge III'ün fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Ancak, diğer bir görüşe göre Cry toksinin bağırsak proteazları tarafından parçalanmasını önler (Li vd., 1991). Diğer bir görüşe göre de iyon kanallarının oluşumundan, reseptör bağlanmasından ve böcek özgünlüğünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 7. İnsektisidal kristal proteinlerin üç boyutlu kristal yapısı

Proteinler aktivitelerine bakılarak gruplandırılabilirler. Bu şekilde sınıflandırılmış kristal proteinler etki ettikleri böcek türlerine göre farklı sınıflara ayrılırlar (Tablo 6).

Tablo 6. Etkili oldukları hedef böcek türlerine göre kristal proteinler ve bu böcek türlerinin ait oldukları böcek grupları

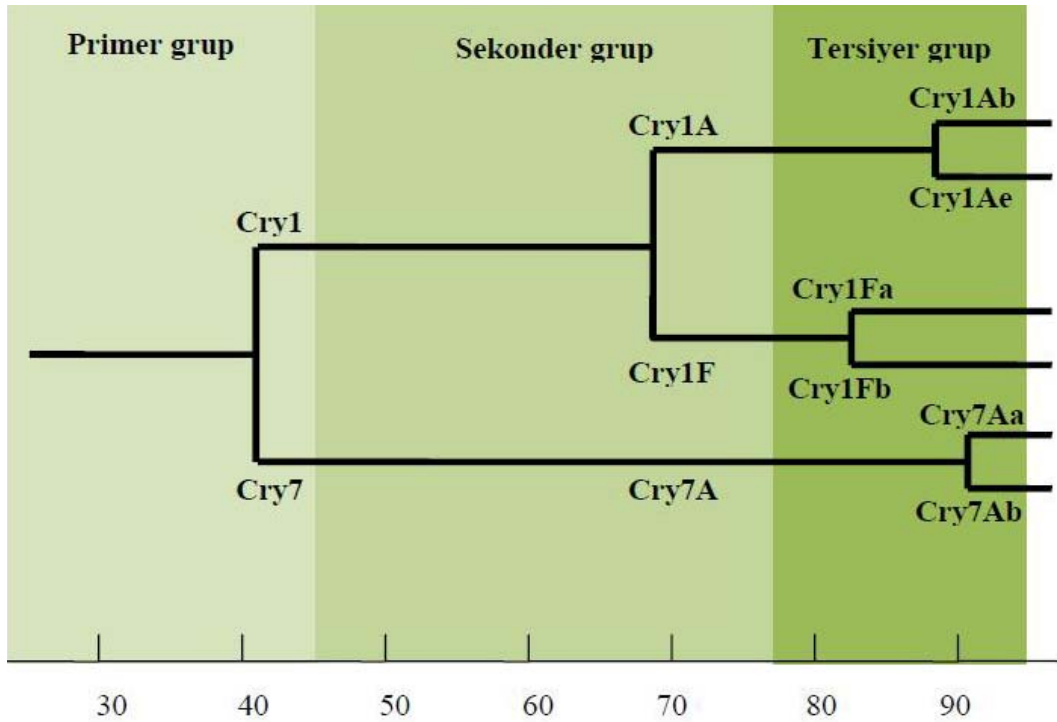
Böcek Grubu	Hedef Böcek Türleri	Kristal Protein
Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Malacosoma disstria</i> <i>Bombyx mor</i>	Cry1, Cry9, Cry15
Diptera	<i>Psychoda alternata</i> <i>Dixa spp.</i> <i>Tipula paludosa</i> <i>Chironomus plumosus</i>	Cry4, Cry10, Cry 11, Cry 16, Cry 19, Cry 20, Cry 24, Cry 25, Cry 27, Cry 29, Cry 30, Cry 39, Cry 40
Lepidoptera ve Diptera	<i>Heliothis virescens</i> <i>Trichoplusia ni</i> <i>Manduca sexta</i>	Cry2
Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Diabrotica undecimpunctata</i> <i>Melolontha melolontha</i> <i>Agelastica alni</i> <i>Pyrrhalta luteola</i> <i>Lasioderma serricorne</i> <i>Anomala cuprea</i>	Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry 34, Cry 35, Cry 36, Cry 38
Hymenoptera	<i>Monomorium pharaonis</i>	Cry22
Nematot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry21

1.5.10. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması

B. thuringiensis'in insektisidal aktivitesi insektisidal kristal proteinleri (ICP) sayesinde gerçekleşmektedir. İnsektisidal kristal proteinleri sırasıyla *cry* (kristal) ve *cyt* (sitolitik) genleri tarafından kodlanan kristal ve sitolitik proteinleri içerir. Höfte ve Whiteley (1989) kristal proteinleri, insektisidal aktivitesine ve moleküler ilişkilerine göre 5 büyük sınıfa ayırmıştır (Tablo 4). Ayrı bir sınıflandırmada da, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ICP'de ve bazı diğer *B. thuringiensis* alttürlerinde bulunan özgün olmayan sitolitik bir faktörü kodlayan sitolitik (*cyt*) genler için kullanılmaktadır. İki veya üç böcek grubunu kapsayan bir aktivite spektrumuna sahip olan yeni türlerin keşfi ile beraber bilim

adamları aminoasit sıra homolojisine dayanan yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmişlerdir (Schnepf vd., 1998).

Yeni sınıflandırma planını anlatan şema Cry proteinlerinin aminoasit sırasına dayandırılarak filogenetik bir ağacın oluşturulmasıyla gösterilmiştir. Bu filogenetik ağacın dallanma noktaları proteinlerin benzerlik olarak birbirinden uzaklaştığı noktaları temsil eder. % 95, % 78 ve % 45 oranındaki benzerlikler farklı sınıfları tanımlayan sınırları gösterir (Crickmore, vd., 1998). *B. thuringiensis*'in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü (Şekil 8)'deki gibidir. Farklı arka plan renkleri farklı sınıflandırma kısımlarını belirtir. Cry1 ve Cry7 % 45'den daha az benzerlik içerir, Cry1A ve Cry1F arasındaki benzerlik % 45 ile % 78 arasındadır ve Cry1Ab ve Cry1Ae arasındaki benzerlik % 78 ile % 95 arasındadır.



Şekil 8. *B. thuringiensis*'in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü

Höfte ve Whitely (1989) sınıflandırma sistemini kullanıldığı zaman bazı benzer sınırlamalara sahip olmaktadır. *B. thuringiensis* toksinlerinin gösterdiği homoloji farklı insektisidal spektrumlara sahiptir. Örneğin, *cry2A* geni Lepidoptera ve Diptera takımına karşı toksik iken, *cry2B* geni sadece Lepidoptera takımına karşı toksiktir.

Genom dizilimi üzerine yapılan çalışmalar sonucu üretilen verilerin sağlıklı biçimde düzenlenmesi, yeni bir nomenklatör paradizmini ortaya çıkarmaktadır. Bu kapsamda, revize edilen yeni bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır. *Bacillus* Genetik Stok Merkezi'nin 1998 yılında başkanı olan Neil Crickmore, yeni *cry* ve *cyt* genlerinin sınıflandırmasını aminoasit benzelik yüzdelerine göre belirlemiştir (Şekil 9).

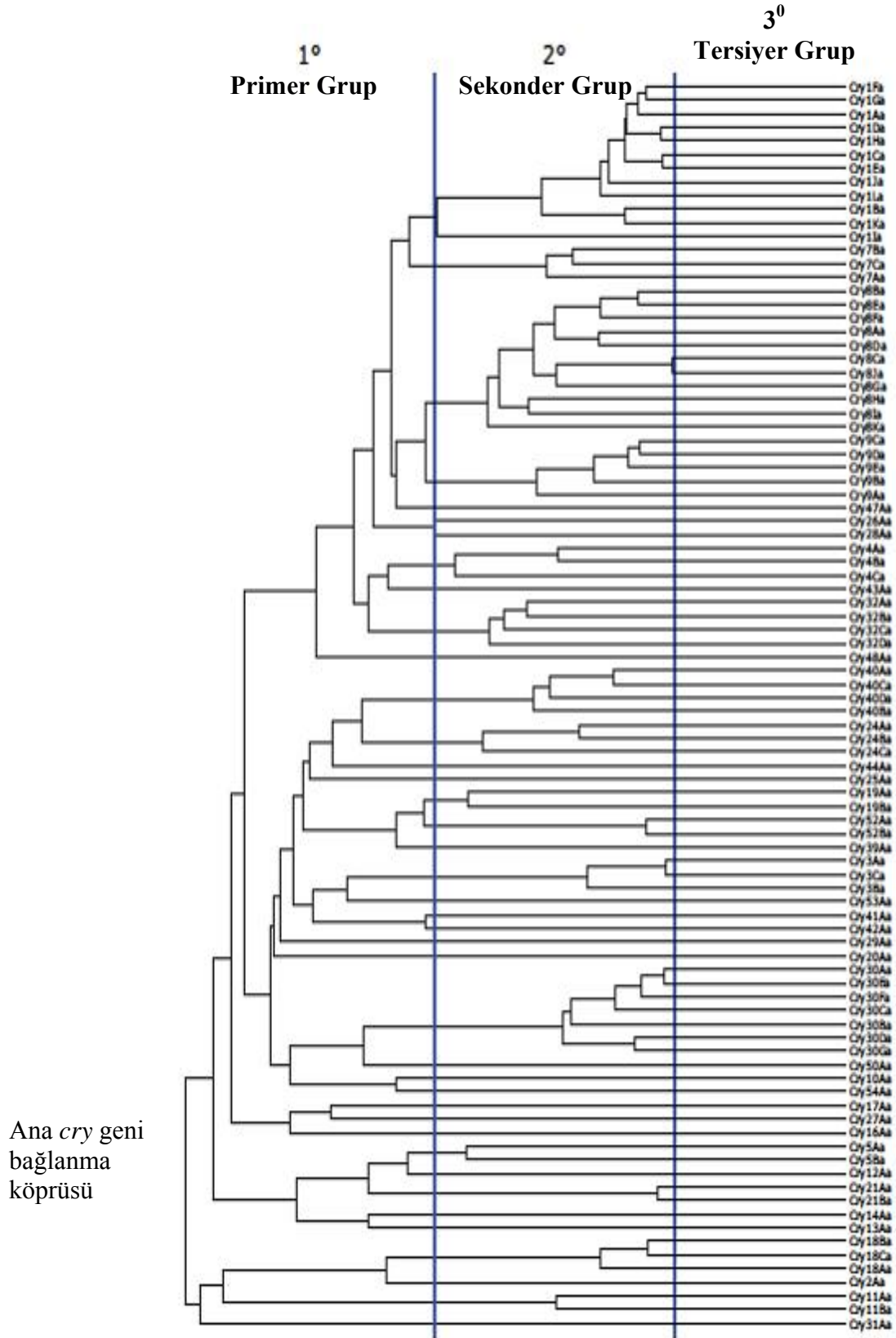
Neil Crickmore tarafından revize edilmiş nomenklatörün bazı önemli öğeleri aşağıdaki gibidir.

I. Ürünleri % 45'ten az aminoasit sıralama homolojisini paylaşan *cry* genleri, birincil dereceden numaralandırılmış farklı Arabik numaralarıyla karakterize edilir, (örneğin, *cry1*, *cry2* gibi).

II. Ürünleri % 78'den az aminoasit sıralaması homolojisi gösteren aynı birinci derecenin *cry* genleri, ikinci derecelerden büyük harfler kullanılarak ayrılır (örneğin, *cry1A*, *cry1B* gibi).

III. Ürünleri % 95'den daha az amino asit sıralama homolojisi paylaşan aynı birinci ve ikinci sırada olan *cry* genleri, küçük harfler kullanılarak dördüncü dereceden ayrılmış olur (örneğin, *cry1Aa*, *cry1Ab* gibi).

IV. Ürünleri farklı aminoasit sıralamasında olan, ancak birbiriyle % 95'in üzerinde benzerlik gösteren *cry* genleri, başka bir arabik numara ile ayrı bir dördüncü derece şeklinde verilir (örneğin, *cry1Aa1*, *cry1Aa2* gibi).



Şekil 9. Tüm Cry proteinlerinin aminoasit dizi benzerlik filogramı (Crickmore vd., 1998).

1.5.11. İnektisidal Kristal Protein (ICP)'lerin Hedef Böceklerdeki Etki Mekanizması

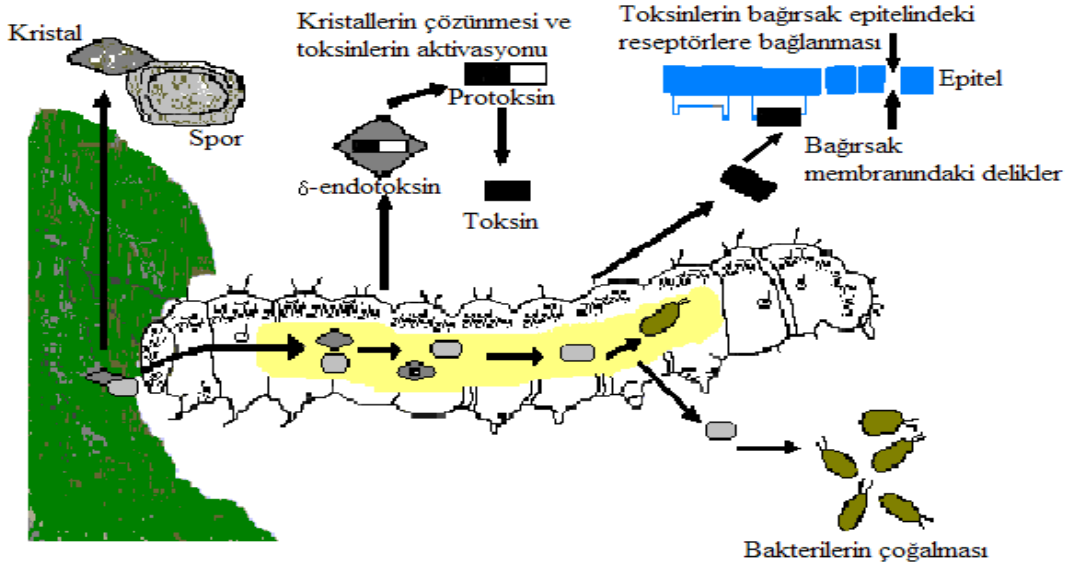
B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera takımlarındaki hassas böcekler için *cry* ve *cyt* genlerinin oluşturduğu aktif inektisidal kristal proteinler sayesinde gerçekleşmektedir. İnektisidal proteinlerin etkili olabilmesi için böcekler tarafından sindirilmesi gerekir. Genel olarak endotoksinler ile muamele edilmiş yiyeceklerin tüketimi, Lepidoptera larvalarının beslenmesinin durmasına ve bağırsağın felç olmasına neden olur. Toksinlerin yüksek dozuyla beslenen larvalar genel bir felç olayı geçirir ve ölür (Glare ve O'Callaghan, 2000).

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden durabilirler. Bu nedenle insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünür özellik taşıyan kristal proteinlerine yoğun bir inektisit özelliği kazandırmaktadır. δ -endotoksinler, bağırsakta çözünerek protoksine dönüşür. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak, aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak, böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve sonra 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,
6. Larvada fazla miktarda *B. thuringiensis*'in çoğalması ve oluşan kan zehirlenmesinin ölüm oranının artırılması (Şekil 10).

ICP'lerin özgün reseptörlere bağlanmasının insektisidal etki spektrumuyla ilgili olduğu tespit edilmiştir. Van Rie ve arkadaşları (1989), tütün kurdu (*Heliothis virescens*) ve domates kurtlarının (*Manduca sexta*) fırça şeklindeki membran vesiküllerine bağlandıklarını göstermiştir. Fakat, bağlanma yerlerinin sayısı farklıdır ve değişik biyolojik aktiviteler gösterir. Bağlanma yerleri için bütün böceklerde toksin ilgisi aynı değildir.



Şekil 10. *Bacillus thuringiensis*'in hedef böceklerdeki mekanizması (URL-2, 2002).

Cyt toksinler ise protein reseptörlerine bağlanmazlar ve doğrudan zar lipitleri ile etkileşime girerek zardan içeri girer ve por oluştururlar.

B. thuringiensis subsp. *israelensis* ile muamele edilmiş sivrisinek larvaları genel olarak muameleden sonraki bir saat içinde beslenmeyi durdururlar, iki saate kadar aktivite azalır ve genel sindirimden sonra altı saat içinde felç olayı gerçekleşir. Diğer *B. thuringiensis* izolatlarının çoğu *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'teki kadar hızlı bir etkiye sahip değildir. Beslenmenin durması *B. thuringiensis* sporlarının ve toksinlerinin sindiriminden sonra oluşabilir. Bununla birlikte, kınkanatlı böceklerde ve tırtıllarda ölüm yalnızca genç larvalar için hızlıdır (1–2 gün) ve daha büyük larvalar için bir haftadan daha uzun zaman alır (Glare ve O'Callaghan, 2000).

1.5.12. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis*'e Dirençliliği

Kimyasal insektisitlerin kullanımındaki artışlar, böcek populasyonları arasında kimyasallara karşı dirençliliğin gelişmesine yol açmıştır. Bu durum, ilginin kimyasal insektisitler yerine, *B. thuringiensis*'e dayalı preparat ve biyoformülasyonlara kaymasını sağlamıştır. McGaughey (1985), *B. thuringiensis* formülasyonu uygulanmış, tahıl ambarlarındaki Hint unu güvesi populasyonunun, yüksek oranda LC₅₀ değerleri gösterdiği rapor edilmiştir. *B. thuringiensis* insektisitlerine daha, *Plutella xylostella*'nın populasyonunda tespit edildi. Yakın geçmişte de Maagd ve arkadaşları (1999), *B. thuringiensis* toksinlerinin, böceklerin direnç geliştirmelerinde bir istisna olmadığını ortaya koydu. Cry11A ve Cry1Ac proteinlerine direnç geliştirilmesi, Colorado patates böceği ve *P. xylostella*'da tespit edildi. Küresel olarak *P. xylostella*'nın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye karşı direnç geliştirmesi Florida, Japonya, Filipinler ve Çin'de rapor edilmiştir. Yakın geçmişteki laboratuvar çalışmaları, 10. jenerasyonun sonunda *Helicoverpa armigera* için Cry1Ac delta endotoksin'e karşı dirençte 76 kat artış olduğunu açığa çıkı. Son zamanlarda, *B. thuringiensis* δ -endotoksinine gösterilen dirençteki bu yükselme nedeniyle bilim adamları, böceklerdeki direnç artışı ile ilgili mekanizmayı anlamak için yapılacak çalışmaları üstlenmek zorunda kaldılar. Birçok farklı dirençli populasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, direncin asıl sebebinin, fırça membran yapısı olduğu gösterilmiştir. Bunun tersine, Gould ve arkadaşlarının (1992) yaptığı araştırmalar, *B. thuringiensis* toksinlerine karşı geliştirilen çapraz direnci modellemiştir. Bu çapraz direncin sebepleri, protoksinlerin proteolizisi veya larvanın bağırsaktaki kristallerin azalan solubilizasyonu olarak ortaya konulmuştur.

Laboratuvar koşullarında 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 *P. 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.*

B. thuringiensis de dirençlilik ile ilgili yaygın görüş, zararlıyı kontrol etmek için *B. thuringiensis* ve *B. thuringiensis* toksin genlerini kullanma ile başarılı olmuştur.

1.5.13. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Biyoteknolojisi

B. thuringiensis suşları çeşitli zararlıların mücadelesinde etmen olarak günümüzde yaygın bir şekilde 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. *B. thuringiensis*'in oluşturduğu β -ekzotoksin ve δ -endotoksinler tarım zararlılarına karşı kullanılmaktadır. En fazla kullanılan δ -endotoksin, Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarındaki 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 7 - 9'de görülmektedir.

Tablo 7. Lepidoptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari *B. thuringiensis* preparatları

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	aizawai
Foray	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
XenTari	Abbott	aizawai
Cordalene	Agrichem	<i>kurstaki</i> HD-1
BMP 123	Becker	<i>kurstaki</i> HD263
Biobest-Bt	Biobest	<i>kurstaki</i> HD-1
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

Tablo 7'nin devamı

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
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, <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), CPR (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)

Tablo 8. Diptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari *B. thuringiensis* preparatları

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 9. Coleoptera takımı zararlılarının biyolojik mücadelesinde kullanılan ticari *B. thuringiensis* preparatları

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 pestisitlerin kullanımı sentetik kimyasal pestisidlerinin yanında önemli derecede geri kalmıştır. Buna rağmen, bazı kesimler *B. thuringiensis*'in gelecekteki gelişimini favori görmektedir. δ -Endotoksinler, memelilere, kuşlara, kara ve suda yaşayanlara ve sürüngenlere patojen değildir. Ancak, böcek ve omurgasız zararlılarına karşı etkili olmaktadır. Cry orjinli pestisitler genellikle düşük maliyetle elde edilmektedir. Örneğin, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*'ten elde edilen ürünler sentetik kimyasal pestisitlerin 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 (Cody vd., 1992; Li vd., 1991). Ayrıca, kısmi fonksiyonları, biyokimyasal ve genetik özelliklerine bakılarak farklı bölgelere ayrılmışlardır (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 arttırılmaktadır. 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 arttırmak için insektisidal aktivitesi yüksek olan ICP'leri içeren plazmitler kullanılır. Çünkü, farklı ICP'ler farklı konaklara karşı etkilidir. ICP genlerinin kombinasyonu ve manipülasyonu hem bakterinin virulansını hem de konak seçimini temelinden etkilemektedir.

Genetik yöntemler kullanılarak, yeni *B. thuringiensis* suşlarına ICP genlerinin kombinasyonları yapıldı. *B. thuringiensis* klonlama vektör sistemi, *E. coli* ya da *B. thuringiensis*'te 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.

Son zamanlarda genetik mühendisliği *B. thuringiensis* toksinlerine alternatif dağıtım sistemleri sağlamak için kullanılmıştır. Böcek zararlılarına karşı ürün koruma için spreyli *B. thuringiensis*'ler tercih edilmektedir. *B. thuringiensis*'in arazi şartlarında sürekliliği zayıftır. Tekrar tekrar araziye uygulamak gerekmektedir. Bu sorunu çözmek için iki yol kullanılmıştır. Normalde böceklere 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 kapsülendir. 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 formulasyon *B. thuringiensis* içerikli biyopestisitlerin daha kararlı olmasını sağlamaktadır.

1.6. Çalışmanın Amacı

Günümüzde, tarım ve orman zararlılarıyla mücadelede kimyasallar yerine, biyolojik etmenler tercih edilmeye başlanmıştır. Biyolojik mücadele amacıyla entomopatojenik bakterilerin kullanımı yaygın olarak tercih edilmektedir. Tarım zararlılarına karşı en yaygın kullanılmakta olan entomopatojenik bakteri *Bacillus thuringiensis*'tir. *B. thuringiensis* suşlarını öne çıkaran, zararlılar üzerinde insektisidal etkiye sahip olan *cry* gen içerikleridir. Zararlılarla mücadelede ekonomik ve ekolojik olarak büyük önem ve avantaja sahip yeni *B. thuringiensis* izolasyonu, karakterizasyonu ve bunların *cry* gen içeriklerinin araştırılması çalışmaları günümüzde de hızla devam etmektedir. Sağlanan başarılar açısından yerel izolatların zararlılarla mücadelede oldukça önemli olduğu da bilinmektedir.

Bu çalışmada, doğal koşullarda ölü olarak bulunan *Malacosoma neustria*'dan izole edilen *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bakterisinde tespit edilen *cry2Ab* geninin karakterizasyonu, baz ve aminoasit sıralarının belirlenmesi ve *E. coli*'de ekspres edilmesi ve elde edilen proteinin Lepidoptera takımından *Malacosoma neustria* ve Diptera takımından *Rhagoletis cerasi* larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede tarım ve ormancılıkta zararlı böceklere karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek, dirençlilik problemi aşılmış, bir mikrobiyal mücadele materyali elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. *Bacillus thuringiensis* MnD Bakterisi ve Büyüme Koşulları

Bu çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis* bakterisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür stoğundan temin edilmiştir. Bu bakteri daha önce Katı ve arkadaşları (2005) tarafından *Malacosoma neustria*'dan izole edilmiş ve *Bacillus thuringiensis* MnD olarak adlandırılmıştır. *B. thuringiensis* MnD bakterisi için yapılan tüm biyokimyasal, moleküler çalışmalar ve özellikle H-serotiplendirme sonucu bakterinin *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* olduğu tespit edilmiştir (Katı vd., 2005).

B. thuringiensis MnD bakterisi Nutrient agar (NA; Merck) ve Luria Bertani besiyerlerinde (LB;1 litre LB için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü) 30°C'de büyütüldü.

2.2. *Bacillus thuringiensis* MnD'den DNA İzolasyonu

B. thuringiensis MnD'den genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yöntemle yapıldı. Çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis* bakterisi, LB besiyerinde, 30°C'de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen kültür iki kez oda sıcaklığında 13,000×g'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellete 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilerek, pellet çözüldü. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için 50 µl % 10'luk SDS eklenerek, 37°C'de 30 dakika bekletildi. Sonra tüpe 3 M'lık 0,1 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65°C'de 10-30 dakika alt-üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Karışıma 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi, tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13000×g'de santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınıp, temiz bir tüpe bırakıldı. Bu tüpe 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. Bu sıvı kısma 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 sıvı uzaklaştırıldı. Pellete 500 µl % 70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13,000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı uzaklaştırılarak pellet açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 100 µl ddH₂O'da çözüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

2.3. *cry2Ab* Geninin Çoğaltılması

B. thuringiensis MnD bakteri DNA'sı daha önce yapılan çalışmalarda *cry2* genel primeri ile çoğaltıldı. Buna göre *cry2* geninin *B. thuringiensis* MnD bakterisinde varlığı tespit edildi (Katı vd., 2005).

Literatürde bulunan *B. thuringiensis* bakterilerinin farklı *cry* genlerini içerdiği bilinmektedir. Ayrıca, *B. thuringiensis* bakterilerinin bu genlerin farklı alt gruplarını ihtiva ettikleri de literatürde belirlenmiştir. *M. neustria* zararlısından izole edilen *B. thuringiensis* izolatının *cry2* geninin hangi alt grubunu ihtiva ettiğini belirleyebilmek için bu *cry2A* genini çoğaltan genel dejenerat primerler dizayn edildi (Tablo 10). Bunun için gen bankasında mevcut olan ve *B. thuringiensis* bakterilerine ait olan *cry2A* genlerine ait nükleotid sıraları elde edildi ve bu sıralar Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla alt alta dizilerek karşılaştırıldı. Genlerin başlangıç ve bitiş kısımlarını çoğaltacak şekilde dejenerat primerler dizayn edildi. Çalışmamızda kullandığımız *B. thuringiensis*'in *cry2A* gen içeriği bu primerler yardımıyla araştırıldı.

Tablo 10. *cry2A* genlerine ileri ve geri ait dejenerat primer dizileri

Primer	Sıra (5'-3')
<i>Cry2A</i> Fw U*	5'-GGCATATGAATAVTTTGAATARYSGAARAAM-3' <i>NdeI</i>
<i>Cry2A</i> Rv U*	5'GGAAGCTTTCATTAATAAAGTGGTGRAAKWTTAGTTGGH-3' <i>HindIII</i>

Fw U* : İleri Genel Primer, Rv U* : Geri Genel Primer

cry2Ab geni yukarıdaki primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 2,5 ünite düzeltme aktiviteli DNA polimeraz (Promega), 5 µl 5x PZR tamponu (10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 2,5 mM

MgCl₂, 1,5 µl 1mM ileri primeri, 1,5 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PZR koşulları 94°C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 10 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika, 45°C'de 1 dakika ve 72°C'de 3 dakika sonra 25 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika, 48°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika ve son olarak da 72°C'de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PZR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntülendi.

2.4. *cry2Ab* Geninin pGEM-T Easy Vektöre Klonlanması

PZR reaksiyonu ile çoğaltılan *cry2A* geni agaroz jelden kesilerek Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEM-T Easy vektöre (Promega) 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pGEM-T Easy Vektör) klonlandı. Reaksiyonlar her bir gen için 1µl pGEM-T Easy vektörü, 7,5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

2.5. *cry2Ab* Geninin Elektrokompotent *E. coli* DH10β'ya Aktarımı

Petriye ekilmiş *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp, NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine aşılandı ve 37°C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB sıvı besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler, 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4°C'de 4.000×rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve pellet iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda tekrar santrifüj edildi. Pellet % 10'luk soğuk gliserolde çözüldü ve 5.000×rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım uzaklaştırıldı ve pellet az miktarda % 10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl'lik hacimlerde) ve -80°C'de saklandı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E. coli* DH10 β hücrelerinden 2 tüp alınarak buza yerleştirildi. Tüplerin birine 3 μ l ligasyon ürünü bırakılırken, diğeri kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nin elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Kuvvetler cihazdan alınarak içlerine 1 ml LB besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım steril bir cam tüpe bırakılarak 37°C'de 200 rpm'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktarılarak 6000 \times g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 μ l kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kalan süpernatant içinde çözüldükten sonra 50 μ g/ml ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 μ l ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 μ l sürülmüş petrilere) yayıldı. Gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda içerisine plazmit alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.6. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi

Mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu için 50 μ g/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmit DNA'larının izolasyonu hızlı miniprep metoduyla gerçekleştirildi. Gece kültürleri 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant, geride 50 μ l kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve pellet, bunun içinde vorteksenerek çözüldü. Üzerine 300 μ l TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Karışıma 150 μ l 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi, tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve 14.000 \times g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alındı, 900 μ l % 100'lük etanol ilave edildi ve 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Pellet % 70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet 50 μ l ddH₂O'da çözüldü. İzole edilen plazmit DNA'larının DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için, plazmit DNA'ları *Nde*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle muamele edildi. *cry2Ab* için 10 μ l DNA, 0,5 μ l *Nde*I (promega), 0,5 μ l *Hind*III (promega), 2 μ l enzime ait 10x reaksiyon tamponu ve 7 μ l H₂O olacak şekilde 20 μ l'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37°C'de 2 saat inkübe

edildi. İnkübasyonun sonunda karışım % 1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.7. Klonların İçerdiği *cry2Ab* Geninin Dizi Analizi

Elde edilen klonlardan seçilen 3 tanesi 5 ml ampisilinli LB besiyerine ekildi ve 37°C'de 200 rpm'de 14-16 saat inkübe edildi. Büyüyen kültürler, 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, USA) kiti kullanılarak plazmit DNA'ları izole edildi. Plazmit DNA konsantrasyonları OD₂₆₀'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. İçerisinde DNA örnekleri bulunan mikrosantrifüj tüplerinin üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek sekans analizleri için Macrogen Firmasına (Güney Kore) gönderildi.

2.8. Elde Edilen DNA Baz Sıralarının İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen *cry2Ab* geninin baz ve aminoasit dizilimi gen bankasında bulunan diğer *cry2Ab* genleri ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

2.9. Belirlenen *Cry2Ab* Proteinin Literatürdeki Diğer *Cry2Ab* Proteinleriyle Karşılaştırılması ve MEGA Programı ile Ağaç Çizimi

Sekans sonucunda genin nükleotid ve aminoasit dizilimi belirlenerek gen bankasındaki diğer *cry2Ab* proteini ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı ile karşılaştırıldı ve benzerlikler ortaya konuldu. Sonra MEGA 4 (Moleküler Evrimsel Genetik Analiz) programıyla literatürdeki *cry2Ab* proteinleri arasında Bootstrap Filogeni testi Neighbour-joining analizi yapılarak literatürdeki protein dizilerinin birbirine yakınlık dereceleri belirlendi.

2.10. *cry2Ab* geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’yı içeren *E. coli* BL21 bakterisine ait bir koloniden 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C’de 200 rpm’de gece boyu 14-16 saat büyütüldü. İnkübasyon sonucu elde edilen kültür 14.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra plazmit DNA izolasyonu, “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

2.10.1. pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün *NdeI* ve *HindIII* Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

İzole edilen plazmit DNA’sından iki tüpe 500’er ng bırakılarak *NdeI* ve *HindIII* enzimleriyle kesildi. Reaksiyonlar, 10’ar µl plazmit DNA’sı, 3’er µl 10x TA tamponu, bir tüp için 1,5 µl *NdeI*, 1,5 µl *HindIII*, diğer tüp için 1,5 µl *HindIII*, 1,5 µl *NdeI* ve 14’er µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 30 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37°C’de 3 saat inkübe edildi. İnkübe edilen ürün % 1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleazlarıyla lineer hale getirilmiş olan 5369 bp büyüklüğündeki pET-28a(+) vektörleri, DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi.

2.10.2. *cry2Ab* Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılması

cry2Ab genini taşıyan pGEM-T Easy vektörü içeren *E. coli* DH10β bakterilerine ait birer koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C’de 200 rpm’de gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültürler, 14.000×rpm’de 2 dakika çöktürüldükten sonra plazmit DNA izolasyon kiti (Promega, USA) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmit DNA’dan 200 ng alınarak, 3 µl 10x TA tamponu, 1’er µl *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri bir araya getirilerek toplam 30 µl son hacimde reaksiyon hazırlandı ve bu reaksiyon 37°C’de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri DNA standardı olarak 1 kb DNA Ladder (Promega) ile birlikte % 1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pGEM-T Easy vektöründen *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek *cry2Ab* geni, agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak temizlendi.

2.10.3 *cry2Ab* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı

Jelden temizlenen *cry2Ab* geni ve pET-28a(+) vektörü 3:1 oranında yapıştırıldı. Buna göre her bir gen için reaksiyon; 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2 µl pET-28a(+) vektörü, 6 µl insert DNA ve 9 µl ddH₂O olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16°C’de gece boyu bekletildi.

2.11. pET-28a(+)'ya Klonlanan *cry2Ab* Geninin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmit *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmadan önce *E. coli* DH10β elektrokompotent hücrelerine aktarıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılarak genin varlığı doğrulandı. Daha sonra kullanılacak olan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine ait bir koloni 3 ml LB besiyerine inkübe edildi ve 37°C’de 200 rpm’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu kültürden, CaCl₂’lü metoda göre kompetent hale getirilmiş *E. coli* BL21(DE3) hücreleri elde edildi. Kompetent hücrelere DNA aktarımı için rekombinant plazmit DNA’sından 3 µl alındı ve buna 200 µl hücre eklendi. Karışım 30 dakika buz içerisinde tutulduktan sonra, 2 dakika 45°C’de bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 1 ml LB besiyeri olan cam tüpe bırakıldı ve 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda ependorf tüpe alınan kültür 6000×g’de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet halindeki hücrelerin üzerinde 100 µl besiyeri kalacak şekilde fazla besiyeri uzaklaştırıldı. Kalan miktar daha sonra 50 µg/ml kanamisin içeren LB agar petrilere yayıldı ve gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Aynı yöntemle pET-28a(+) vektörünün kendisi de *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı.

2.12. *cry2Ab* Proteinin, Ekspresyonu ve İzolasyonu

Cry2Ab proteinini ekspres etmek için *cry2Ab* genini ihtiva eden rekombinant pET-28a(+) vektörleri, *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Aktarım sonucu oluşan kolonilerden birer tanesi 50 µg/ml kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine kürdan yardımıyla ekildi. Bu tüp 200 rpm’de 37°C’de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen gece kültürü, 100 ml kanamisinli besiyerine eklendi. OD₆₀₀=0,5-1 olduğunda gen ekspresyonunu indüklemek için besiyerine 100 µl IPTG (Stok konsantrasyonu 240 mg/ml) ilave edilerek tekrar

büyümeye bırakıldı. Yaklaşık 4 saat sonra kültür alınarak 50 ml'lik propilen (Nalgene, Sigma-Aldrich) tüplere aktarıldı ve 4°C'de, 5000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 12 ml 20 mM Tris-Cl pH 7,5'da çözüldü ve tekrar aynı şekilde santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellete 5 ml 20 mM Tris-Cl pH 7,5 tamponu eklenerek hücreler karıştırıldı. Sonra karışıma 50 µl lizozim (10mg/ml) ilave edilerek 30°C'de, 15 dakika inkübe edildi ve sonra hücreler 1 dakika sonikatörde parçalandı. Son olarak, 4°C'de, 14.000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 2 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponunda çözüldü ve -80°C'de muhafaza edildi. *E. coli* BL21(DE3)'e aktarılan pET-28a(+) ve *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin de aynı yöntemle protein izolasyonu gerçekleştirildi.

2.13. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre yapıldı. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler ddH₂O ile 250 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 250'şer µl hazır boya çözeltisinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gözlü mikroplate aktarıldı ve UV-visible Spektroskopi System cihazı (Bio-rad) kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

2.14. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Protein ekspresyonunun gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. Poliakrilamid jel elektrofrezisi yöntemi ile her bir örnek için 80 µg protein alındı ve üzerine muamele tamponu (60mM Tris-HCl (pH 6,8), % 25 Gliserol, % 2 SDS, % 5 β-merkaptolanol, % 0,1 bromofenol blue) ilave edildi. Karışım kaynamakta olan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra % 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 1 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (% 36

Metanol, % 9 Asetik Asit) 1-2 saat yıkandı. Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

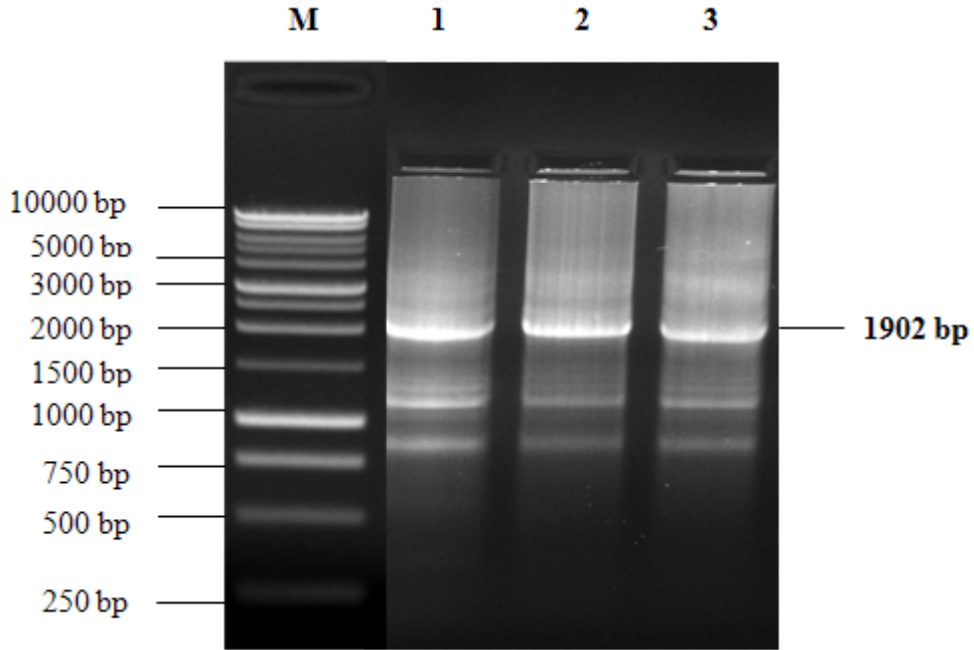
2.15. İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Cry2Ab proteininin insektisidal aktivitelerini test etmek için Lepidoptera takımına ait *Malacosoma neustria* (Lasiocampidae, yüzük kelebeği) larvaları ve Diptera takımına ait *Rhagoletis cerasi* (Tephritidae, Kiraz sineği) larvaları üzerinde biyoassay çalışmaları yapıldı. İnsektisidal aktivite çalışmalarında *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımı, *E. coli* BL21(DE3) bakterisinde ekspreslenen cry2Ab proteini, pET-28a(+) vektörünü ihtiva eden *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden izole edilmiş protein ve *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden izole edilmiş proteinler kullanıldı. Spor-kristal karışımı 10^9 spor-kristal/ml olacak şekilde hazırlandı. Test edilecek proteinler 100 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Her numune için 10 tane larva test kaplarına yerleştirildi. *Malacosoma neustria* larvaları için besin olarak berberis yaprakları, *Rhagoletis cerasi* larvaları için besin olarak ise kiraz kullanıldı. Test edilecek numuneler, bu yiyeceklerin üzerine bulaştırıldı. Uygulamadan önce 4 saat aç bırakılmış larvalar besinlerin üzerine bırakıldı. İnsektisidal aktivite testleri 25°C'de gerçekleştirildi. Meydana gelen ölümler kaydedildi. Deneyler üç tekrarlı yapıldı. İnsektisidal aktivite test sonuçları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

3. BULGULAR

3.1. *cry2Ab* Genin PZR Yöntemiyle Belirlenmesi

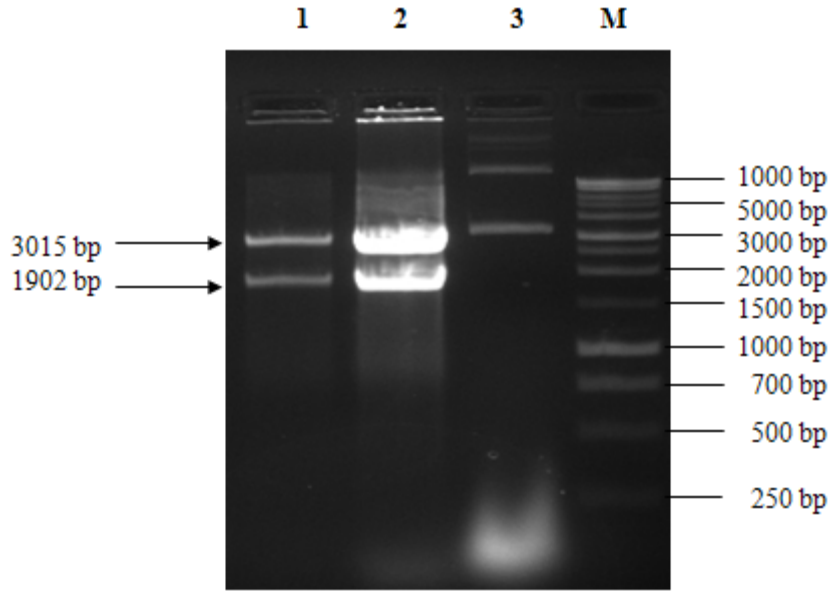
Katı ve arkadaşları (2005) tarafından *B. thuringiensis* MnD bakterisinde genel primerler yardımıyla *cry2* geni varlığı tespit edildi. Böylece, *B. thuringiensis* MnD bakterisinde varlığı tespit edilen *cry2* geninin alt gruplarının belirlenebilmesi için literatürde bulunan *cry2A* genlerinin korunmuş bölgelerine göre, ileri ve geri dejenerat primerler oluşturuldu (Tablo 10). *cry2Ab* geni, bu dejenerat primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri % 1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Bu işlem sonucunda, 1 kb'lik DNA marker (Promega) ile karşılaştırıldığında *cry2Ab* geninin 1902 bp büyüklüğünde olduğu belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *cry2Ab* geninin PZR yöntemiyle çoğaltılması. M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1, 2, 3: *cry2Ab* geni

3.2. *cry2Ab* Geninin Klonlanması ve Baz Sırasının Belirlenmesi

cry2Ab geni PZR ile çoğaltıldıktan sonra pGEM-T Easy klonlama vektörüne aktarıldı. *NdeI* ve *HindIII* enzim kesim bölgeleri ihtiva eden *cry2A* genini pGEM-T Easy vektör içerisine klonlandığını belirlemek amacıyla restriksiyon endonükleazlar ile muamele edildi. Şekil 12’de kesimi yapılan *cry2Ab* geninin 1902 bp büyüklüğünde olduğu, lineer hale gelen klonlama vektörünün ise 3015 bp büyüklüğünde olduğu belirlendi.



Şekil 12. pGEM-T/*cry2Ab* klonunun restriksiyon analizi. 1, 2: pGEM-T Easy vektöre klonlanan *cry2Ab* geninin *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi, 3: pGEM-T/*cry2Ab* kesilmemiş plazmit, M: 1kb DNA ladder

Klonlama vektörü içerisinde varlığı tespit edilen *cry2Ab* geninin nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Dizin analizi işlemi genin her iki tarafından gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre, *cry2Ab* geni için toplam 1692 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi. Genin tamamı 1902 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgenin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*cry2Ab* ara bölge Fw; 5'-GCGACCGGATTCTAGAGATTG-3' ve *cry2Ab* ara bölge Rv 5'-GGAACAACAAGGACCGAACGTTGG-3) dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için dizin analizine tekrar gönderildi. Böylece, ara bölgenin de sırası

belirlenerek DNA dizini analizi tam olarak gerçekleştirildi. Elde edilen *cry2Ab* geninin DNA sırası 1902 bp olarak belirlendi (Şekil 13). Baz dizilimi belirlenen *cry2Ab* geni ATG başlangıç kodunu ile TAA stop kodunu arasında kalan ORF bölgesi çoğaltıldı.

```

ATG AAT ACT GTA TTG AAT AGT CGA AGA ACT ACT ATT TGT GAT GCG
TAT AAT GTA GCG GCT CAT GAT CCA TTT AGT TTT CAA CAC AAA TCA TTA
GAT ACC GTA CAA AAG GAA TGG ACG GAG TGG AAA AAA AAT AAT CAT
AGT TTA TAC CTA GAT CCT ATT GTT GGA ACT GTG GCT AGT TTT CTG TTA
AAG AAA GTG GGG AGT CTT GTT GGA AAA AGG ATA CTA AGT GAG TTA
CGG AAT TTA ATA TTT CCT AGT GGT AGT ACA AAT CTA ATG CAA GAT
ATT TTA AGA GAG ACA GAA AAA TTC CTG AAT CAA AGA CTT AAT ACA
GAC ACT CTT GCC CGT GTA AAT GCG GAA TTG ACA GGG CTG CAA GCA
AAT GTA GAA GAG TTT AAT CGA CAA GTA GAT AAT TTT TTG AAC CCT
AAC CGA AAC GCT GTT CCT TTA TCA ATA ACT TCT TCA GTT AAT ACA ATG
CAA CAA TTA TTT CTA AAT AGA TTA CCC CAG TTC CAG ATG CAA GGA
TAC CAA CTG TTA TTA TTA CCT TTA TTT GCA CAG GCA GCC AAT TTA CAT
CTT TCT TTT ATT AGA GAT GTT ATT CTA AAT GCA GAT GAA TGG GGA ATT
TCA GCA GCA ACA TTA CGT ACG TAT CGA GAT TAC TTG AAA AAT TAT
ACA AGA GAT TAC TCT AAC TAT TGT ATA AAT ACG TAT CAN AGT GCG
TTT AAA GGT TTA AAC ACT CGT TTA CAC GAT ATG TTA GAA TTT AGA
ACA TAT ATG TTT TTA AAT GTA TTT GAG TAT GTA TCT ATC TGG TCG TTG
TTT AAA TAT CAA AGT CTT CTA GTA TCT TCC GGT GCT AAT TTA TAT GCA
AGT GGT AGT GGA CCA CAG CAG ACC CAA TCA TTT ACT TCA CAA GAC
TGG CCA TTT TTA TAT TCT CTT TTC CAA GTT AAT TCA AAT TAT GTG TTA
AAT GGA TTT AGT GGT GCT AGG CTT TCT AAT ACC TTC CCT AAT ATA GTT
GGT TTA CCT GGT TCT ACT ACA ACT CAC GCA TTG CTT GCT GCA AGG GTT
AAT TAC AGT GGA GGA ATT TCG TCT GGT GAT ATA GGT GCA TCT CCG TTT
AAT CAA AAT TTT AAT TGT AGC ACA TTT CTC CCC CCA TTG TTA ACG CCA
TTT GTT AGG AGT TGG CTA GAT TCA GGT TCA GAT CGG GAG GGC GTT
GCC ACC GTT ACA AAT TGG CAA ACA GAA TCC TTT GAG ACA ACT TTA
GGG TTA AGG AGT GGT GCT TTT ACA GCT CGC GGT AAT TCA AAC TAT
TTC CCA GAT TAT TTT ATT CGT AAT ATT TCT GGA GTT CCT TTA GTT GTT
AGA AAT GAA GAT TTA AGA AGA CCG TTA CAC TAT AAT GAA ATA AGA
AAT ATA GCA AGT CCT TCA GGA ACA CCT GGT GGA GCA CGA GCT TAT
ATG GTA TCT GTG CAT AAC AGA AAA AAT AAT ATC CAT GCT GTT CAT
GAA AAT GGT TCT ATG ATT CAT TTA GCG CCA AAT GAC TAT ACA GGA
TTT ACT ATT TCG CCG ATA CAT GCA ACT CAA GTG AAT AAT CAA ACA
CGA ACA TTT ATT TCT GAA AAA TTT GGA AAT CAA GGT GAT TCT TTA
AGG TTT GAA CAA AAC AAC ACG ACA GCT CGT TAT ACG CTT AGA GGG
AAT GGA AAT AGT TAC AAT CTT TAT TTA AGA GTT TCT TCA ATA GGA
AAT TCC ACT ATT CGA GTT ACT ATA AAC GGT AGG GTA TAT ACT GCT
ACA AAT GTT AAT ACT ACT ACA AAT AAC GAT GGA GTT AAT GAT AAT
GGA GCT CGT TTT TCA GAT ATT AAT ATC GGT AAT GTA GTA GCA AGT
AGT AAT TCT GAT GTA CCA TTA GAT ATA AAT GTA ACA TTA AAC TCC
GGT ACT CAA TTT GAT CTT ATG AAT ATT ATG CTT GTA CCA ACT AAA ATT
CCA CCA CTT TAT TAA

```

Şekil 13. *cry2Ab* geninin DNA sırası (1902bp)

NCBI web adresindeki BLAST Orf programı kullanılarak DNA sırası belirlenen genin aminoasit dizilimi de çıkarıldı. Böylece, cry2Ab proteinin 633 aminoasite sahip olduğu belirlendi. Schnepf ve arkadaşları (1998) literatürde bulunan cry2A proteinleri arasında aminoasit dizisi blokları korunduğunu belirlemişlerdir. Cry2A için belirlenen korunmuş bloklara bakıldığında, proteinlerde 168. aminoasit ile 198. aminoasitleri arasında kalan “YQLLLLPLFAQAANMHLSFIRDVILNADEW” 30 aminoasitlik bölge korunduğu gözlemlenmektedir. Sadece bu 30 aminoasitlik korunmuş bloğun 15. aminoasidi olan “N” aminoasidi iken cry2Ab proteininde “L” aminoasidine dönüşmüş olarak görülmektedir. Yüksek oranda korunmuş bu bloğun bazı aminoasitlerinde farklılık olabileceği Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından belirtilmiştir. Ayrıca, cry2A proteinlerinde 540. aminoasit ile 551. aminoasitler arasında kalan “NSYNLYLRVSS” 10 aminoasitlik olası varyantlar bulunduğu Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından belirlenmiştir. Cry2Ab protein dizisinde ise bu bölge blokta olduğu gibi değişmeksizin korunmuştur (Şekil 14).

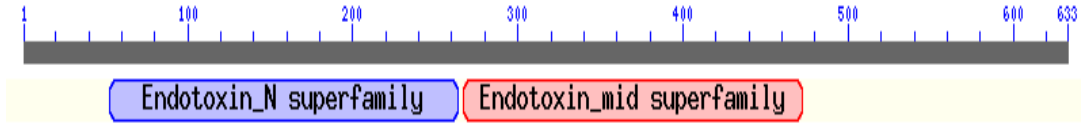
```

MNTVLNSRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDVTVQKEWTEWKKNNHSLYLDP
IVGTVASFLLKKVGSLSVGKRILSELRNLI FPSGSTNLMQDILRETEKFLNQRLNT
DTLARVNAELTGLQANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNR
LPQFQMQGYQLLLLPLFAQAANLHLSFIRDVILNADEWGISAATLRTYRDYL
KNYTRDYSNYCINTYXSAFKGLNTRLHDMLEFRTYMFLNVFEYVSIWLSLFKYQ
SLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLFQVNSNYVLNGFSGARLSN
TFPNIVGLPGSTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNFNCSTFLPPLLTPFV
RSWLDSGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGNSNYFPDYFIRNIG
VPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHENG
SMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTL
RGNGNSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSD
INIGNVVASSNSDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTKIPPL

```

Şekil 14. cry2Ab geninin aminoasit sırası (633aa)

Cry2Ab geninin korunmuş bölgelerini belirlemek amacıyla BLAST programı kullanılarak 633 aminoasite sahip genin korunmuş bölgeleri araştırıldı ve genin “endotoksin N” ve “mid” süper familyalarından olduğu belirlendi. Cry2Ab proteinin 47. aminoasit ile 266 aminoasitleri arasında kalan bölge endotoksin N, δ -endotoksin, N-terminal bölgesi olarak belirlendi. Ayrıca, cry2Ab proteinin 267. aminoasidinden 472. aminoasidine kadar olan bölge ise endotoksin mid, *B. thuringiensis* δ -endotoksin, orta bölgesi olarak NCBI BLAST programıyla belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. *cry2Ab* geninin korunmuş bölgeleri

NCBI web adresindeki BLAST programı ve DNA Star programı kullanılarak proteinin moleküler ağırlığı 70877.66 Dalton, izoelektrik noktası 8.953, pH 7'de proteinin yükü 7.842 olarak belirlendi. Ayrıca, 633 aminoasite sahip olan *cry2Ab* proteinin hangi gruptan kaç adet aminoasit içerdiği belirlendi. Bu verilere göre *cry2Ab* proteininde hidrofobik ve polar aminoasit grubunda yoğunluk gösterdiği görülmektedir. Özellikle *cry2Ab* proteinin korunmuş bölgelerinde bulunan aminoasitlerin polar ve hidrofobik aminoasit grubundan olduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. *Cry2Ab* proteininin aminoasit içerikleri

Aminoasit Grubu	Aminoasitler	İçerdiği aminoasit adeti
Güçlü Bazik (+)	K, R	51
Güçlü Asidik(-)	D, E	45
Hidrofobik	A, I, L, F, W, V	214
Polar	N, C, Q, S, T, Y	234

3.3. *cry2Ab* Geninin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması

Elde edilen nükleotid sıraları NCBI web adresindeki BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut *cry2Ab* gen sıralarıyla karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucuna göre, elimizdeki izolatın *cry2Ab* geni, gen bankasındaki *B. thuringiensis cry2Ab* genine % 99, *B. thuringiensis* ly30 *cry2Ab* (*cry2Ab*) genine % 99, *B. thuringiensis* 14-1 suşunun δ -endotoksin (*cry2Ab*) genine % 99 ve *B. thuringiensis cry2Ab11* geni, CMBL-BT1 izolatına % 99 benzerlik göstermektedir (Tablo 12).

Tablo 12. *cry2Ab* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *cry2Ab* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Accession Numarası	Adı	Büyüküğü	Benzerlik
DQ361266	<i>B. thuringiensis cry2Ab</i> geni	1897 bp	% 99
EU623976	<i>B. thuringiensis</i> LSZ9408 suşunun <i>cry2Ab</i> geni	1895 bp	% 99
AF441855	<i>B. thuringiensis ly30 cry2Ab</i> (<i>cry2Ab</i>) geni	1895 bp	% 99
DQ119823.1	<i>B. thuringiensis</i> 14-1 suşunun delta endotoksin (<i>cry2Ab</i>) geni	1889 bp	% 99
EU909454	<i>B. thuringiensis</i> Ywc5-4 suşunun pestisidal kristal proteini, (<i>cry2Ab</i>) geni	1889 bp	% 99
AM691748	<i>B. thuringiensis cry2Ab11</i> geni, CMBL-BT1 isolat	1888 bp	% 99

DNA star programı kullanılarak mevcut *cry2Ab* geninin protein dizisi belirlendi. Belirlenen protein sırasının NCBI web adresindeki BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut kristal proteinler ile karşılaştırması yapıldı. *Cry2Ab* proteininin literatürde bulunan diğer 14 *cry2Ab* proteiniyle karşılaştırılmış olup benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucuna göre gen bankasında mevcut *cry2Ab2*, *cry2Ab3*, *cry2Ab4*, *cry2Ab6*, *cry2Ab9* kristal proteinleri ile % 99 benzerlik gösterdiği belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. *Cry2Ab* proteininin literatürdeki diğer *cry2Ab* proteinleriyle benzerliği

Sıra A	Adı	Büyüküğü (aa)	Sıra B	Adı	Büyüküğü (aa)	Benzerliği (%)
1	<i>Cry2Ab</i>	633	2	<i>Cry2Ab1</i>	633	99
1	<i>Cry2Ab</i>	633	3	<i>Cry2Ab2</i>	633	99
1	<i>Cry2Ab</i>	633	4	<i>Cry2Ab3</i>	633	99
1	<i>Cry2Ab</i>	633	5	<i>Cry2Ab4</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	6	<i>Cry2Ab5</i>	633	99
1	<i>Cry2Ab</i>	633	7	<i>Cry2Ab6</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	8	<i>Cry2Ab7</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	9	<i>Cry2Ab8</i>	633	99
1	<i>Cry2Ab</i>	633	10	<i>Cry2Ab9</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	11	<i>Cry2Ab10</i>	633	94
1	<i>Cry2Ab</i>	633	12	<i>Cry2Ab11</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	13	<i>Cry2Ab12</i>	633	94
1	<i>Cry2Ab</i>	633	14	<i>Cry2Ab13</i>	633	98
1	<i>Cry2Ab</i>	633	15	<i>Cry2Ab14</i>	633	97

Cry2Ab proteininin literatürdeki diğer cry2Ab proteinleriyle yapılan BLAST karşılaştırma sonucuna göre diğer cry2Ab proteinlerinden hangi aminoasitlerin farklı olduğu belirlenmiştir. Cry2Ab proteininde Şekil 16’te işaretli olan 8, 228, 628. aminoasitlerin literatürdeki proteinlerin aminoasitlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 16).

Cry2Ab9	MNVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab11	MNTVLNNGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab	MNTVLNSRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab8	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab4	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab7	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab13	MNSVLNIGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab14	MNSVLNTGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab1	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab5	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab2	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab6	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab3	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry1Ab10	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
Cry2Ab12	MNSVLNSGRRTTICDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF	60
	**.* ** *	
Cry2Ab9	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab11	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab8	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab4	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab7	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab13	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab14	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab1	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab5	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTEL	120
Cry2Ab2	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab6	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab3	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry1Ab10	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
Cry2Ab12	LLKKVGSVLGKRILSELRNLIFFSGSTNMQDILRETEKFLNQRLNTDTPVARVNAELTGL	120
	*****:*****:***** *	
Cry2Ab9	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab11	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab8	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab4	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab7	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab13	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab14	QADVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab1	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab5	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab2	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab6	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab3	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry1Ab10	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
Cry2Ab12	QANVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQA	180
	**:* ** *	

Şekil 16. Cry2Ab proteininin literatürde bulunan diğer cry2Ab proteinleri ile BLAST sonucu

Şekil 16'nın devamı

Cry2Ab9	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab11	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYXSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab8	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab4	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab7	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab13	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab14	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab1	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab5	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab2	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab6	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab3	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry1Ab10	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240
Cry2Ab12	ANLHLSFIRDVILNADEWGISAAATLRTYRDYLNKYTRDYSNYCINTYQSFAFKGLNTRLHD	240

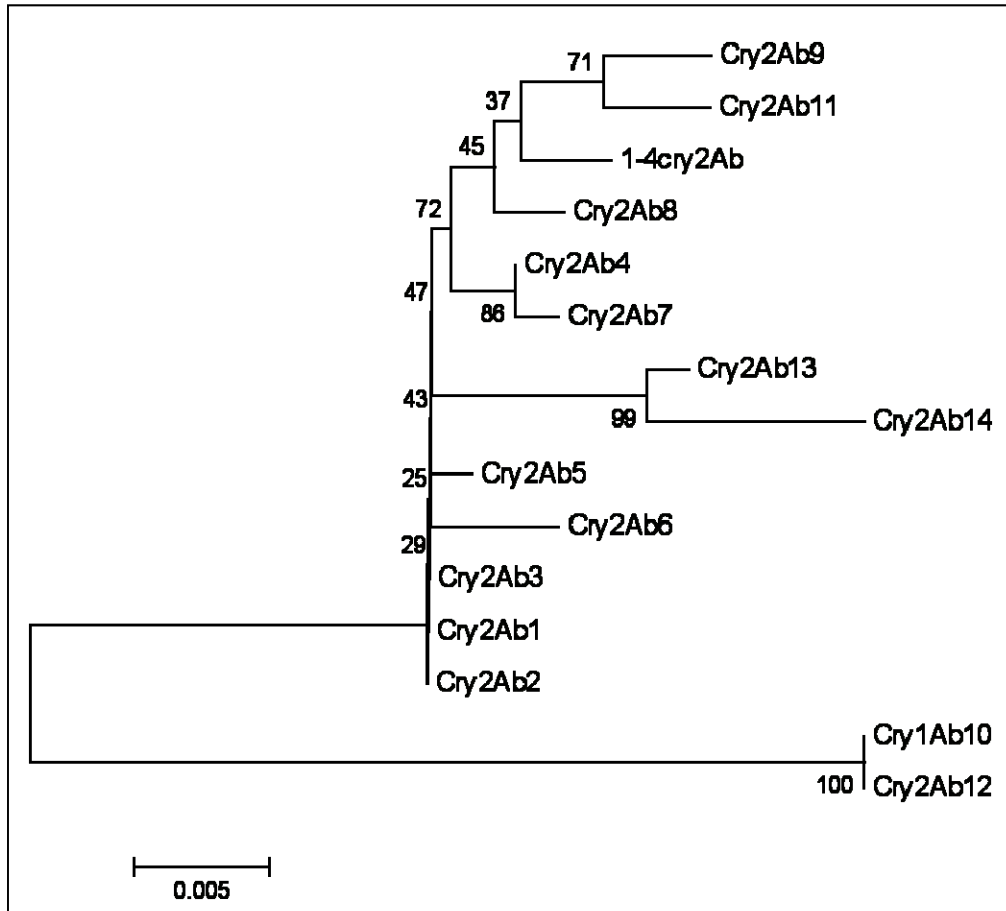
Cry2Ab9	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab11	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab8	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab4	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab7	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab13	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab14	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab1	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab5	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab2	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab6	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab3	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry1Ab10	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
Cry2Ab12	MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLF	300
	*****:*:***** * * ****:***** .*.*** **	
Cry2Ab9	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab11	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab8	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab4	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab7	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab13	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab14	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab1	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab5	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab2	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab6	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab3	QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNF	360
Cry1Ab10	QVNSNYVFNFRGARLFNSFPNIIGLPGFTTTHPLLAAKVNYKGRISSGDIGASPFNQNF	360
Cry2Ab12	QVNSNYVFNFRGARLFNSFPNIIGLPGFTTTHPLLAAKVNYKGRISSGDIGASPFNQNF	360
	*****:*** ** * * :*****:*** ** * * *****:*** * *****:*** **	
Cry2Ab9	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab11	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab8	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab4	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab7	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab13	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab14	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab1	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab5	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab2	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab6	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab3	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry1Ab10	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
Cry2Ab12	NCSTFLPPLLTPFVRSWLDGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGISNYFPD	420
	.**:*****:*****.*** ** *	

Şekil 16'nın devamı

Cry2Ab9	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab11	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab8	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab4	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab7	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab13	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYLVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab14	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYLVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab1	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab5	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab2	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab6	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNGIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab3	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry1Ab10	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
Cry2Ab12	YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN	480
	*****:*****	
Cry2Ab9	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab11	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab8	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab4	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab7	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab13	GSLIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab14	GSLIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab1	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab5	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab2	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab6	GSMIHLAPNDYTGFTILPIHATQVNNQTRTFISGKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab3	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry1Ab10	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
Cry2Ab12	GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNG	540
	:**	
Cry2Ab9	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab11	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab8	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab4	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab7	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab13	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab14	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab1	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab5	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab2	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab6	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab3	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry1Ab10	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
Cry2Ab12	NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN	600
	*****:*****	
Cry2Ab9	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTKLPPLY	633
Cry2Ab11	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNLPPPLY	633
Cry2Ab	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTKIPPLY	633
Cry2Ab8	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNLPPPLY	633
Cry2Ab4	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab7	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab13	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab14	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNTMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab1	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab5	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab2	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab6	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab3	SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY	633
Cry1Ab10	SDVSLDINVSLNSRTLIDLNMIMLVPTNISPLY	633
Cry2Ab12	SDVSLDINVSLNSRTLIDLNMIMLVPTNISPLY	633
	.**:*** * :**** *****:.*	

3.4. Cry2Ab Proteinin Literatürdeki Diğer Cry2Ab Proteinleri ile Akrabalık Derecelerinin Belirlenmesi için MEGA Programı ile Ağaç Çizimi

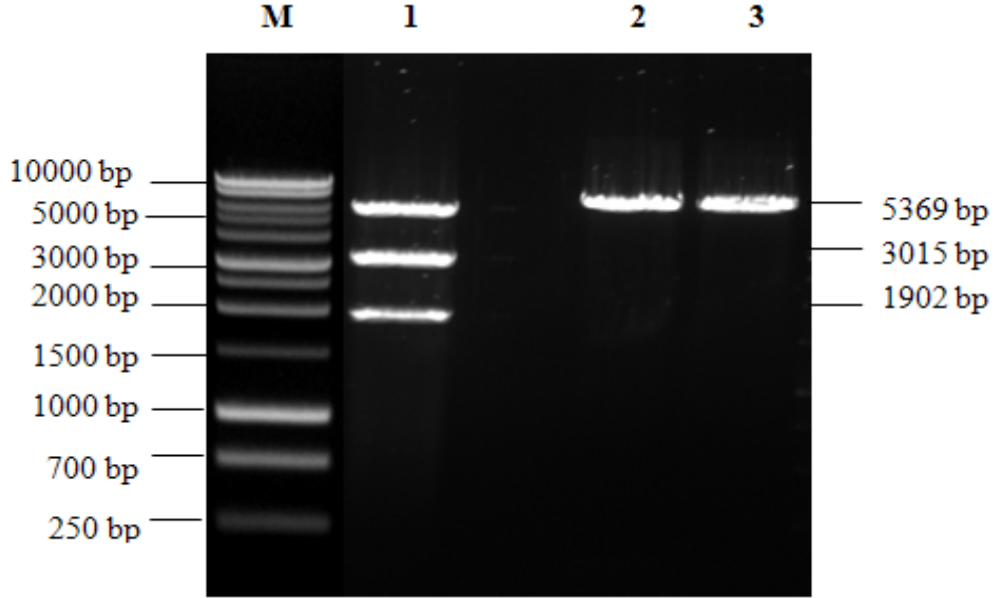
Aminoasit dizisi belirlenen cry2Ab proteininin literatürde bulunan diğer cry2Ab proteinleriyle akrabalık derecelerini belirleyebilmek için MEGA4 programında bulunan Neighbour Joining analizi kullanıldı (Tamura vd., 2007). Aminoasit dizilimine göre NCBI BLAST programında cry2Ab proteinin; cry2Ab2, cry2Ab3 cry2Ab4, cry2Ab6, cry2Ab9 kristal proteinleri ile % 99 benzerlik gösterdiği belirlenmişti. Diğer kristal proteinler ile % 98 ve % 94 benzerlik gösterdi. MEGA 4 programı ile yapılan Neighbour Joining Analizinde Şekil 17'de çizimi gösterilen moleküler genetik analizi yapılan proteinlerin evrimsel uzaklığı belirlenmiştir. Analizde, 500 kez tekrarlı çizimi yapılan cry2Ab proteinin daha çok cry2Ab8'den dallanan ve cry2Ab9 ile cry2Ab11 proteinleri ile birarada bulunmaktadır.



Şekil 17. Cry2Ab proteinin Evrimsel Analizi (Neighbour Joning Analizi)

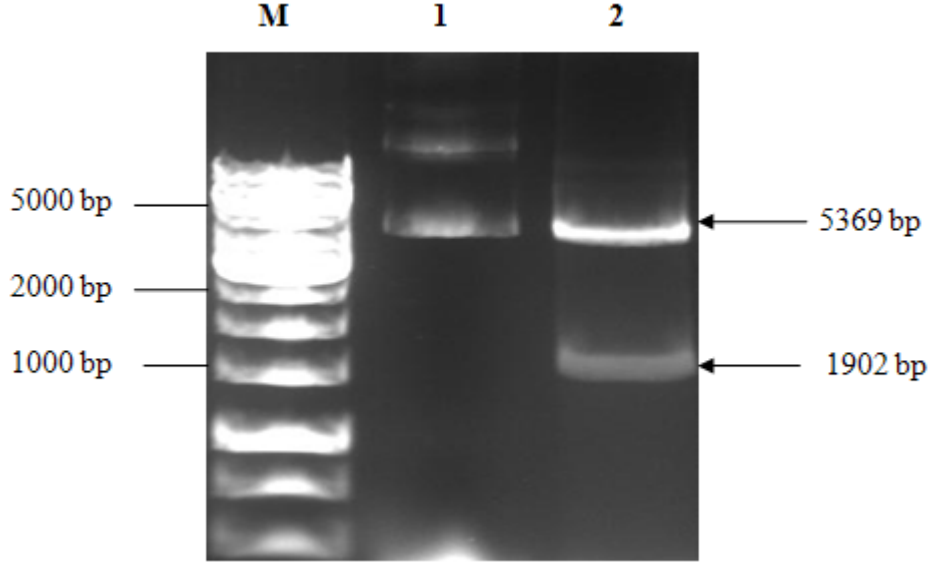
3.5. *cry2Ab* Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış *cry2Ab* geni, ekspresyon vektörüne klonlamak için *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 18). Aynı zamanda pET-28a(+) ekspresyon vektörü de aynı restriksiyon enzimler ile kesildi. Klonlama vektörü olan pGEM-T Easy vektör içinde olan *cry2Ab* geni *NdeI* ve *HindIII* enzimleriyle kesildiğinde 3015 bp büyüklüğünde lineer halde pGEM-T Easy vektör ve 1902 bp büyüklüğünde yapışkan uçlu *cry2Ab* geni meydana geldi. Aynı enzim kesim bölgesine sahip olan ekspresyon vektörünün büyüklüğü 5369 bp olarak belirlendi.



Şekil 18. pET-28a(+) ve *cry2Ab*'nin restriksiyon analizi. M: 1kb DNA Ladder, 1: *cry2Ab*'nin *NdeI* ve *HindIII* ile kesimi 2: pET-28a(+)'nın *NdeI* ve *HindIII* kesim sonucu, 3: pET-28a(+)'nın *HindIII* ve *NdeI* kesim sonucu

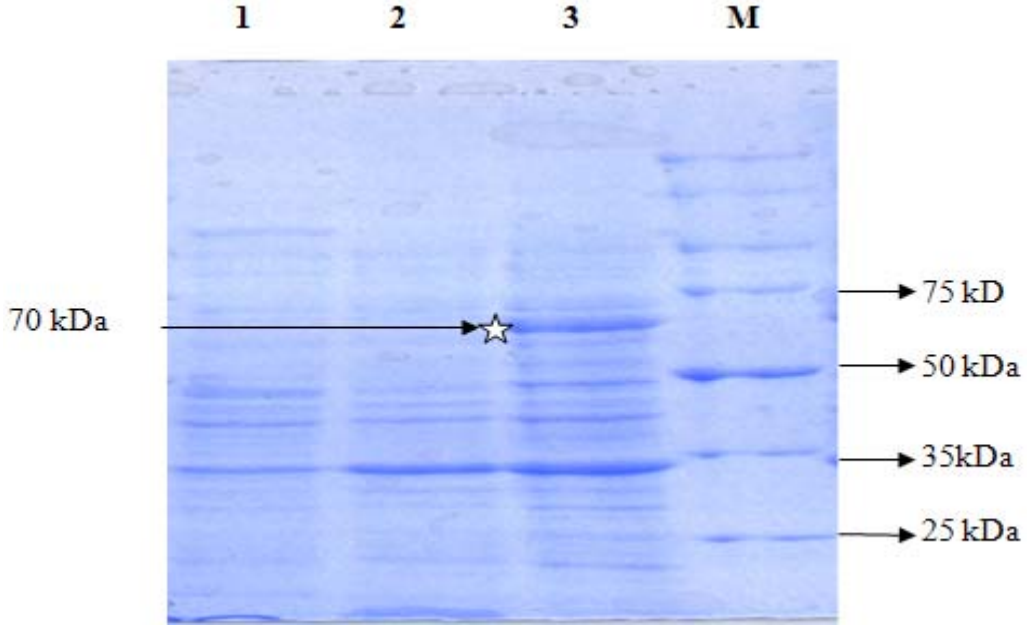
E.coli DH10 β konak hücresine aktarıldı. Elde edilen kolonilerden plazmit DNA'lar izole edildi. Bu plazmitlerin *cry2Ab* genini içerip içermediğini doğrulayabilmek için *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesim yapıldı (Şekil 19). Kesimi yapılan ekspresyon vektörünün 5369 bp büyüklüğünde olduğu gözlemlendi. Ayrıca, vektör içerisinde 1902 bp büyüklüğünde *cry2Ab* geni taşındığı bu kesim sonucunda belirlendi. *cry2Ab* genini içeren plazmitler seçildi ve sonraki protein ekspresyon çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 19. *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve *cry2Ab*'nin % 1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb DNA Ladder, 1: pET-28a(+)’nın *NdeI* ve *HindIII* kesim sonucu, 2: *cry2Ab*-pet28a rekombinant vektörünün doğrulama kesimi

3.6. Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

Protein ekspresyonu için *cry2Ab* geninin klonlandığı pET-28a(+) vektörü, *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Ayrıca, kontrol amacıyla *cry2Ab* genini içermeyen pET-28a(+) vektörü de aynı hücrelere aktarıldı. *cry2Ab* geninin klonlandığı pET-28a(+) vektörünün transform edildiği *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden, sadece pET-28a(+)’nın transfer edildiği *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden ve içerisinde plazmit bulunmayan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden proteinler ekspreslenerek SDS-PAGE’te yürütülmek üzere izole edildi. SDS-PAGE analizi sonucunda, *E. coli* BL21 (DE3) hücresinde ekspreslenmiş *cry2Ab* için 70 kDa’luk protein bantları tespit edildi. 70 kDa civarında belirlenen bant hizasında boş plazmitte ve hücrenin proteinlerinde bant gözlemlenmedi. *E. coli* BL21 (DE3) hücresine transfer edilen boş pET-28a(+) vektörünün protein bantları ile *cry2Ab* genini içeren pET-28a(+) vektörünün protein bantları karşılaştırıldığında 35 kDa civarında *E. coli* BL21 (DE3) ile aynı büyüklükte protein bandına sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 20).

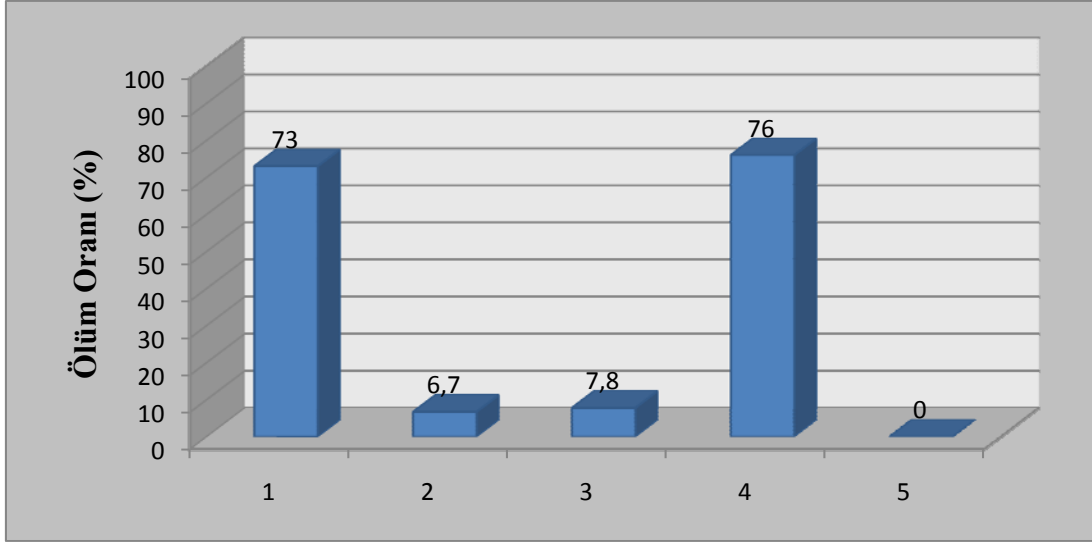


Şekil 20. *E. coli* BL21(DE3)'de üretilen cry2Ab proteinine ait SDS-PAGE analizi. 1: *E. coli* BL21(DE3) hücre proteinleri, 2: *E. coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+), 3: *E. coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+)- cry2Ab, M: Protein Markırı

3.7. Cry2Ab Proteinin *Malacosoma neustria* ve *Rhagoletis cerasi* Larvaları Üzerinde İnsektisidal Aktivitesi

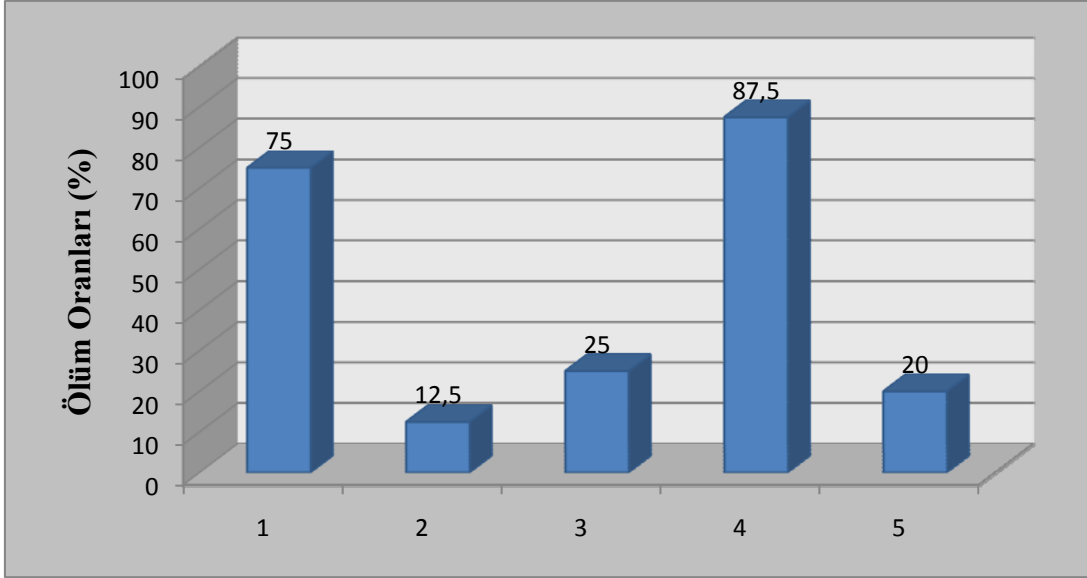
Lepidoptera takımına ait *M. neustria* larvaları ve Diptera takımına ait *R. cerasi* larvaları bu çalışmada biyotest organizmaları olarak kullanıldı.

Yüz μ g *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-Cry2Ab proteini *M. neustria* larvalarına besin yolu ile verildi ve larvalarda % 73'lük ölüm oranı gözlemlendi. Aynı zamanda, Spor-Kristal karışımının ise % 76 oranında ölüm etkisine sahip olduğu belirlendi. *M. neustria* larvaları ile yapılan biyotest sonucunda ekspreslenmiş cry2Ab proteini ve bakteriye ait spor-kristal karışımının yüksek oranda öldürücü aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 21). Ayrıca *E. coli* BL21(DE3)'de ekspreslenen cry2Ab protein'nin larvalar üzerinde gösterdiği % 73'lük ölüm oranı ile, % 76'lık ölüm oranına sahip olan *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımından daha düşük bir etkiye sahip olduğu gözlemlendi. *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin besin yoluyla verilmesinde ise larvalarda % 7,8'lik ölüm oranı ve boş plazmit içeren hücrelerin verilmesinde de % 6,8 oranında larvalarda ölüm meydana geldi.



Şekil 21. Cry2Ab proteinin (100 µg) *M. neustria* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi. 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)-Cry2Ab (100 µg), 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+) (100 µg), 3: *E. coli* BL21(DE3), 4: MnD (10⁹ Spor-Kristal/ml), 5: Negatif Kontrol

Diptera takımından *R. cerasi* larvaları ile yapılan biyotest sonucunda ekspreslenmiş olan cry2Ab proteini ve bakteriye ait spor-kristal karışımının yüksek oranda öldürücü aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Şekil 22’de görüldüğü gibi ekspreslenmiş cry2Ab proteini, % 73’lük ölüm oranına sahip iken bakteriye ait spor kristal karışımının larvalar üzerinde % 76’lık ölüm oranına sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca, BL21 hücrelerinin larvalara verilmesiyle % 25’lik ölüm meydana gelirken, boş plazmidi içeren hücrelerde ise % 12,5 oranında ölüm gerçekleşti. Bu sonuçlara göre, *E. coli* BL21(DE3)’de ekspreslenen cry2Ab’nın, *R. cerasi* larvaları üzerinde *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımından daha düşük bir etkiye sahip olduğu tespit edildi. Kiraz sineği ile çalışma hassas olduğu için deney çalışmalarında kontrol grubu larvalarında % 20 oranında ölüm ortaya çıktı. *M. neustria* larvalarında olduğu gibi kiraz sineğinde de spor kristal karışımı proteine göre daha fazla larvalarda ölüme neden oldu. Bunun sebebi ise parasporal kristal proteinler içerisinde farklı cry proteinlerinin var olmasıdır.



Şekil 22. Cry2Ab proteinin (100 µg) *R. cerasi* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi. 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-Cry2Ab (100 µg), 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) (100 µg), 3: *E. coli* BL21(DE3), 4: MnD (10⁹ Spor-Kristal/ml), 5: Negatif Kontrol

4. TARTIŞMA

Mikroorganizmalar tarafından üretilen insektisitler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdır. Fakat, düşük tesirli olmaları ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle bunların kullanımları kısıtlanmaktadır. Bunun üstesinden gelmek için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Özellikle *B. thuringiensis* bakterisi kullanılarak oluşturulan insektisitler etkili, güvenli ve spesifiktir.

Mikrobiyal insektisitlerin satışları son yıllarda büyük artış göstermiştir. Ancak, bu miktar toplam ürün koruma satışlarının % 1-1,5'lik kısmını teşkil etmektedir. Bu miktarın çok büyük bir kısmını (% 95) *B. thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır. Birçok ticari firma *B. thuringiensis* kökenli ürünleri piyasaya sürmüşlerdir ve bu ürünler, sentetik kimyasal pestisitlere göre daha düşük maliyetle elde edilmektedir. Örneğin, *B. thuringiensis* subsp. *israilensis*'den elde edilen insektisidal ürünler, sentetik kimyasal pestisitlerin 1/40 daha ucuzuna mal olmaktadır (Becker ve Margalit, 1993).

Ticari *B. thuringiensis*'ler yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, arazi uygulamalarında bazı dezavantajlara sahiptir (Kaur, 2000). Bu pestisitlerin konaklarının sınırlı olması hedef olmayan organizmalar ve çevre bakımından faydalı olurken, her farklı grup zararlı böcek için farklı bir pestisit kullanma zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, amaca uygun farklı böceklerde etkili olabilen rekombinant bakteriler geliştirmek arzu edilmektedir (Kumar ve Udayasuriyan, 2004). Ayrıca, bu bakterilere ait toksinler saflaştırılıp kullanıldıklarında bu yapılar doğada güneş ışığı, yağmur, nem, yaprak proteazları, ısı, yaprak terlemesi ve pH inaktivasyonundan etkilenmektedir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için *cry* genleri tabiatta daha uzun süre kalabilen ve bitkilerle birlikte yaşayan bakterilere klonlanmakta veya uygun formülasyonlarla korunmaktadır (Murphy ve Stevens, 1992). Bir başka dezavantaj ise bu pestisitlere karşı zararlı böceklerin dirençlilik geliştirmesidir. Bu ise aynı anda farklı toksinlerin böcek tarafından alınmasıyla önlenmektedir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için farklı kristal proteinlerine sahip rekombinant bakteriler oluşturup zirai mücadelede kullanılmasıdır (Kumar ve Udayasuriyan, 2004).

B. thuringiensis'in kristal protein geni (*cry*)'nin klonlanması ilk kez Schnepf ve Whiteley (1981) tarafından rapor edilmiştir. O zamandan beri 120'den daha fazla *cry* geni klonlanmış, karakterize edilmiş ve proteinlerin aminoasit sekans benzerliklerine bakılarak sınıflandırılmaları yapılmıştır (Crickmore vd., 1998). *cry* genleri, onları tanımlamak, insektisidal aktivitelerini belirlemek ve yüksek seviyede ifade etmek için mekik vektörler aracılığıyla *cry* geni içermeyen *B. thuringiensis* veya *E. coli*'ye klonlanarak ifade edilmektedir (Bone ve Ellar, 1989).

Klonlanan *cry* genleri farklı bakteriyal sistemlerde ekspres edildi. Şu ana kadar, *E. coli* (Kumar ve Udasuriyan, 2004), *B. thuringiensis* (Lereclus vd., 1995), *Pseudomonas cerea* (Stock vd., 1990), *Cyanobacteria* (Murphy ve Stevens, 1992), *Rhizobium* (Stock vd., 1990), *B. subtilis* ve *B. licheniformis* (Theoduloz vd., 2003) gibi çeşitli konaklar klonlanmış ve ekspresyonları yapılmıştır (Tablo 3). Kumar ve Udasuriyan (2004) tarafından *B. thuringiensis* 4Q7 acrySTALLIFEROUS suşunda hem *cry2Ab* hem de *cry2Aa* genleri ekspres edildi ve *Helicoverpa armigera* (Pamuk kurdu) zararlısına karşı insektisidal aktivite çalışmaları gerçekleştirildi.

Bacillus thuringiensis MnD bakterisi, tarım ve orman zararlısı olan *Malacosoma neustria*'dan izole edilmiş ve *cry2* genel primerleri ile *Bacillus thuringiensis* MnD bakteri DNA'sından *cry2* geni çoğaltıldı (Katı vd., 2005). Entomopatojenik bir bakteri olan *B. thuringiensis* MnD bakterisinin içerdiği *cry2* geninin alt grubunun tespit edilebilmesi için dejenerat primer dizayn edildi. PZR yöntemi ile çoğaltılan gen, pGEM-T Easy vektöre klonlandı. Elde edilen doğru klonlar DNA dizin analizine gönderilerek gelen sonuçlar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda, genin nükleotid ve aminoasit sırası belirlendi. *cry2Ab* geni 1902 bp büyüklüğünde olup, 633 aminoasit içerdiği tespit edildi. Aminoasit sırası belirlenen genin BLAST programı yardımıyla *cry2Ab* grubuna ait olduğu tespit edildi (Şekil 16). Karşılaştırma sonucunda *cry2Ab* proteininin literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*'nin sahip olduğu *cry2Ab1*, *cry2Ab2*, *cry2Ab3*, *cry2Ab5*, *cry2Ab8* kristal genleriyle % 99 benzerlik gösterdiği ortaya çıktı. *Bacillus thuringiensis* MnD bakterisi için yapılan tüm biyokimyasal, moleküler çalışmalar ve özellikle H-serotiplendirme sonucu bakterinin *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* olduğu tespit edildi (Katı vd., 2005).

cry2A genleri yaklaşık olarak 65 kDa büyüklüğünde proteinleri kodlamaktadır. Literatürde *cry2Aa*, *cry2Ab* ve *cry2Ac* olmak üzere 3 gen rapor edilmiştir. *Cry2Aa*

proteinleri Lepidoptera ve Diptera takımlarına karşı toksik iken cry2Ab ve cryAc proteinleri sadece Lepidoptera takımına karşı toksiktir.

Kolay çalışılabilir olması ve rahat elde edilebilmesi nedeniyle bu çalışmada da klonlama ve ekspresyon için konak olarak *E. coli* kullanıldı. Gerçekleştirilen bu çalışmada, *B. thuringiensis* MnD bakterisinin cry2Ab geni tam olarak elde edildikten sonra genin ekspresyonu için indüklenebilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET-28a(+)'ya klonlanarak *E. coli* BL21(DE3) konak hücresinde ekspres edildi. Ekspres edilen proteinin büyüklüğü yaklaşık 70 kDa civarında olduğu SDS-PAGE analiziyle belirlendi. Proteinin ağırlığı DNASTAR programı aracılığıyla 70877 Da olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, SDS-PAGE analiziyle desteklendi.

Lin ve arkadaşları (2008) cry2Ab10 kristal proteinin klonlanması, ekspresyonu ve insektisidal aktivitesinin belirlenmesine yönelik çeşitli çalışma yapıldı. Bu araştırmacılar cry2Ab10 proteinini *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekspres ettiler ve cry2Ab10 geninin 1902 bp DNA fragmentine ve 633 aminoaside sahip olup olduğunu belirlediler. SDS-PAGE analiz sonuçları ekspreslenen ürünün moleküler ağırlığını 60 kDa olarak gösterirken, moleküler ağırlığını 71 kDa olarak hesapladılar. Bunun en önemli nedenini ise cry2Ab10 proteinin sadece 3 tane sistein içermesinden dolayı, ekspreslenen proteinlerin *E. coli* proteazları tarafından kolay bir şekilde parçalanması olarak açıkladılar. Bu tez kapsamında da çalışılan cry2Ab geninin 1902 bp büyüklüğünde olduğu ve 633 aminoaside sahip olduğu belirlendi. SDS PAGE analizi ve DNA star programı aracılığı ile proteinin moleküler ağırlığı 70 kDa olarak ortaya konuldu.

Mısra ve arkadaşları (2002) *B. thuringiensis* subsp. *kenyae*'den 1900 kb büyüklüğünde bir insektisidal kristal proteininin klonlanmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirdiler. Klonlanan gen sekans edildiğinde 1937 nukleotid uzunluğunda olduğu belirlendi. Fakat, PCGENE software analiziyle 1902 bp nukleotidinin açık okuma zincir (ORF) bölgesi olduğunu ortaya konuldu. Genin 1902 bp uzunluğunda olup 633 aminoasiti kodladığı ve 71 kDa ağırlığında olduğunu belirlendi.

Kumar ve arkadaşları (2004) tarafından yerel izolatlardan klonlanan genlerin kodladığı Cry2A proteinlerinin analizlerini gerçekleştirdikleri bir çalışmada, cry2Aa ve cry2Ab genlerini içeren yerel izolatlardan, T7 promotörü kontrolünde ekspreslenen cry2Aa ve cry2Ab proteinlerinin *Helicoverpa armigera* üzerindeki insektisidal aktivitelerini belirlediler. Biotestler sonucunda, üre'de solubilize olan cry2Aa proteinleri *H. armigera*'ya karşı % 100 aktivite gösterirken, aynı koşullarda solubilize olan cry2Ab proteinlerinin *H. armigera*'ya karşı insektisidal aktivite göstermediği tespit edildi.

B. thuringiensis Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarındaki birçok böceğe karşı yüksek insektisidal etkiye sahip bakteridir. Çalışmada kullanılan yerel *B. thuringiensis*'den elde edilen *cry2Ab* geni, *E. coli* BL21(DE3) bakterisinde ekspres edilmiş olup izole edildiği zararlı üzerindeki insektisidal aktivite sonuçları belirlendi. Cry2 proteinleri hem Lepidoptera hem de Diptera takımında yer alan birçok zararlı böceğin biyolojik mücadelesinde kullanılmaktadır. Fakat cry proteinin alt grupları farklı takımlar üzerinde etkilidir. Böylece, literatürde *cry2Aa* proteinleri Lepidoptera ve Diptera takımlarındaki zararlılara karşı toksik etki gösterirken *cry2Ab* proteini ise Lepidoptera takımındaki zararlılara karşı toksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ise ekspreslenmiş olan *cry2Ab* proteinin insektisidal aktivitesini belirlemek amacıyla Lepidoptera takımına ait *M. neustria* ve Diptera takımına ait *R. cerasi* larvaları üzerinde insektisidal aktivite çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için ekspreslenmiş *cry2Ab* proteininin yanı sıra sadece pET-28a(+)'yı içeren *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)'in kendi proteinleri ve *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımı da kullanıldı. Lepidoptera takımına ait *M. neustria* larvaları üzerinde 100 µg konsantrasyondaki *cry2Ab* proteini % 73 oranında öldürücü etki gösterdi. Aynı konsantrasyonda *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) % 6,7, *E. coli* BL21(DE3) % 7,8 ve sporkristal karışımı da % 76'lık bir etki gösterdi. *M. neustria* larvaları üzerinde *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekspreslenen Cry2Ab'nın *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımına göre daha düşük bir insektisidal aktivite gösterdiği belirlendi. Bunun düşüşün sebebi, larvalar tarafından yenen *B. thuringiensis* spor-kristal karışımının bakterinin yoğunluğuna, tipine, Cry toksinlerinin konsantrasyonuna, farklı kombinasyonlarına ve türüne bağlı olarak büyük oranda değiştiğidir. Ayrıca, böcek türlerine ve böceğin bağırsağında bulunan diğer mikroorganizmalara bağlı olabilir (Hansen vd., 1998).

Kiraz, Türkiye'nin önemli meyve ürünlerinden biridir. Bu kadar önemli bir ürün olmasına rağmen ülkemizde ve Avrupa'da kiraz'ın birçok zararlısı vardır. Bu zararlılardan en önemlisi kiraz sineği (*Rhagoletis cerasi*)'dir. Kiraz sineği larvaları ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Şu ana kadar kiraz sineğine karşı en çok denen biyolojik mücadele yöntemleri mekaniksel mücadele yöntemlerinden feromon tuzakları esaslı olmasına rağmen, henüz daha verimli kullanılacak bir biyolojik mücadele sistemi geliştirilememiştir (Katsoyannos vd., 2000). Kleespies ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada, Almanya'da kiraz sineğinde fungus, nematod ve bakteri entomopatojenlerinin varlığının belirtilmesi konusunda bilgiler olmasına rağmen bu

patojenlerin tanımlanmaları ve biyolojik mücadele potansiyelleri konusunda şu ana kadar kayda değer bir çalışma yayınlanmamıştır. Köppler ve arkadaşları (2004) yürüttükleri bir çalışmayla kiraz sineğinin entomopatojenik nematodlarla kontrol edilebileceklerini göstermişler. Ayrıca, Daniel ve Wyss (2008) İsviçre’de *Beauveria bassiana* entomopatojenik fungusunu uygulayarak meyvelerde hasarın % 69 oranında azaldığı göstermiştir.

Kiraz sineğine karşı biyolojik mücadele etmenlerinden fungus ve nematod uygulama çalışmaları mevcut iken, entomopatojenik bakteri ile biyolojik mücadele çalışmaları literatürde henüz mevcut değildir. *R. cerasi* üzerine yapılan bu çalışmaların etkili bir sonuç vermediği, bu nedenle bu çalışmayla kiraz üretiminde çok önemli ekonomik kayıplara neden olan *R. cerasi* zararlısıyla mücadelede *B. thuringiensis* cry2 proteinin etkinliği belirlendi. Kiraz sineği üzerinde 100 µg konsantrasyondaki cry2Ab % 75 oranında öldürücü etki gösterdi. Aynı konsantrasyonda *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) % 12,5, *E. coli* BL21(DE3) % 25 ve sporkristal karışımı da % 87,5’lık bir etki gösterdi. Ölüm oranları Abbott formülüne göre hesaplanmış olup, *Rhagoletis cerasi* larvaları üzerinde *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ekspreslenen cry2Ab proteinin, *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımına göre daha düşük bir insektisidal aktivite gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak, *B. thuringiensis* MnD bakterisine ait spor-kristal karışımının *E. coli*’de ekspreslenmiş olan Cry2Ab proteinine göre daha etkili olmasının sebebi kristal ve spor içermesidir. Ayrıca, literatürde *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* bakterisinin 2 tane cry2, 3 tane de cry1 geni içerdiği belirtilmiştir. Bu nedenler spor-kristal karışımının öldürme etkisine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Ülkemizde tarım ve orman alanlarında önemli zarar oluşturan ve ekonomik kayıplara neden olan *Malacosoma neustria* zararlısında izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisine ait cry2Ab geninin ekspresyonu ve insektisidal aktivite çalışmaları yapıldı. Bu tez kapsamında çalışılan cry2Ab geninin 1902 bp uzunluğunda olduğu, 633 aminoasit içerdiği ve literatürdeki *B. thuringiensis* cry2Ab genine % 99 benzer homoloji gösterdiği tespit edildi. Kolay çalışabilir olması nedeniyle seçilen *E. coli* bakteriyal konakta ekspresyonu gerçekleştirildi. SDS page analiz sonucunda 70 kDa civarında protein bandı elde edildi. Ekspreslenen ürünler *M. neustria* zararlısı üzerinde % 73 insektisidal aktivite gösterirken, *R. cerasi* üzerinde % 75 insektisidal etki gösterdiği belirlendi. Bu sayede ekonomik değeri yüksek olan ürün kayıplarını önlemek amacıyla biyolojik mücadele etmeni geliştirme yönünde bu tez çalışması ile çok önemli bir adım atılmış oldu.

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Malacosoma neustria*'dan izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisine ait *cry2Ab* geninin klonlanması, karakterizasyonu, ekspresyonu ve *Malacosoma neustria* ve *Rhagoletis cerasi* larvaları üzerinde insektisidal aktivite testleri yapıldı. Bu tez kapsamında;

1. *Malacosoma neustria* orjinli *Bacillus thuringiensis*'e ait *cry2Ab* geni 1902 nt'lik bir ORF'ye sahiptir.
2. Elde edilen *cry2Ab* geni 633 aminoasitten oluşan 70 kDa'lık bir protein kodlamaktadır.
3. Cry2Ab proteini literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*'in sahip olduğu *cry2Ab1*, *cry2Ab2*, *cry2Ab3*, *cry2Ab5* ve *cry2Ab8* proteinleri ile % 99 yüksek oranda benzer homolojiye sahiptir.
4. Cry2Ab proteinin *Malacosoma neustria* larvalarına karşı % 73 ve *Rhagoletis cerasi* larvalarına karşı % 75'lik bir insektisidal aktiviteye sahiptir.

6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinsektisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizmalar entomopatojenik bakterilerdir.

Yıllardan beri entomopatojenik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve bir o kadar çalışma da hala daha devam etmektedir. Böylece, tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hale getirilebilmektedir. *B. thuringiensis*'e ait çok sayıda ürün piyasada bulunmaktadır. Bu anlamda *B. thuringiensis* bakterisinin ve bakteride bulunan kristal yapıda toksin üreten *cry* genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, moleküler özellikleri belirlenen *cry2Ab* geninin, böcekler üzerindeki etkilerini artırmak amacıyla yine böcekler üzerinde etkili olan farklı genlerle (Diğer *cry* genleri, *cyt* genleri ve kitinaz gibi) bir araya getirilerek füzyon protein oluşturulabilir.

Daha önce bu bakteride genel primerler ile varlığı belirlenen *cry1* geni *E. coli*'de ayrı ayrı ekspres edilerek zararlılar üzerinde insektisidal aktiviteleri belirlenmiş olup böceklerin dirençliliği ortadan kaldırılabilir.

Bacillus thuringiensis bakterisi bir toprak grubu bakterisi olduğu için toprak grubuna örnek olan *Pseudomonas* cinsi bakterilere klonlanıp insektisidal aktivite sonuçları değerlendirilebilir.

Cry2Ab proteininin saflaştırılarak laboratuvar koşullarında insektisidal etkisinin belirlenmesi ve saf proteinin sera koşullarındaki insektisidal aktivitesi belirlenebilir. Ayrıca, sera koşullarında insektisidal aktiviteyi etkileyen faktörlerde belirnebilir.

Elde edilen *Cry2Ab* proteininin insektisidal aktivitesini tam olarak belirleyebilmek için farklı böcek türleri üzerinde de insektisidal aktivite çalışmaları yapılması uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Abbott, W. S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Abdel Hameed, A. ve Landen, R., 1994. Studies on *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Swedish soils: insect toxicity and production of *B. cereus* diarrhoeal-type enterotoxin, World J. Microbiol. Biotech., 10, 406-409.
- Akar, N., 1998. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş , Antip, Ankara, 58-62.
- Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. ve Collins. M. D., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S ribonucleic acid, Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 343-346.
- Becker, N. ve Margalit, J., 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against Mosquitoes and Blackflies,. 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, 145-170.
- Bone, E. J. ve Ellar, D. J., 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation, FEMS Microbiology Letters, 58, 171-178.
- Bora, R. S., Murty, M. G., Shenbagarathai R. ve Sckar, V., 1994. Introduction of a lepidopteran specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*, subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere, Appl. Env. Microbiol.. 60, 214-222.
- Boucias D. G. ve Pendland J. C., 1988. Principles of Insect Pathology, Kluwer Academic Publishers, Boston Dordrecht London, 568.
- 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., Gill, S. S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, Toxicon, 49, 423-435.
- Bülbüloğlu Ö., 2000. Çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus thuringiensis*'lerin izolasyonu, karakterizasyonu ve insektisidal etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Chattopadhyay, A., Bhatnaga, N. B. ve Bhatnagar, R., 2004. Bacterial Insecticidal Toxins, Critical Reviews in Microbiology, 30, 33-54.

- Carlson, C. R., Caugant, D. A. ve Kolsto, A. B., 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1719-1725.
- 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.
- 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.
- Chak, K. F., Tseng M. Y. ve Yammoto T., 1994. Expression of the crystal protein gene under the control of the α -amylase promoter in the *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Env. Microbiol. 60, 2304-2310.
- Chang, Y. H., Shangkuan, Y. H., Lin, H. C. ve Liu, H. W., 2003. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells, Applied and Enviromental Microbiology, 69, 4502-4510.
- Copping, L. G. (ed.), 1998. The Biopestiticide Manual, British Crop Protection Council, Franham, Surrey, U.K.
- 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 Dean, D. H., 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 807-813.
- Damgaard, P. H., Jacobsen, C. S. ve Sorensen, J., 1996. Development and application of a primer set for specific detectson of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic capture hybridization and PCR amplification, Sys. Appl. Microbiol., 19, 436-441.
- Daniel, C. ve Wyss, E., 2008. Field applications of entomopathogenic fungi against *Rhagoletis cerasi*. 13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg/Germany, 18.02.2008 - 20.02.2008.

- 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., 35-43.
- Demir, İ., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2002. The first study on bacterial flora and biological control agent of *Anoplus roboris* (Sufr., Coleoptera), *The Journal of Microbiology*, 40, 104-108.
- Demirbağ, Z. (ed.), Nałçacıođlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. *Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele*, Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon.
- de Maagd, R. A., Bosch, S. ve Stiekema, W., 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. *Science*, 4, 09-13.
- Delecluse. A., Rosso, M. L. ve Ragni, A., 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61, 4230-4235.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. ve Koziel M. G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insect, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 93, 5389- 5394.
- Feitelson, J. S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, In Kim, L. (ed.), *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker. Inc., New York, 63-71.
- Glare, T. R. ve O'Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, New York, 1-40.
- Gould, F., Martincz-Rarnircz A., Anderson A., Ferrc J., Silva F. J. ve Moar, J., 1992. Broad-spcctrurn resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*, *Proc. Natl. A cad. Sci. USA*. 89,7986-7990.
- 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., 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, *J. Invertebr. Pathol.*, 71, 106-114.
- Herrera. G., Snyam, S. J. ve Thomson, J. A., 1997. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against sugarcane borer. In : *Insect resistant maize, recent advances and utilization - Mexico, DF(Mexico) CIMMYT*.
- Höfte, H. ve Whiteley H. R., 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.

- İnce, İ. A., Katı, H., Yılmaz, H., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2008. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoidae) and determination of their biocontrol potential, World J Microbiol. Biotechnol., 24, 3005-3015.
- Joung K. B. ve Cote J. C., 2001. A phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars by RFLP-based ribotyping, Journal of Applied Microbiology, 91, 279-289.
- Kalman, S., Kichne K. L., Libs J. L. ve Yamamoto T., 1993. Cloning of a novel *CryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Env. Microbiol., 59, 1131-1137.
- Katı, H. 2003. Doğal Ortamlardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis*'lerin Karakterizasyonu ve İnsektisidal Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Katı, H., Sezen K., Beldüz, A. O. ve Demirbağ, Z., 2005. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* strain isolated from *Malacosoma neustria* L. (Lepidoptera : Lasiocampidae) Biologia, Bratislava. 60, 3, 301-305.
- Katsoyannos, B. I., Papadopoulos, N. T. ve Stavridis, D., 2000. Evaluation of Trap Types and Food Attractants for *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 93, 1005-1010.
- Kaur, S., 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* Biopesticides, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, 781-793.
- Kleespies, R. G., Huger, A. M. ve Zimmermann, G., 2008. Diseases of insects and other arthropods: results of diagnostic research over 55 years, Biocontrol Science and Technology, 18, 439-482.
- 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, 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.), Academic Press, London. pp. 275-308
- Köppler, K., Peters, A. ve Vogt, H. 2004. Basic results in biological control of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) with entomopathogenic nematodes, 11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing. Proceedings of the conference, Weinsberg, Germany, 3-5 February.
- Kronstad, J. W. ve Whiteley, H. R., 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene, Gene, 43, 29-40.
- Kumar, S. ve Udayasuriyan, V., 2004. Cloning of *cry2Aa* and *cry2Ab* genes from new isolates of *Bacillus thuringiensis* and their expression in recombinant *Bacillus*

- thuringiensis* and *Escherichia coli* strains, World Journal of Microbiology and Biotechnology 20, 11–17.
- Kuo, W. S. ve Chak, K. F., 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1369-1377.
- Lambert, B., Theunis W., Ageda K. R., Van Audenhove K., Dewell K. C., Janssens S., Seurin K. J. ve Peferoen M., 1994. Nucleotide Sequence of Gene *cryIIID* Encoding a Novel Coleopteran-Active Crystal Protein from Strain BT109p of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Gene, 110, 131–132.
- Lenin K., Udayasuriyan V. ve Kannaiyan S., 2007. Diversity in *cry* genes of *Bacillus thuringiensis*, NBA Scientific Bulletin Number-10, National Biodiversity Authority, Chennai, TamilNadu, India, 56.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M. ve Chaufaux, J., 1995. Over Production of Encapsulated Insecticidal Crystal Proteins in a *Bacillus thuringiensis sp0A* 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.
- Lin, Y., Fang, G. ve Cai, F., 2008. The insecticidal crystal protein Cry2Ab10 from *Bacillus thuringiensis*: cloning, expression and structure simulation, Biotechnol. Lett., 30, 513-519.
- Logan, N. A. ve Berkeley, R. C. W., 1984. Identification of *Bacillus* strains using the API system, Journal of General Microbiology, 130, 1871-1882.
- Matsuyama, J., Yamamoto, K., Miwatani, T. ve Honda, T., 1995. Monoclonal antibody developed against a hemolysin of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Immunol., 39, 619-622.
- McGaughey, W. H., 1985. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indian meal moths in farm grain bins and elevator silos. J. Econ. Entomol., 81, 28-33.
- Misra, H. S., Khairnar, N. P., Mathur, M., Vijayalakshmi, N., Hire, R. S., Dongre, T. K. ve Mahajan, S. K., 2002. Cloning and characterization of an insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*, Journal of Genetics, 81, 1.
- Moar, W. J., Trumble, J. T., Hice R. H. ve Backman, P. A., 1994. Insecticidal activity of the CryIIA protein from the NRD 12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *E. coli* and *B. thuringiensis* and in a leaf colonizing strain of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 896-902.
- Murphy R. C. ve Stevens, S. E., 1992. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity, Appl. Envir. Microbiol., 58, 1650-1655.

- 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.
- Research Council, 1984. Subcommittee Insect Pest, Insect Pest management and Control, Washington, 150-155.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, No:8 (1. Baskı) Isparta, 98-101s.
- Özgür, A. F., 1990. Depolanmış ürün zararlıları, C. U. Ziraat Fakültesi Yayınları, 23, 38-40.
- Öztürk, F., 2001. Malathion ve gamma radyasyonun kırma biti (*Tribolium confusum* J. du Val.)'nin gelişim evreleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Öztürk, F., 2007. Ankara'daki topraklardan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Parker, M. W. ve Feil, S. C., 2005. Pore-forming protein toxin: from structure to function, Progr. Biophys. Mol. Biol., 88, 91-142.
- Poncet, S., Delecluse, A., Anello, G., Klier A. ve Rapoport, G., 1997. Transfer and expression of the *cry*/VB and *cry*IVD genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *B. sphaericus* 2297. FEMS Microbiol. Lett., 117, 91-96.
- Porcar, M. ve Juarez-Perez, V., 2003. PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes, FEMS Microbiol. Rev., 26, 419-432.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., 1998. *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, 9nd Edition, Volume 2, by edited Collier L., Balows, A. and Susman, M., Oxford University Press, New York, 709-730.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y. ve Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin, Biochimie, 82, 109-116 .
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampson, M. N. ve Gooday, G. W., 1998. Involvement of citinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insect, Microbiol. Reading, 144, 2189- 2194.
- Sasaki, J., Asano, S., Hashimoto, N., Lay, B. W. ve Hastowo S., 1997. Characterization of a *cry*2Aa gene cloned from an isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *satto*. Curr. Microbiol., 35, 1-8.

- Schnepf, H. E. ve Whiteley, H. R., 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2893-2897.
- 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.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidia), Biologia, Bratislava, 59/3, 327-331.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop Horticultural Science, 35, 79-85.
- Shin B. S., Park, S. H., Choi, S. K., Koo, B. T., Lec, S. T. ve Kim, JI., 1995. Distribution of cryV-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of cryV-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*, Appl. Envir. Microbiol. 61, 2402-2407.
- Smith, R. F., 1980. Consideration on safety of certain biological agents for arthropod control, Bull WHO, 48, 685-698.
- Stock, C. A., McLoughlin T. J., Klein J. A. ve Adang, M. J., 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene *Pseudomonas cepacia* 526. Can. J. Microbiol., 36, 879-884.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. ve Kumar, V., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0, Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.
- Tanada, Y. ve Kaya, H. K., 1993. Insect Pathology, Academic Pres, San Diego.
- Thanabalu, J. T., Hindley, J., Brenner, S., Gei, C. ve Berry, C., 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae, Appl. Environ. Microbiol., 58, 905-910.
- Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., Gonzalez, E. ve Meza-Basso, L., 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin cry1Ab Gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* Strains that Naturally Colonize The Phylloplane of Tomato Plants(*Lycopersicon esculentum*, Mills), J. Appl. Microb. 94, 375-381.
- 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.

- 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.), Edward Arnold, London. pp, 187-210.
- Udayasuriyan, V., Nakamura, A., Masaki, H. ve Uozumi, T., 1995. Transfer of an insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* into plant-colonizing *Azospirillum*. World J. Microbiol. Biotechnol., 11, 163-167.
- URL-1, www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm, *Bacillus thuringiensis*, 22 Haziran 2002.
- URL-2, www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, δ -Endotoksinlerin Tam Listesi, 16 Ekim 2009.
- 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.
- Vural, N., 1996. Toksikoloji, Çevremizde ve endüstride bulunan önemli toksik maddeler, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 344-401.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. ve Lane D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, Journal of Bacteriology, 91, 697- 703.
- Widner, W. R. ve Whiteley, H. R., 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* possess different host range specificities, J. Bacteriol., 171, 965-974.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. ve Noller, H. R., 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids, Microbiol. Rev. 47, 621-669.
- Xiao Qiang, W., Vennison, S. J., Huirong, L., Ben-Dov, E., Zaritsky, A. ve Boussiba, S., 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of gene from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Appl. Envir. Microbiol., 63, 4971-4974.
- Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T. ve Oshma, Y., 1983. Distribution of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus* spp., Applied and Environmental Microbiology, 46 ,6, 1268-1275.
- Zeigler, D. R., 1999. *Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus*, *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains Seventh Edition, National Science Foundation, Columbus, Ohio, 36-38.

8. EKLER

Ek Tablo 1. Yeni sınıflandırma sistemine göre Cry toksinlerinin listesi
(URL-2, 2009)

İsim	Acc No.	Yazarlar	Yıl	Kaynak suş
<u>CryIAa1</u>	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1
<u>CryIAa2</u>	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto
<u>CryIAa3</u>	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7
<u>CryIAa4</u>	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus
<u>CryIAa5</u>	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7
<u>CryIAa6</u>	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12
<u>CryIAa7</u>	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12
<u>CryIAa8</u>	I26149	Liu	1996	
<u>CryIAa9</u>	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1
<u>CryIAa10</u>	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02
<u>CryIAa11</u>	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki
<u>CryIAa12</u>	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30
<u>CryIAa13</u>	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto
<u>CryIAa14</u>	AAP40639	Ren et al	2002	unpublished
<u>CryIAa15</u>	AAAY66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12
<u>CryIAb1</u>	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715
<u>CryIAb2</u>	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki
<u>CryIAb3</u>	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1
<u>CryIAb4</u>	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1
<u>CryIAb5</u>	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715
<u>CryIAb6</u>	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12
<u>CryIAb7</u>	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1
<u>CryIAb8</u>	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7
<u>CryIAb9</u>	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133
<u>CryIAb10</u>	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1
<u>CryIAb11</u>	I12419	Ely & Tippett	1995	Bt A20
<u>CryIAb12</u>	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93
<u>CryIAb13</u>	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005
<u>CryIAb14</u>	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt
<u>CryIAb15</u>	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16
<u>CryIAb16</u>	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11
<u>CryIAb17</u>	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9
<u>CryIAb18</u>	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt
<u>CryIAb19</u>	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2
<u>CryIAb20</u>	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008
<u>CryIAb21</u>	ABS18384	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056
<u>CryIAb22</u>	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab
<u>CryIAb-like</u>	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24
<u>CryIAb-like</u>	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28
<u>CryIAb-like</u>	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27
<u>CryIAb-like</u>	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3
<u>CryIAc1</u>	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73
<u>CryIAc2</u>	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenyae

Ek 1'in devamı

<u>Cry1Ac3</u>	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A
<u>Cry1Ac4</u>	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1
<u>Cry1Ac5</u>	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG
<u>Cry1Ac6</u>	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12
<u>Cry1Ac7</u>	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73
<u>Cry1Ac8</u>	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73
<u>Cry1Ac9</u>	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732
<u>Cry1Ac10</u>	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520
<u>Cry1Ac11</u>	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998	
<u>Cry1Ac12</u>	I12418	Ely & Tippett	1995	Bt A20
<u>Cry1Ac13</u>	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1
<u>Cry1Ac14</u>	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30
<u>Cry1Ac15</u>	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan
<u>Cry1Ac16</u>	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3
<u>Cry1Ac17</u>	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenyae HD549
<u>Cry1Ac18</u>	AAV88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729
<u>Cry1Ac19</u>	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33
<u>Cry1Ac20</u>	ABB89046	Tan et al	2005	
<u>Cry1Ac21</u>	AAV66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12
<u>Cry1Ac22</u>	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1
<u>Cry1Ac23</u>	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt
<u>Cry1Ac24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01
<u>Cry1Ac25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6
<u>Cry1Ac26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4
<u>Cry1Ac27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B
<u>Cry1Ad1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I
<u>Cry1Ad2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1
<u>Cry1Ae1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti
<u>Cry1Af1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423
<u>Cry1Ag1</u>	AAD46137	Mustafa	1999	
<u>Cry1Ah1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000	
<u>Cry1Ah2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti
<u>Cry1Ai1</u>	AAO39719	Wang et al	2002	
<u>Cry1A-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3
<u>Cry1Ba1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2
<u>Cry1Ba2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110
<u>Cry1Ba3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001	
<u>Cry1Ba4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9
<u>Cry1Ba5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12
<u>Cry1Ba6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601
<u>Cry1Bb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847
<u>Cry1Bc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni
<u>Cry1Bd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525
<u>Cry1Bd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834
<u>Cry1Be1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2
<u>Cry1Be2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003	
<u>Cry1Be3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt
<u>Cry1Bf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001	
<u>Cry1Bf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003	

Ek 1'in devamı

<u>Cry1Bg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002	
<u>Cry1Ca1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5
<u>Cry1Ca2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29
<u>Cry1Ca3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II
<u>Cry1Ca4</u>	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110
<u>Cry1Ca5</u>	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29
<u>Cry1Ca6</u> [1]	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2
<u>Cry1Ca7</u>	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8
<u>Cry1Ca8</u>	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002
<u>Cry1Ca9</u>	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A
<u>Cry1Ca10</u>	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a
<u>Cry1Ca11</u>	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33
<u>Cry1Cb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29
<u>Cry1Cb2</u>	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001
<u>Cry1Cb3</u>	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087
<u>Cry1Cb-like</u>	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1
<u>Cry1Da1</u>	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68
<u>Cry1Da2</u>	I76415	Payne & Sick	1997	
<u>Cry1Db1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A
<u>Cry1Db2</u>	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
<u>Cry1Dc1</u>	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	Bt JC291
<u>Cry1Ea1</u>	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyae 4F1
<u>Cry1Ea2</u>	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyae
<u>Cry1Ea3</u>	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyae PS81F
<u>Cry1Ea4</u>	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyae LBIT-147
<u>Cry1Ea5</u>	A15535	Botterman et al	1994	
<u>Cry1Ea6</u>	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032
<u>Cry1Ea7</u>	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190
<u>Cry1Ea8</u>	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2
<u>Cry1Eb1</u>	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2
<u>Cry1Fa1</u>	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346
<u>Cry1Fa2</u>	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II
<u>Cry1Fb1</u>	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A
<u>Cry1Fb2</u>	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67
<u>Cry1Fb3</u>	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni
<u>Cry1Fb4</u>	AAC10641	Payne et al	1997	
<u>Cry1Fb5</u>	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
<u>Cry1Fb6</u>	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012
<u>Cry1Fb7</u>	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087
<u>Cry1Ga1</u>	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A
<u>Cry1Ga2</u>	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis
<u>Cry1Gb1</u>	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525
<u>Cry1Gb2</u>	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88
<u>Cry1Gc</u>	AAQ52381	Baum et al	2003	
<u>Cry1Ha1</u>	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA
<u>Cry1Hb1</u>	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190
<u>Cry1H-like</u>	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291
<u>Cry1Ia1</u>	CAA44633	Taylor et al	1992	Bt kurstaki
<u>Cry1Ia2</u>	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki

Ek 1'in devamı

<u>Cry1Ia3</u>	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1
<u>Cry1Ia4</u>	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88
<u>Cry1Ia5</u>	CAA70124	Selvapandiyani	1996	Bt 61
<u>Cry1Ia6</u>	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101
<u>Cry1Ia7</u>	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt
<u>Cry1Ia8</u>	AAK66742	Song et al	2001	
<u>Cry1Ia9</u>	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30
<u>Cry1Ia10</u>	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis
<u>Cry1Ia11</u>	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3
<u>Cry1Ia12</u>	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt
<u>Cry1Ia13</u>	ABF83202	Martins et al	2006	Bt
<u>Cry1Ia14</u>	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11
<u>Cry1Ia15</u>	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B
<u>Cry1Ia16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A
<u>Cry1Ib1</u>	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465
<u>Cry1Ib2</u>	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61
<u>Cry1Ib3</u>	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8
<u>Cry1Ic1</u>	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18
<u>Cry1Ic2</u>	AAE71691	Osman et al	2001	
<u>Cry1Id1</u>	AAD44366	Choi	2000	
<u>Cry1Ie1</u>	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007
<u>Cry1If1</u>	AAQ52382	Baum et al	2003	
<u>Cry1I-like</u>	AAC31094	Payne et al	1998	
<u>Cry1I-like</u>	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3
<u>Cry1Ja1</u>	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847
<u>Cry1Jb1</u>	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092
<u>Cry1Jc1</u>	AAC31092	Payne et al	1998	
<u>Cry1Jc2</u>	AAQ52372	Baum et al	2003	
<u>Cry1Jd1</u>	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt
<u>Cry1Ka1</u>	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190
<u>Cry1La1</u>	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1
<u>Cry1-like</u>	AAC31091	Payne et al	1998	
<u>Cry2Aa1</u>	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki
<u>Cry2Aa2</u>	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
<u>Cry2Aa3</u>	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto
<u>Cry2Aa4</u>	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenyae HD549
<u>Cry2Aa5</u>	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39
<u>Cry2Aa6</u>	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71
<u>Cry2Aa7</u>	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29
<u>Cry2Aa8</u>	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66
<u>Cry2Aa9</u>	AAO13750	Zhang et al	2000	
<u>Cry2Aa10</u>	AAQ04263	Yao et al	2001	
<u>Cry2Aa11</u>	AAQ52384	Baum et al	2003	
<u>Cry2Aa12</u>	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39
<u>Cry2Aa13</u>	ABL01536	Arango et al	2008	Bt 146-158-01
<u>Cry2Aa14</u>	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550
<u>Cry2Ab1</u>	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
<u>Cry2Ab2</u>	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1
<u>Cry2Ab3</u>	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002

Ek 1'in devamı

<u>Cry2Ab4</u>	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
<u>Cry2Ab5</u>	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30
<u>Cry2Ab6</u>	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7
<u>Cry2Ab7</u>	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1
<u>Cry2Ab8</u>	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2
<u>Cry2Ab9</u>	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6
<u>Cry2Ab10</u>	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD
<u>Cry2Ab11</u>	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
<u>Cry2Ab12</u>	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD
<u>Cry2Ab13</u>	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4
<u>Cry2Ab14</u>	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts
<u>Cry2Ac1</u>	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1
<u>Cry2Ac2</u>	AAG35410	Song et al	2000	
<u>Cry2Ac3</u>	AAQ52385	Baum et al	2003	
<u>Cry2Ac4</u>	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9
<u>Cry2Ac5</u>	ABC74969	Zhang et al	2005	
<u>Cry2Ac6</u>	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis
<u>Cry2Ac7</u>	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1
<u>Cry2Ac8</u>	CAM09325	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
<u>Cry2Ac9</u>	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
<u>Cry2Ac10</u>	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1
<u>Cry2Ac11</u>	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29
<u>Cry2Ac12</u>	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3
<u>Cry2Ad1</u>	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30
<u>Cry2Ad2</u>	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10
<u>Cry2Ad3</u>	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5 2AcT(1)
<u>Cry2Ad4</u>	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
<u>Cry2Ad5</u>	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29
<u>Cry2Ae1</u>	AAQ52362	Baum et al	2003	
<u>Cry2Af1</u>	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81
<u>Cry2Ag</u>	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2
<u>Cry2Ah</u>	EU939453	Zhang et al	2008	Bt
<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt
<u>Cry3Aa1</u>	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego
<u>Cry3Aa2</u>	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis
<u>Cry3Aa3</u>	CAA68482	Hofte et al	1987	
<u>Cry3Aa4</u>	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis
<u>Cry3Aa5</u>	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158
<u>Cry3Aa6</u>	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis
<u>Cry3Aa7</u>	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22
<u>Cry3Aa8</u>	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03
<u>Cry3Aa9</u>	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001
<u>Cry3Aa10</u>	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886
<u>Cry3Aa11</u>	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2
<u>Cry3Aa12</u>	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis
<u>Cry3Ba1</u>	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F
<u>Cry3Ba2</u>	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208
<u>Cry3Bb1</u>	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961

Ek 1'in devamı

<u>Cry3Bb2</u>	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144
<u>Cry3Bb3</u>	I15475	Peferoen et al	1995	
<u>Cry3Ca1</u>	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki BtI109P
<u>Cry4Aa1</u>	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis
<u>Cry4Aa2</u>	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522
<u>Cry4Aa3</u>	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis
<u>Cry4A-like</u>	AAAY96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9
<u>Cry4Ba1</u>	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72
<u>Cry4Ba2</u>	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis
<u>Cry4Ba3</u>	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis
<u>Cry4Ba4</u>	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522
<u>Cry4Ba5</u>	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis
<u>Cry4Ba-like</u>	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9
<u>Cry4Ca1</u>	EU646202	Shu et al	2008	
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28
<u>Cry5Aa1</u>	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17
<u>Cry5Ab1</u>	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17
<u>Cry5Ac1</u>	I34543	Payne et al	1997	
<u>Cry5Ad1</u>	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366
<u>Cry5Ba1</u>	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3
<u>Cry5Ba2</u>	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518
<u>Cry6Aa1</u>	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1
<u>Cry6Aa2</u>	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518
<u>Cry6Aa3</u>	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418
<u>Cry6Ba1</u>	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1
<u>Cry7Aa1</u>	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245
<u>Cry7Ab1</u>	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511
<u>Cry7Ab2</u>	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867
<u>Cry7Ab3</u>	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9
<u>Cry7Ab4</u>	EU380678	Shu et al	2008	Bt
<u>Cry7Ab5</u>	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33
<u>Cry7Ab6</u>	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122
<u>Cry7Ab7</u>	FJ940776	Wang et al	2009	
<u>Cry7Ba1</u>	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis
<u>Cry7Ca1</u>	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13
<u>Cry7Da1</u>	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2
<u>Cry8Aa1</u>	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX
<u>Cry8Ba1</u>	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis
<u>Cry8Bb1</u>	CAD57542	Abad et al	2002	
<u>Cry8Bc1</u>	CAD57543	Abad et al	2002	
<u>Cry8Ca1</u>	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui
<u>Cry8Ca2</u>	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1
<u>Cry8Ca3</u>	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae
<u>Cry8Da2</u>	BD133574	Asano et al	2002	Bt
<u>Cry8Da3</u>	BD133575	Asano et al	2002	Bt

Ek 1'in devamı

<u>Cry8Db1</u>	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5
<u>Cry8Ea1</u>	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185
<u>Cry8Ea2</u>	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL
<u>Cry8Fa1</u>	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185
<u>Cry8Ga1</u>	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18
<u>Cry8Ga2</u>	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145
<u>Cry8Ga3</u>	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185
<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2
<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008	
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyae
<u>Cry8-like</u>	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis
<u>Cry8-like</u>	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt
<u>Cry9Aa1</u>	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae
<u>Cry9Aa2</u>	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517
<u>Cry9Aa3</u>	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001
<u>Cry9Aa like</u>	AAQ52376	Baum et al	2003	
<u>Cry9Ba1</u>	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae
<u>Cry9Bb1</u>	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis
<u>Cry9Ca1</u>	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi
<u>Cry9Ca2</u>	AAQ52375	Baum et al	2003	
<u>Cry9Da1</u>	BAA19948	Asano	1997	Bt japonensis N141
<u>Cry9Da2</u>	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis
<u>Cry9Da3</u>	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001
<u>Cry9Db1</u>	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019
<u>Cry9Ea1</u>	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10
<u>Cry9Ea2</u>	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16
<u>Cry9Ea3</u>	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA
<u>Cry9Ea4</u>	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4
<u>Cry9Ea5</u>	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts
<u>Cry9Ea6</u>	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11
<u>Cry9Ea7</u>	FJ380927	Sun et al	2008	
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001	
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001
<u>Cry9Ec1</u>	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae
<u>Cry9Ed1</u>	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019
<u>Cry9Ee1</u>	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001
<u>Cry9-like</u>	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae
<u>Cry10Aa1</u>	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis
<u>Cry10Aa2</u>	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A
<u>Cry10Aa3</u>	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis
<u>Cry10A-like</u>	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9
<u>Cry11Aa1</u>	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis
<u>Cry11Aa2</u>	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis
<u>Cry11Aa3</u>	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis

Ek 1'in devamı

<u>Cry11Aa-like</u>	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9
<u>Cry11Ba1</u>	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367
<u>Cry11Bb1</u>	AAC97162	Orduz et al	1998	Bt medellin
<u>Cry12Aa1</u>	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2
<u>Cry13Aa1</u>	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B
<u>Cry14Aa1</u>	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1
<u>Cry15Aa1</u>	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni
<u>Cry16Aa1</u>	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18
<u>Cry17Aa1</u>	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18
<u>Cry18Aa1</u>	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae
<u>Cry18Ba1</u>	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae
<u>Cry18Ca1</u>	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae
<u>Cry19Aa1</u>	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367
<u>Cry19Ba1</u>	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo
<u>Cry20Aa1</u>	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis
<u>Cry20Ba1</u>	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976
<u>Cry20-like</u>	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5
<u>Cry21Aa1</u>	I32932	Payne et al	1996	
<u>Cry21Aa2</u>	I66477	Feitelson	1997	
<u>Cry21Ba1</u>	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis
<u>Cry22Aa1</u>	I34547	Payne et al	1997	
<u>Cry22Aa2</u>	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt
<u>Cry22Aa3</u>	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4
<u>Cry22Ab1</u>	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140
<u>Cry22Ab2</u>	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt
<u>Cry22Ba1</u>	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt
<u>Cry23Aa1</u>	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt
<u>Cry24Aa1</u>	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan
<u>Cry24Ba1</u>	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto
<u>Cry24Ca1</u>	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41
<u>Cry25Aa1</u>	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan
<u>Cry26Aa1</u>	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166
<u>Cry27Aa1</u>	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo
<u>Cry28Aa1</u>	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161
<u>Cry28Aa2</u>	AAG00235	Moore and Debro	2000	Bt finitimus
<u>Cry29Aa1</u>	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin
<u>Cry30Aa1</u>	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin
<u>Cry30Ba1</u>	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus
<u>Cry30Ca1</u>	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto
<u>Cry30Ca2</u>	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367
<u>Cry30Da1</u>	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41
<u>Cry30Db1</u>	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14
<u>Cry30Ea1</u>	ACC95445	Fang et al	2007	Bt S2160-1
<u>Cry30Ea2</u>	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8
<u>Cry30Fa1</u>	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28
<u>Cry30Ga1</u>	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS18-1
<u>Cry31Aa1</u>	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11
<u>Cry31Aa2</u>	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15
<u>Cry31Aa3</u>	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195

Ek 1'in devamı

<u>Cry31Aa4</u>	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25
<u>Cry31Aa5</u>	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10
<u>Cry31Ab1</u>	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195
<u>Cry31Ab2</u>	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5
<u>Cry31Ac1</u>	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29
<u>Cry32Aa1</u>	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis
<u>Cry32Ba1</u>	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt
<u>Cry32Ca1</u>	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt
<u>Cry32Da1</u>	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt
<u>Cry33Aa1</u>	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota
<u>Cry34Aa1</u>	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3
<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2
<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3
<u>Cry35Ba3</u>	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2
<u>Cry36Aa1</u>	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt
<u>Cry37Aa1</u>	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt
<u>Cry38Aa1</u>	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt
<u>Cry39Aa1</u>	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai
<u>Cry40Aa1</u>	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai
<u>Cry40Ba1</u>	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14
<u>Cry40Ca1</u>	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41
<u>Cry40Da1</u>	ACF15199	Zhang et al	2008	Bt S2096-2
<u>Cry41Aa1</u>	BAD35157	Yamashita et al	2003	Bt A1462
<u>Cry41Ab1</u>	BAD35163	Yamashita et al	2003	Bt A1462
<u>Cry42Aa1</u>	BAD35166	Yamashita et al	2003	Bt A1462
<u>Cry43Aa1</u>	BAD15301	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
<u>Cry43Aa2</u>	BAD95474	Nozawa	2004	<i>P. popilliae</i> <i>popilliae</i>
<u>Cry43Ba1</u>	BAD15303	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
<u>Cry43-like</u>	BAD15305	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
<u>Cry44Aa</u>	BAD08532	Ito et al	2004	Bt entomocidus INA288

Ek 1'in devamı

<u>Cry45Aa</u>	BAD22577	Okumura et al	2004	Bt 89-T-34-22
<u>Cry46Aa</u>	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota
<u>Cry46Aa2</u>	BAG68906	Ishikawa et al	2008	Bt A1470
<u>Cry46Ab</u>	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt
<u>Cry47Aa</u>	AAV24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890
<u>Cry48Aa</u>	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59
<u>Cry48Aa2</u>	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B
<u>Cry48Aa3</u>	CAJ86546	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b
<u>Cry48Ab</u>	CAJ86548	Jones and Berry	2006	Bs LP1G
<u>Cry48Ab2</u>	CAJ86549	Jones and Berry	2006	Bs 2173
<u>Cry49Aa</u>	CAH56541	Jones and Berry	2005	Bs IAB59
<u>Cry49Aa2</u>	CAJ86541	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B
<u>Cry49Aa3</u>	CAJ86543	Jones and Berry	2006	BsNHA15b
<u>Cry49Aa4</u>	CAJ86544	Jones and Berry	2006	Bs 2173
<u>Cry49Ab1</u>	CAJ86542	Jones and Berry	2006	Bs LP1G
<u>Cry50Aa1</u>	BAE86999	Ohgushi et al	2006	Bt sotto
<u>Cry51Aa1</u>	ABI14444	Meng et al	2006	Bt F14-1
<u>Cry52Aa1</u>	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41
<u>Cry52Ba1</u>	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2
<u>Cry53Aa1</u>	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41
<u>Cry53Ab1</u>	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28
<u>Cry54Aa1</u>	ACA52194	Tan et al	2009	Bt MC28
<u>Cry55Aa1</u>	ABW88931	Guo et al	2008	YBT 1518
<u>Cry55Aa2</u>	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41
<u>Cry56Aa1</u>	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8
<u>Cry56Aa2</u>	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1
<u>Cry57Aa1</u>	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim
<u>Cry58Aa1</u>	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus
<u>Cry59Aa1</u>	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Artvin’de doğdu. İlk ve ortaokulu 1990-1995 yılları arasında Borçka Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda, liseyi 1998–2001 Artvin Yabancı Dil ağırlıklı Lisesi’nde tamamladı. 2002-2003 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2008 yılından beri Trabzon Ticaret ve Sanayi Odası’nda Proje Uzmanı olarak çalışmaya başladı.

ERYÜZLÜ, evli olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.