

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SERRATIA MARCESCENS* KİTİNAZ B VE C GENLERİNİN
EKSPRESYONU VE *GALLERIA MELLONELLA*'YA KARŞI İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARZU ÖZGEN

MAYIS 2011

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***SERRATIA MARCESCENS KİTİNAZ B VE C GENLERİNİN
EKSPRESYONU VE GALLERIA MELLONELLA'YA KARŞI İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ***

Biyolog Arzu ÖZGEN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15.04.2011
Tezin Savunma Tarihi : 17.05.2011**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Trabzon 2011

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Arzu ÖZGEN tarafından hazırlanan

***SERRATIA MARCESCENS KİTİNAZ B VE C GENLERİNİN*
EKSPRESYONU VE *GALLERIA MELLONELLA*'YA KARŞI İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 19 / 04 / 2011 gün ve 1401 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17 / 05 / 2011 tarihinde yapılan sınavda**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU

Üye : Doç. Dr. Kazım SEZEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Serratia marcescens* kitinaz B ve C genlerinin ekspresyonu ve *Galleria mellonella*’ya karşı insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benden esirgemeyen ve tüm imkanları sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tezin incelenmesi ve gerekli düzeltmelerin yapılması konusunda büyük ilgi gösteren Doç. Dr. Kazım SEZEN’e ve tez jüri üyeliğini kabul ederek tezimi inceleyen Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK’a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, Dr. Hacer MURATOĞLU’na, tez süresi boyunca laboratuar imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Biyoloji Bölüm başkanı Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Emine ÖZŞAHİN’e, Mehtap DANIŞMAZOĞLU’na, Cihan GÖKÇE’ye, Zeynep ERBAŞ’a, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarları çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana her zaman destek olan özellikle de çalışmam boyunca bu desteği esirgemeyen eşim Yakup ÖZGEN’e, kızlarım Kerime Hatun ve Ayşe Özgenay ÖZGEN’e sonsuz sevgilerimi sunuyorum.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesinde maddi destek sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu’na teşekkür ediyorum.

Arzu ÖZGEN

Trabzon 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Serratia marcescens* kitinaz B ve C genlerinin ekspresyonu ve *Galleria mellonella*'ya karşı insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 08/06/2011

Arzu ÖZGEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Kitin.....	1
1.2. Kitinazlar.....	4
1.3. Biyolojik Kontrol ve Kitinazlar.....	7
1.4. <i>Serratia marcescens</i> ve Kitinazlar.....	8
1.5. <i>Serratia marcescens</i> 'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması.....	10
1.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> ve Cry Toksinleri.....	11
1.7. Kitinaz ve Cry Toksinlerinin Bir Biyokontrol Ajanı Olarak Birlikte Kullanılmaları.....	14
1.8. Çalışmanın Amacı.....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	16
2.1. Bakteriyal Kültürler ve Büyüme Şartları.....	16
2.2. DNA İzolasyonu.....	16
2.3. Primerlerin Dizayn Edilmeleri.....	17
2.3.1 <i>Kitinaz</i> Genlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	17
2.4. <i>Kitinaz</i> Genlerinin Klonlama Vektörüne Klonlanmaları.....	18
2.5. <i>Kitinaz</i> Genlerinin Dizi Analizi.....	20
2.6. <i>Kitinaz</i> Genlerinin pHY300PLK Shuttle Vektöre Klonlanması.....	20

2.7.	Plazmit Stabilite Testi.....	25
2.8.	Rekombinant <i>Bacillus thuringiensis</i> Hücrelerinin İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.	BULGULAR	26
3.1.	<i>Kitinaz</i> Genlerinin PCR ile Belirlenmesi.....	26
3.2.	<i>chiB</i> ve <i>chiC</i> Genlerinin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi	27
3.3.	<i>Kitinaz</i> Genlerinin Nükleotid Sıralarının Karşılaştırılması	28
3.4.	<i>Kitinaz</i> Genlerinin pHY300PLK Shuttle Vektörüne Klonlanması.....	28
3.5.	Plazmit Stabilite Testi.....	36
3.6.	Rekombinant <i>Bacillus thuringiensis</i> Hücrelerinin İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
4.	TARTIŞMA	45
5.	SONUÇLAR	49
6.	ÖNERİLER	50
7.	KAYNAKLAR	51
8.	EKLER	60
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

SERRATIA MARCESCENS KİTİNAZ B VE C GENLERİNİN
EKSPRESYONU VE *GALLERIA MELLONELLA* 'YA KARŞI İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Arzu ÖZGEN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU
2011, 63 Sayfa, Ek 3 Sayfa

Böceklerde kutikula ve bağırsağı çevreleyen peritrofik membranın yapısında önemli miktarda kitin bulunmaktadır. Kutikula ve peritrofik membranın yapısında bulunan kitinin kitinaz enzimleri tarafından parçalanması, böceğin beslenmesini ve korunmasını düşürmekte ve böylece böceği zayıf duruma getirmektedir. Bu nedenle kitinaz enzimleri, zararlı böceklere karşı biyolojik mücadele materyali olarak kullanılma potansiyeline sahip önemli enzimlerdir.

Bu çalışmada, *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş *Serratia marcescens* bakterisi kullanıldı. Bu bakteriden *kitinaz B* ve *C* enzimlerini kodlayan genler (*chiB* ve *chiC*) dejenerat primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan genlerin nükleotid dizilimini belirlemek için PCR ürünleri dizin analizine gönderildi. Dizin analizi yapılan *chiB* ve *chiC* genlerinin DNA sıraları literatürdeki mevcut *kitinaz* genlerinin DNA sıraları ile karşılaştırıldı.

Analiz sonuçları, bu çalışmada kullanılan *S. marcescens* bakterisine ait *chiB* geninin literatürde ki, *S. marcescens* (BJL200) *chiB* genine %96 oranında ve *chiC* geninin de, literatürde ki *S. marcescens chiC* (AJ630582.1) genine %96 oranında benzer olduğunu gösterdi. Dizin analizi yapılan bu *kitinaz* genleri pHY300PLK shuttle vektörüne klonlandı

ve elde edilen rekombinant plazmitler çeşitli *B. thuringiensis* suşlarına ve *E. coli* DH10β'ya elektroporasyonla aktarıldı.

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis* suşlarına ve *E. coli* DH10β hücrelerine plazmit stabilite testi uygulandı. Test sonucuna göre konak hücrelerin rekombinant plazmiti muhafaza edemedikleri tespit edildi.

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis* suşlarının *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi araştırıldı. Sonuç olarak, rekombinant plazmit taşıyan *B. thuringiensis* suşlarının, plazmit taşımayan suşlara ve kitinaz kaynağımız olan *S. marcescens* bakterisine göre daha yüksek bir insektisidal aktivite gösterdikleri tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Kitinaz, *Serratia marcescens*, İsektisidal aktivite

Master Thesis

SUMMARY

EXPRESSION OF *CHITINASE B* AND *C* GENES OF *SERRATIA MARCESCENS* AND
DETERMINING THEIR INSECTICIDAL ACTIVITIES AGAINST
GALLERIA MELLONELLA

Arzu ÖZGEN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Remziye NALÇACIOĞLU
2011, 63 Pages, Appendix 3 Pages

There are significant amount of chitin in the structure of peritrophic membrane which surround cuticle and gut in insects. Degradation of the chitin, found in the structure of cuticle and peritrophic membrane by the chitinase enzymes, decreases the feeding and the defence of the insect and thus makes the insect weak. Therefore chitinases are important enzymes which have potential as being use biological control agent against harmful insects.

In this study, the genes encoding *chitinase B* (*chiB*) and *chitinase C* (*chiC*) from *Serratiamarcescens* that isolated from *Xyleborusdispar*, amplified with degenerate primers by PCR. For identifying the nucleotide sequence of the amplified genes, PCR products were sequenced. Nucleotide sequences of *chiB* and *chiC* genes were determined and compared with other *chiB* and *chiC* genes.

Analysis results showed that *chiB* and *chiC* genes belong to *S. marcescens* have 96% homology with *S. marcescens* (BJL200) *chiB* gene for *chitinaseB* and 96% homology with *S. marcescens chiC* (AJ630582.1) for *chitinaseC*. Chitinase genes from *S. marcescens* were cloned into the pHY300PLK shuttle vector and these recombinant plasmids were introduced into *E. coli* DH10 β and various strains of *Bt* by electroporation.

Plasmid stability test was performed to the *B. thuringiensis* strains and *E. coli* DH10 β cells including recombinant strains. According to the test results it is determined that host cells could not save the recombinant plasmids.

Insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains containing recombinant plasmids were tested on *G. mellonella* larvae. As a result *Bt* strains harboring recombinant plasmids showed higher insecticidal activity than parental *Bt* strains and *S. marcescens*.

KeyWords: *Bacillus thuringiensis*, Chitinase, *Serratia marcescens*, Insecticidal activity

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kitinin moleküler yapısı	1
Şekil 2. Grup 18'e ait bakteriyel kitinazların birbirleriyle ilişkileri.	6
Şekil 3. <i>Bacillus thuringiensis</i> ve konağı arasındaki ilişkiler	13
Şekil 4. PCR ile çoğaltılmış <i>kitinaz B</i> geninin agaroz jel görüntüsü	26
Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış <i>kitinaz C</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	27
Şekil 6. <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimi ile kesilen <i>chiB</i> ve pHY300PLK shuttle vektörünün %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	28
Şekil 7. <i>HindIII</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pHY300PLK shuttle vektörü ve <i>chiC</i> 'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	29
Şekil 8. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 4Q7 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü ..	30
Şekil 9. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis kurstaki</i> 4D1 hücrelerine yapılan koloni PCR ile <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	30
Şekil 10. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 5724 hücrelerine yapılan koloni PCR ile <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü	31
Şekil 11. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 4Q7 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> geninin agaroz jel görüntüsü ..	31
Şekil 12. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis kurstaki</i> 4D1 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> geninin agaroz jel görüntüsü ..	32
Şekil 13. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 5724 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> genini agaroz jel görüntüsü..	32
Şekil 14. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 4Q7 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 15. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. kurstaki</i> 4D1 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü	34
Şekil 16. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 5724 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiB</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 17. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 4Q7 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> geninin agaroz jel görüntüsü.....	35

Şekil 18. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis kurstaki</i> 4D1 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> geninin agaroz jel görüntüsü....	35
Şekil 19. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren <i>B. thuringiensis israelensis</i> 5724 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan <i>chiC</i> genini agaroz jel görüntüsü...	36
Şekil 20. Xd1, 4Q7, Btk ve <i>chi B</i> geninin aktarıldığı 4Q7B ve BtkB'nin insektisidal aktivitesi	38
Şekil 21. Xd1, 4Q7, Bti ve <i>chi B</i> geninin aktarıldığı 4Q7B ve BtiB'nin insektisidal aktivitesi.	39
Şekil 22. Xd1, 4Q7, Btk ve <i>chi C</i> geninin aktarıldığı 4Q7C ve BtkC'nin insektisidal aktivitesi	40
Şekil 23. Xd1, 4Q7, Bti ve <i>chi C</i> geninin aktarıldığı 4Q7C ve BtiC'nin insektisidal aktivitesi	41
Şekil 24. <i>Kitinaz B</i> ve <i>C</i> geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi	42
Şekil 25. <i>Kitinaz B</i> ve <i>C</i> geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi.	43
Şekil 26. <i>Kitinaz B</i> ve <i>C</i> geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan farklı bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi.....	44

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Farklı organizmalarda bulunan kitin oranları.....	2
Tablo 2.	Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları.....	3
Tablo 3.	Farklı organizmaların kitinaz üretme amaçları	5
Tablo 4.	<i>S. marcescens</i> 'deki kitinazlar ve kitin bağlanma proteini.....	10
Tablo 5.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin kristal protein içeriklerine göre sınıflandırılması ..	12
Tablo 6.	<i>S. marcescens</i> kitinaz genlerine ait 5' yukarı ve 3' aşağı bölgelerini içeren dejenerat primer dizileri	17
Tablo 7.	Plazmit stabilite testi	37

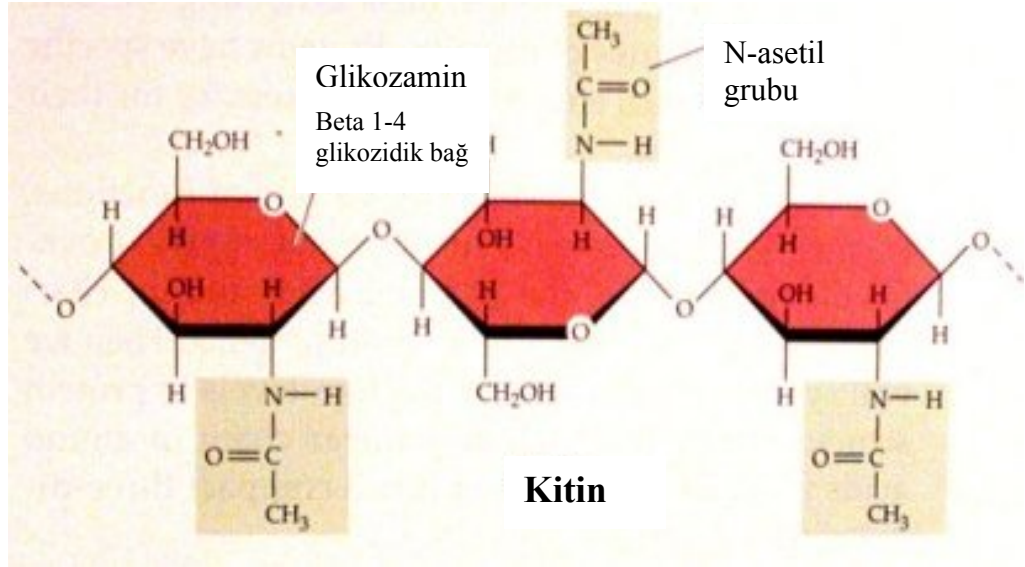
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
Bt	: <i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	: <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
Btk	: <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
CBP21	: Kitin bağlanma proteini
chi	: Kitinaz
cry	: Kristal
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit
kb	: Kilo baz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
VIP	: Vejetatif İnsektisidal Protein
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galaktopiranosid

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kitin

Kitin N-asetilglukozamin rezidülerinin β -1-4 bağlanması sonucu oluşan selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan biyopolimerdir. Kitin yapısında selülozdan farklı olarak hidroksil (-OH) grubu yerine asetamid (NHCOCH₃) grubu içerir. Kitin doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır ve yengeç, karides kabuklarının, böceklerin dış iskeletinin ve fungusların hücre duvarının en önemli bileşenidir (Kurita, 2001). Kitinin yapısı Şekil 1.'de görülmektedir.



Şekil 1. Kitinin moleküler yapısı (URL-1).

Kitin, böceklerde kutikulanın ve çoğu böceğin bağırsağını koruyan peritrofik membranın ana bileşenidir. Bağırsağı enfekte eden patojenlerin öncelikle bu kitince zengin bariyeri geçmeleri gerekmektedir (Shen ve Jacobs-Lorena, 1997; Sampson ve Gooday, 1998; Hoell vd., 2005). Kitini disakkaritlere veya daha büyük oligosakkaritlere parçalamak kitinaz enzimi vasıtasıyla ekstrasellüler olarak yapılmaktadır (Sitrit vd., 1995).

Kitinin dikkat çekici özelliklerinin bir arada toplanması onu çok yönlü kullanıma uygun hale getirmiştir. Kitin toksik etki göstermeyen, alerjik olmayan, antimikrobiyal ve degrede olabilen bir polimer olma özelliğine sahiptir. Güçlü pozitif yüklerinin bulunması, protein gibi makromoleküllere, deriye ve metal içeren negatif yüklü yüzeylere bağlanmasını sağlar. Tablo

1, farklı organizmalardaki kitin oranını göstermektedir.

Tablo 1. Farklı organizmalarda bulunan kitin oranları.

Organizma	Oran (%)
Mantar	5-20
Solucan	20-38
Ahtapot	3-20
Örümcek	38
Hamamböceği	35
İpekböceği	44
Yabani yengeç	69
Yenebilen yengeç	70
Akrep	30
Su böceği	37

Son on yıl boyunca selüloz ve kitin gibi çözünmeyen polimerlerin enzim ve degradasyon mekanizmaları üzerindeki çalışmalar büyük gelişme göstermiştir. Bu yeni bilgi doğadaki büyük miktardaki polimerin dönüşümünün nasıl olduğunu anlamada yardımcı olmaktadır (Brurberg vd., 2000).

Her yıl biyosferde 10 gigaton civarında kitin sentezlenip degrade olmaktadır. Kitin ve ürünlerinin en önemli özelliklerinden biri de yanma sonucu oluşan hastalıkları tedavi etmede kullanılmalarıdır. Kitin canlı dokularla çok iyi uyum sağlamaktadır ve böylece yaraları iyileştirme özelliği çok fazla gözlenmektedir. Kitosan, kitinin enzimatik deasetilasyonu tarafından oluşturulan bir polimerdir (da Silva Amorim vd., 2001). Kitosan çok etkili bir emici olduğu için kullanım alanları genelde bu amaca yöneliktir. Endüstriyel atık sularda bulunabilen ve çöktürülerek uzaklaştırılması zahmetli olan Cr^{+6} gibi ağır metallerin kitosanla emilerek uzaklaştırılması mümkündür. Ayrıca toksik olmaması ve biyoaktif özelliklerinin de bulunmasından dolayı kitosan, ilaç sanayi ve medikal uygulamalarda da sıkça kullanılmaktadır (URL-3). Tablo 2’de kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları gösterilmiştir (Demir ve Seventekin, 2009).

Tablo 2. Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları (Demir ve Seventekin, 2009).

Uygulama Alanı	Spesifik Kullanımları
Su arıtımı	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon Atık sudaki metal iyonlarının uzaklaştırılması ve geri kazanımı
Ziraat	Bitki katkı maddesi Antimikrobiyal madde Bitki tohumu kaplaması Gübre yapımı İnsektisid ve nematositlerde
Biyoteknoloji	Kromatografik yöntemler Enzim immobilizasyonu
Gıda	Doğal kıvamlaştırıcı Hayvan yemlerini de içeren yiyecek katkı maddesi Yiyecek işleme (örn. şeker işleme) Filtreleme ve temizleme Hipokolestrolemik madde Atık yiyeceklerin tekrar işlenmesi
Kozmetik	Saç şekillendirici yapımı Nemlendirici kremlerde Antikolestrol ve yağ bağlayıcı olarak zayıflama maddesi
Medikal Alan	Deodorantlarda koku giderici madde Hayvan ve insanlar için yara bandı yapımında Yara ve yanık tedavisinde Kanı pıhtılaştırıcı madde Hidrojel yapımı Antikoagülant ve antitrombojenik madde Hemostatik madde Kontakt lens yapımı İlaç salımı

1.2. Kitinazlar

Kitinazlar, kitinin hidrolitik degradasyonunu katalizleyen glikozil hidrolazlardır (Kurita, 2001). Son yıllarda kitinazlar, geniş bir uygulama alanına sahip olduklarından dolayı artan bir önem kazanmışlardır. Kitinazların pratikteki uygulamaları funguslardan protoplast hazırlanmasında (Yabuki vd., 1984), bitki patojeni olan funguslara karşı koruyucu bir ajan olarak (Sundheim vd., 1988; Sakuda vd., 1990) ve oligosakkaritlerin üretiminde kullanılmalarını içerir (Usui vd., 1990). Kitinin enzimatik hidrolizi ile üretilen kitooligomerler; antibakteriyel, antifungal, hipokolesterolmik ve antihipertansif aktiviteye sahiptir (Boller vd., 1986; Gooday vd., 1986; Ordentlich vd., 1988).

Kitin hidrolizlenmesi iki tip enzim tarafından gerçekleşmektedir. İlki büyük enzim olan kitinazlardır [poly- β -1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolases, EC 3.2.1.14]. Kitinazların, *N*-asetilglukozaminin multimerlerini oluşturan endokitinazlar ve polimerin indirgenmemiş ucundan başlayan, düşük moleküler ağırlığa sahip, çözünebilir dimerlerin sürekli salınmasını katalizleyen ekzokitinazlar olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. İkinci tip enzim ise kitobiozu *N*-asetilglukozamin monomerine hidrolizleyen kitobiazlardır (Roberts ve Selitrennikoff, 1988; Botha vd., 1998; Souza vd., 2003; Ruiz-Sanchez vd., 2005; Suginta vd., 2005).

Kitin içeren tüm organizmalardaki kitinaz enzimi hücre duvarının ve dış iskeletin morfogenezi için gerekmektedir. Kitin içermeyen diğer organizmalar ise yiyeceklerdeki polimerleri degrades ederek kitinaz üretebilmektedirler (Roberts ve Selitrennikoff, 1988).

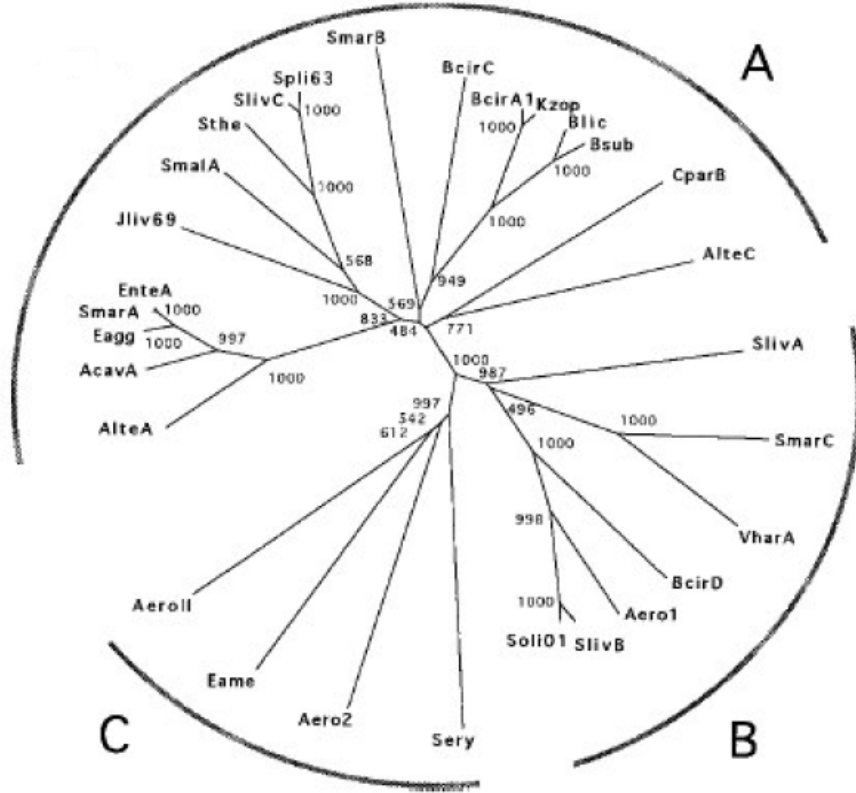
Bitkiler, kitinazı fungal patojenlere karşı kendilerini korumak için üretirler (Wen vd., 2002). Kitinaz, fungal patojenlerin misellerini parçalar. *kitinaz* geninin bitkilere transferi ile elde edilen transgenik bitkiler fungusid ve insektisid özellikler kazanmakta ve böyle transgenik bitkiler kendileri için patojen funguslarla ve böceklerle savaşabilmektedir. Doğal olarak genotipinde *kitinaz* geni bulunduran bazı bitkiler bilinmektedir. Örn; akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe ağaçlarının sağlıklı gövde ve kök dokularında β -1,3-glukanaz ve kitinaz varlığı tespit edilmiş ve bu enzimlerin bu ağaçlarda patojen olan *Armillaria mellea*'nin hif çepelerinin erimesine sebep olduğu bildirilmiştir (Muzzarelli, 1977). Tablo 3'de farklı organizmaların farklı amaçlar için kitinaz ürettikleri belirtilmiştir.

Tablo 3. Farklı organizmaların kitinaz üretme amaçları (Bhattacharya vd., 2007).

Organizma	Kitinaz üretme amacı
Bitkiler	Patojenik organizmalara karşı savunmada rol oynamak için üretilirler
Artropodlar	Metamorfoz sırasında kutikulanın dönüşümünde görev almaktadır
Mantarlar	Organik maddelerin degrades edilmesi ve taşınması için üretilirler
Omurgalılar	Tam olarak görevi bilinmemekle beraber fungal enfeksiyonlara karşı direnç oluşturmak için üretildiği düşünülmektedir.
Bakteriler	Kitini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma

Farklı organizmalarda bulunan kitinazların amino asit benzerliklerine bakıldığında beş grup kitinaz mevcuttur. Bu gruplar glikozil hidrolizlenmesine göre grup 18 ve grup 19 olmak üzere iki grup altında toplanırlar. I, II ve IV grubunda olanlar bitki kökenlidir ve grup 19'a aittirler. Grup III' de olanlar bitki ve mantar kökenlidir ve bakteriyal kitinazları içeren grup V ile birlikte grup 18'i oluşturmaktadırlar. Grup 18 ise yapı olarak grup 19 ile bağlantılı değildir.

Bakteriler, kitinazı besin ihtiyaçlarını karşılamak için üretmektedirler. Büyük ihtimalle, bakteriler, doğadaki kitin çeşitliliğini (Şekil 2) hidrolize etmek için çok çeşitte kitinaz üretirler (Cohen-Kupiec ve Chet, 1998).



Şekil 2. Grup 18'e ait bakteriyel kitinazların birbirleriyle ilişkileri. SmarA: *Serratia marcescens* 2170 kitinaz, EnteA: *Enterobacter* sp. G-1 kitinaz, Eagg: *Enterobacter agglomerans* kitinaz (Chia-Entag), Acava: *Aeromonas caviae* kitinaz, AlteA: *Alteromonas* sp. O-7 kitinaz A (Suzuki vd., 1999).

Grup 18'e ait endokitinazın aktif bölgesinin 3 boyutlu yapısına bakıldığında, uzun ve geniş bir substrat bağlanma bölgesi olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, ekzokitinazın aktif bölgesine bakıldığında, tünele benzer bir morfolojiye sahiptir (Suginta vd., 2004). Grup 18'in katalitik domaini TIM-barrel ($(\beta\alpha)_8$ barrel) katlanmasına sahiptir. TIM barrel de bulunan dört tane β sarmal karakteristik DXDXE motifini içermektedir. Bu motif, oksijeni glikosidik bağlara taşıyan glutamate rezidüsü içermektedir. Katalitik domaine ek olarak bu enzim, küçük kitin bağlanma domaini de içermektedir (Vaaje-Kolstad vd., 2004).

Kitinin kitinaz tarafından hidrolizlenmesi, degradasyon sürecinde bakteri tarafından yapılan en kritik aşamadır. Buna rağmen, kitinin bakteri tarafından degrades edilmesi tam olarak aydınlanamamıştır. Bu süreç birçok aşamadan oluşmaktadır.

1.3. Biyolojik Kontrol ve Kitinazlar

Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için canlı organizmalardan yararlanmak suretiyle yapılan mücadele olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele, doğal dengenin tesisine yardımcı olması, ileriye dönük uzun vadede bile olsa kesin sonuçların alınması, istenilen hedefe varılması bakımından en çok uygulanması gereken bir mücadele şeklidir. Biyolojik kontrolde kullanılan ajanların birçoğu doğadaki hastalıklı böceklerden izole edilir. Böceklerde hastalıklara neden olan mikroorganizmalar özelleşmiş doğal düşmanlar olarak kabul edilir (Burges, 1971). Bu mikroorganizmalar bakteri, mantar, virüs, nematod ve protozoa olarak gruplandırılır (Poinar, 1978). Bunlar arasında bakteriler (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus popillia*, *Serratia marcescens*) (Bobrovski vd., 2002) ve virüsler (Baculovirusler, Entomopoxvirusler ve Iridovirüsler) en çok istikbal vaat eden biyolojik kontrol ajanlarıdır (Bonning vd.,1996; Demirbağ vd., 1998; Feng vd., 2001).

Biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler çeşitli toksin proteinler, kitinazlar, fosfolipazlar, proteazlar, vejetatif insektisidal proteinler (VIP) ve antifungal bileşikler oluştururlar (Schnepf vd., 1998). Bu bileşiklerin başında Bt suşlarının ürettiği kristaller proteinler (cry toksinleri) ve çeşitli bakterilerin ürettiği kitinazlar gelmektedir. Kitinazın böcek bağırsağındaki kitin içeren peritrofik membranlarda delik oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Böylece *Bt.* insektisidal toksininin orta bağırsak membranına ulaşmasını artırmasının yanı sıra membran lizisine sebep olmakta ve böceğin ölümüne yol açmaktadır. Bu çalışma kitinazın böcek bağırsağındaki peritrofik membranı yok ederek patojeniteyi artırmadaki başarısını açıkça göstermektedir.

Böceklerde kutikula ve bağırsağı çevreleyen peritrofik membranın yapısında önemli miktarda kitin bulunmaktadır (Shen vd., 1997; Sampson vd., 1998; Hoell vd., 2005). Kutikula ve peritrofik membranın yapısında bulunan kitinin kitinaz enzimleri tarafından parçalanması, böceğin beslenmesini ve korunmasını düşürmekte ve böylece böceğin zayıf duruma gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kitinaz enzimleri, zararlı böceklere karşı biyolojik mücadelede etkili bir şekilde kullanılma potansiyeline sahip biyolojik kontrol ajanlarıdır.

Bakteriler tarafından üretilen kitinazın bakterideki rolü, kitini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma amacına yöneliktir (Roberts vd., 1988; Leah vd., 1995). Bakteriler arasında *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*) *Serratia*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Chitinophaga*,

Cytophaga ve *Lasobacter* türleri potansiyel kitinaz üreticileridirler (Thamthiankul vd., 2001; Okay, 2005; Kuzu, 2008)

Bakteriyal kitinazlar ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Bunlar arasında biyokimyasal özellikleri, bunları kodlayan genler, katalitik mekanizmaları ve üç boyutlu yapılarının aydınlatılması sayılabilir (Watanabe vd. 1997). Bakterilerden çok sayıda kitinaz genleri klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ekspres edilmiştir (Sitrit vd., 1995; Lonhienne vd., 2001). *B. thuringiensis*'in böcekler üzerindeki toksisitesi kitinaz kodlayan gen tarafından artırıldığı belirlenmiştir (Rojas-Avelizapa vd., 1999).

Fungal hücre duvarının yapısında bulunan kitini parçalayabilme özelliğine sahip kitinazların çoğu tek bir gen tarafından kodlanırlar. Bu nedenle bu genleri alıp bitki büyümesini teşvik eden bakterilere aktarma nispeten avantajlı bir işlemdir. Bu türden yapılmış bir çalışmada *Serratia*'dan kitinaz geni alınıp bitkilerle ortak yaşam süren *Trichoderma harzianum* ve *Rhizobium meliloti* hücrelerine aktarılmıştır. Transform olmuş bu suşlar kitinaz üreterek antifungal aktivite göstermişlerdir (Chet ve Inbar, 1994). Yine bir diğer çalışmada *Pseudomonas fluorescens*'e aktarılan kitinaz geni aktif kitinaz sentezleyebilmiş ve bitki patojeni *Rhizoctonia Solani* yi etkili bir şekilde inhibe edebilmiştir (Koby vd., 1994).

Yer fıstığı yaprak küfüne (*Phaeoisariopsis personata*) karşı antifungal ve kitinolitik özellikte iki bakteri *Bacillus circulans* GRS 243 ve *Serratia marcescens* GPS 5, yer fıstığı ile assosiyе olmuş 393 bakteri arasından seçilmiş ve yer fıstığı yaprak küfüne karşı biyokontrol ajanı olarak yaprak yüzeyine sprey ile uygulanmıştır. Kitin ile desteklenmiş *B. circulans* GRS 243 ve *S. marcescens* GPS 5 uygulamaları bu hastalığı büyük oranda kontrol altına alabilmiştir (Krishna, 2005).

Fusarium oxysporum yüzden fazla bitkide patojeniteye sebep olan çok tehlikeli tarım zararlısı bir mantardır. 1997 yılında yapılan bir çalışmada *Enterobacter agglomerans*'tan izole edilen kitinaz geni *E. coli*'ye aktarılmış ve daha sonra elde edilen rekombinant proteinin *F. oxysporum* spor germinasyonunu durdurduğu belirlenmiştir (Chernin vd., 1997).

1.4. *Serratia marcescens* ve Kitinazlar

Gram negatif, fakültatif anaerob, hareketli ve yuvarlak şekilde olan *Serratia* 0,5–0,8 x 1,0-5,0 µm boyutlarındadır. Karakteristik olarak kırmızı pigment üretmekte ve mukusumsu koloniler oluşturmaktadır. Doğal olarak böceklerin bulunduğu toprak ve sularda bulunmaktadır. Patojenitesi daha çok hastane ile ilgili hastalıklarda görülmektedir. Örneğin;

solunum ve boşaltım sistemi ile ilgili rahatsızlıklarda, endokard iltihabında, kemik iliği iltihabında, septisemia enfeksiyonlarında, göz enfeksiyonları ve menenjitte görülebilir. Bulaşması ise direkt olarak temas ile olabileceği gibi vücut sıvılarıyla da olabilmektedir. Tedavisi çeşitli antibiyotiklerle yapılabilmektedir. Fakat plazmitlerinde bulunan R-faktörler sayesinde de çoğu antibiyotiğe dirençlilik gösterirler (URL-2).

Enterobacteriaceae familyasına ait olan *Serratia* cinsi 13 tür içermektedir. Bu türler arasında en çok çalışılan ise *S. marcescens*'tir. *Serratia*, yaygın bir şekilde kırmızı pigment üreten organizma olarak anılmaktadır. Yıllarca, *S. marcescens*, kırmızı pigment ürettiğinden diğer enterik bakterilerden ayrılmıştır ve bu familyaya ait tek tür olarak bilinmekteydi. Buna rağmen birçok *Serratia* türünün pigment üretmediği veya çok çeşitli pigmentasyona sahip olduğu bilinmektedir. *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinslerine birçok benzerliği bulunmasına rağmen pek çok *Serratia* çoğu zaman yanlış tanımlanmaktadır. 1972'den beri diğer gruplar ve kültürlerle yapılan DNA homolojisi ve farklı biyokimyasal karşılaştırma çalışmaları sayesinde cins düzeyinde birçok tür elde edilmiştir. *S. marcescens* dışında diğer iyi bilinen türler ise; *S. odorifera*, *S. liquifaciens*, *S. rubidaea*, *S. ficaria*, *S. pymuthica* ve *S. fonticola*'dır. Fakat kitinaz üretimi en çok *S. marcescens* tarafından yapılmaktadır.

S. marcescens, aşağıda belirtilen sebeplerden dolayı ilgili çalışmalarda kitinaz kaynağı olarak seçilmiştir: (i) *S. marcescens*'den elde edilen kaba kitinaz örnekleri ticari amaç için uygundur, (ii) *S. marcescens*'den elde edilen kitinaz için saflaştırma yöntemlerinden biri olan affinite kromatografisinin çok etkili olduğu rapor edilmiştir, (iii) kitinaz tarafından kodlanan gen veya genler ve tanımlanan düzenleyici sinyaller sayesinde direkt olarak *E. coli*'de ekspres edilebilmektedir, (iv) *S. marcescens*'den elde edilen kitinaz endolitik bir enzim olduğu için ekzolitik enzimlere göre kitini daha kolay çözebilmektedir, (v) *S. marcescens*'den elde edilen kitinaz "kristal" haldeki kitini bile hidrolize edebilmektedir (Fuchs vd., 1986).

S. marcescens, kitini degrades etmede en etkili bakterilerden biridir (Brurberg vd., 1994; 1995; 1996; Watanabe vd., 1997; Nawani ve Kpandis, 2001; Suzuki vd., 2001; Uchiyama vd., 2003; Ruiz-Sanchez vd., 2005; Vaaje-Kolstad vd., 2005). Bu bakteri kitin varlığında kültüre edildiği zaman, çeşitli kitinolitik enzimler ve kitin bağlanma proteini belirlenebilir. Yapılan çalışmalarda açık şekilde *S. marcescens*'in üç çeşit kitinaz (Kitinaz A, Kitinaz B ve Kitinaz C), bir adet kitobiaz ve görevi tam olarak belirlenemeyen bir kitin bağlanma proteini (CBP21) ürettiği görülmektedir. Bu beş protein mantığa uygun gelmekte fakat tam olarak kesinleştirilememiş bulunmaktadır. Bu proteinler bir bakterinin komple kitinolitik mekanizmasını göstermektedir (Tablo 4) (Brurberg vd., 2000; Suzuki vd., 2001).

Tablo 4. *S. marcescens*'deki kitinazlar ve kitin bağlanma proteini (Brurberg vd., 2000).

SDS-PAGE band (kDa)	Gen (protein)	<i>S.marcescens</i> 'deki konumu	N-terminal sinyal peptid
57-58	<i>kitinaz A</i> (ChiA)	Ekstraselüler	Evet
52-54	<i>kitinaz B</i> (ChiB)	Periplazma/ekstraselüler	Hayır
48-52	<i>kitinaz C</i> (ChiC1)	Ekstraselüler	Hayır
35-36	<i>kitinaz C</i> (ChiC2)	Ekstraselüler	Hayır
95	<i>Kitobiaz</i>	Periplazma	Evet
21-22	Kitin bağlanma proteini (CBP21)	Ekstraselüler	Evet

S. marcescens'de bulunan *kitinaz* genlerinin organizasyonları tam olarak bilinmemektedir. Hibridizasyon çalışmalarına bakıldığında *chiA* ve *chiB* genlerinin yakın olarak bağlanma yapmadıkları görülür. *chiB* ve kitin bağlanma proteini 21 (CBP21)'i kodlayan genler yakın bağlantı kurabilmektedirler; fakat DNA sıralarına bakıldığında bu iki genin transkripsiyonu ikili bir bağlantı kurmamaktadır (Brurberg vd., 2000).

Streptomyces coelicolor'da bulunan sekiz tane *kitinaz* geni kromozom üzerinde dağınık halde bulunmaktadır (Brurberg vd., 2000). Kitin bağlanma proteini 21 (CBP21) kitine bağlanmakta, fakat hidroliz aktivitesi gösterememektedir. Bu protein sadece kitinazın üretilbildiği şartlar altında üretilmektedir (Suzuki vd., 2001).

Bu kitinazlar arasında doğada en çok bulunanı *chiA*'dır. *chiA* diğer kitinazlardan sinyal peptidinin olmasıyla ayrılır. Protein periplazmaya ulaştığı zaman periplazmik sinyal peptidaz tarafından salınan N-terminal sinyal peptide sahiptir (Brurberg vd., 2000). En az rastlananı da *chiC*'dir. *chiC* ise iki alt gruba ayrılır. Bunların arasındaki fark ise *chiC1* iki katalitik domain içerirken *chiC2*'nin bir adet katalitik domain içermesidir.

1.5. *Serratia marcescens*'in Biyolojik Kontrol Ajanı Olarak Kullanılması

Kitinazların biyoteknolojik kullanımdaki en sık uygulanan alanı bitkisel patojenlere karşıdır. *S. marcescens* kültürlerindeki kitinazlar yaygın olarak biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (Brurberg vd., 2000). Bu bakteri potansiyel böcek patojeni olarak kullanılmaktadır. Kitinaz ise bu bakterinin virülansında proteaz ve lektinaz ile birlikte çok önemli rol oynamaktadır (Uchiyama vd., 2003). Someya (2005), *S. marcescens* B2 suşunun *Rhizoctonia solani* AG-1 IA patojenine karşı misel büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Inglis ve Lawrence (2001)'in yaptığı bir çalışmada laboratuvar ortamında *Heliothis virescens*'in F1 jenerasyonuna karşı *S. marcescens* etkisine bakılmıştır. Bunun sonucunda

yumurta sayısında ve yumurtadan çıkan larva sayısında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Lysyk (2002), *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) erginlerinin *S. marcescens* ile ölümlerinin sağlandığını gözlemlemiştir. Inglis (2000), doğal şartlar altında *S. marcescens*'in güneybatı mısır zararlısına karşı patojenik etkilerinin olduğunu tespit etmiştir. Yüksek kitinolitik aktiviteye sahip olan *S. marcescens in vitro* şartlarda *Botrytis* spp.'nin büyümesini baskılamaktadır. Sera alanında yapılan deneylerde ise *S. marcescens*'in siklamenin patojeni olan *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium oxysporum*'un kontrollerinde kullanılabileceği gösterilmiştir. *Serratia marcescens*'de bulunan *chiA* ve *chiB* genleri *Pseudomonas fluorescens* ve *E.coli* gibi diğer bakteriyel türlere aktarılarak biyokontrol ajanı olarak etkilerinin artırılma kabiliyetine bakılmıştır (Brurberg vd., 2000).

1.6. *Bacillus thuringiensis* ve Cry Toksinleri

Bacillus thuringiensis Gram pozitif, spor oluşturan ve aerobik bir toprak bakterisidir. Vejetatif hücreler 1 µm genişliğinde, 5 µm uzunluğunda ve kısa flagellalara sahiptirler. *B. thuringiensis* türleri *Bacillus cereus*'lerden sporulasyon esnasında kristal proteinler üretebilmeleriyle ayırt edilirler (Höfte vd., 1989; Martin, 1994).

B. thuringiensis ilk olarak 20. yüzyılın başlangıcında Ishiwata (1901) tarafından Japonya'da ipekböceklerine ait bir bakteriyel hastalığa yönelik araştırması sırasında keşfedilmiştir. 1911 yılında Berliner Almanya'da un güvelerinin larvalarını öldüren benzer bir basil bulmuş ve *B. thuringiensis* olarak isimlendirdiği bakterinin özelliklerini yayımlamıştır (Joung vd., 2000).

B. thuringiensis Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip delta-endotoksinler olarak bilinen kristal yapıda toksinler üretir (Beegle vd., 1992). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga böcek grupları üzerinde ve ayrıca nematodlar, keneler ve protozoonlar üzerinde de aktivitesi tespit edilmiştir (Feitelson vd., 1993).

B. thuringiensis tarımda, orman idaresi ve sivrisinek kontrolünde kullanışlı ve alternatif bir pestisitir. Ayrıca bitkilere transfer edilen ve bitkilerde böcek direnci sağlayan toksik proteinleri kodlayan genlerin kaynağıdır (Höfte vd., 1989).

B. thuringiensis türleri kristal proteinlerin dışında alfa-ekzotoksin, beta-ekzotoksin, hemolizinler, enterotoksinler, kitinazlar ve fosfolipazları içeren çeşitli virülans faktörleri üretirler (de Maagd vd., 2001).

B. thuringiensis türleri toprak, böcek ve diğer çeşitli habitatlardan izole edilmişlerdir. *B. thuringiensis* türleri arasında geniş bir çeşitlilik vardır. Çoğu tür 2 ile 12 *cry* genini barındıran doğal multigenik türlerdir. Çoğu *cry* genleri yüksek moleküler ağırlıktaki (>30 KDa) ve düşük kopya sayısında olan plazmitlerde bulundurulmakla birlikte bazı *cry* genleri ise kromozomlar üzerinde bulundurulurlar (Kaur, 2000).

B. thuringiensis'de bulunan kristal (*cry*) genleri insektisidal kristal protein (ICP)'leri kodlamaktadır. Bu kristal genleri Lepidoptera (*cry1*), Diptera ve Lepidoptera (*cry2*), Coleoptera (*cry3*), Diptera (*cry4*) gruplarındaki böceklere karşı etkilidir (Joung vd., 2000). Tablo 5 *B. thuringiensis*'lerin kristal protein içeriklerine göre sınıflandırılmasını göstermektedir (Demirbağ vd., 2008).

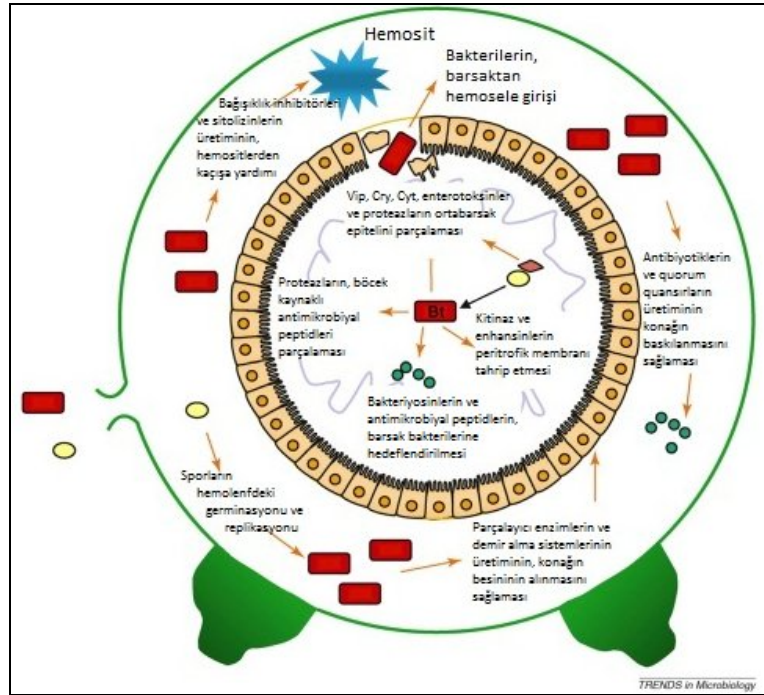
Tablo 5. *Bacillus thuringiensis*'lerin kristal protein içeriklerine göre sınıflandırılması (Demirbağ, vd., 2008).

Gen	Protein	Alttür (suş)	Aktivite Gösterdiği Böcek Grupları
<i>cry1</i>	Cry1	<i>kurstaki</i> (HD-1), <i>aizawai</i> , <i>sotto</i>	Lepidoptera
<i>cry2</i>	Cry2	<i>kurstaki</i> (HD-1) <i>kurstaki</i> (HD-263)	Lepidoptera ve Diptera (Sivrisinekler)
<i>cry3A</i>	Cry3A	<i>tenebrionis</i>	Coleoptera (Krizomelitler)
<i>cry3B</i>	Cry3B	<i>japonensis</i>	Coleoptera (Skarabitler)
<i>cry4</i>	Cry4	<i>israelensis</i>	Diptera (Sivrisinek ve Karasinekler)

B. thuringiensis kristal proteinleri konak seçiciliği gösterir. Bu nedenle kristal proteinlerin her bir tipi bir ya da daha fazla spesifik böcek türü için toksik olabilir. Bu spesifik toksisiteden dolayı kristal proteinler çoğu faydalı böcekleri, bitkileri, hayvanları ve insanları etkilemezler. İsektisidal kristal proteinlerinin seçiciliği etki biçimlerinden kaynaklanır. (Adang, 1991; Gill vd., 1992).

Kristal proteinler konağın bağırsak duvarını felce uğratarak bağırsak epitelyum hücrelerinin tahrip edilmesine sebep olur ve etkisini bu şekilde gösterir. Kristal proteinler ağız yoluyla alınmasının ardından konak böceğin bağırsağındaki alkali ortamda çözünerek protoksinlere dönüşürler. Ardından proteolitik bir yolla protoksinler parçalanarak aktif toksinlere dönüşür. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak hücreleri tahrip ederler ve gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları

böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebildiği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir (Aronson vd., 1986; Höfte vd., 1989; Lereclus vd., 1989). Şekil 3'te *B. thuringiensis*'in sindirimini takiben hemosole girişi esnasında konağı ile arasında oluşan interaksiyonlar gösterilmektedir (Raymond, vd., 2010).



Şekil 3. *B. thuringiensis*'in sindirimi takiben hemosole girişi esnasında konağı ile arasında oluşan interaksiyonlar. Bt'nin, tırtılın enine kesitinde çeşitli bölmeler, engeller ve bazı doğal immün savunma elemanları ile karşılaşması. Mavi çizgi: peritrofik matriks; yeşil çizgi: kutikula; kırmızı dikdörtgenler: Bt'nin vejetatif formu; sarı oval şekiller: spor formu ve pembe kristaller: Bt'nin kristalleri (Raymond, vd., 2010).

1.7. Kitinaz ve Cry Toksinlerinin Bir Biyokontrol Ajan Olarak Birlikte Kullanılmaları

Larval peritrofik membran bağırsak epitelini lümeninden ayıran silindirik bir tabaka şeklinde biçimlenmiştir. Bu yapı mekanik darbelere ve mikroorganizmaların istilasına karşı fiziksel bir bariyer olarak işlev görür. Çözünmüş cry toksinlerinin orta bağırsak hücrelerinin apikal membranında bulunan reseptörlere bağlanmaları için bu bariyeri geçmeleri gerekir. Peritrofik membran bir ağ şeklinde kitin içerir (Pardo-Lopez, 2009). Kutikula ve peritrofik membranın yapısında bulunan kitinin kitinaz enzimleri tarafından parçalanması, böceğin beslenmesini ve korunmasını düşürmekte ve böylece böceğin zayıf duruma gelmesine neden olmaktadır. Cry toksinlerinin ve kitinazların birlikte kullanılmaları durumunda larval orta bağırsaktaki endokitinaz seviyesinin artmasıyla peritrofik membranda aşınmalar meydana gelir ve delta-endotoksin moleküllerinin spesifik reseptörlerinin bulunduğu epitelyal membrana girebilme seviyesi artar. Bunun sonucunda larvasidal etki yükselir (Regev vd., 1996).

Yapılan bir çalışmada larval cry toksin pereratlarına kitinazların eklenmesiyle inseksidal etkinin 10 kat arttığı rapor edilmiştir (Ding vd., 2008).

Bu konuda ki bir diğer çalışmada da rekombinant tekniklerle kitinaz ve cry toksinlerini ekspres edecek şekilde inşa edilmiş iki farklı *Pseudomonas fluorescens* suşunun *Eldana saccharina* (Lepidoptera; Pyralidae) larvalarının çoğalmasını sinergistik olarak sınırladığı bulunmuştur (Downing vd., 2000).

Bir başka çalışmada *Serratia marcescens chiA* geni *B. thuringiensis*'e aktarılmış ve kitinaz geninin *B. thuringiensis*'de orijinal konağından daha fazla ekspres edildiği ayrıca *B. thuringiensis*'de ki plazmit kararlılığının test edilen 240 generasyon süresi boyunca devam ettiği gözlemlenmiştir (Okay vd., 2008).

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada *Xyleborus dispar*'dan izole edilen *Serratia marcescens* bakterisinden izole edilmiş *chiB* ve *chiC* genlerinin *B. thuringiensis* türlerinde ekspresyonu ve rekombinant *B. thuringiensis* türlerinin *Galleria mellonella*'ya karşı insektisidal etkileri araştırılmıştır. Kitinaz enzimleri, sahip oldukları özgünlük ve patojenite nedeni ile biyolojik mücadelede yaygın bir şekilde kullanılan enzimatik materyallerin arasında bulunmaktadır. Ayrıca *B. thuringiensis* bakterisine ait kristal genlerinin de belirli böcek familyalarına karşı yüksek

insektisidal aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. *S. marcescens* suşunun sahip olduğu bu *kitinaz* genlerinin farklı *B. thuringiensis* bakterilerindeki farklı kristal genleri ile birleştirilmeleri durumunda daha yüksek insektisidal aktiviteye sahip biyolojik mücadele ajanlarının oluşturulması hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteriyal Kùltürler ve Büyüme Şartları

Bu çalışmada kitinolitik aktivitesi daha önceden Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında belirlenmiş ve 16S rRNA sekans analizi yapılmış olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş *Serratia marcescens* bakterisi kullanıldı. Kullanılan diğer bakteri suşları ise *Escherichia coli* DH10β (Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı), *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-1 (Daniel R. Zeigler, Bacillus Genetic Stok Center, Columbus, Ohio), *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (DSMZ 5724), *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* 4Q7 (Daniel R. Zeigler, Bacillus Genetic Stok Center, Columbus, Ohio)'dir. *Serratia marcescens* ve *Bacillus thuringiensis* suşları Luria Bertani (LB;1 litre LB için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü) besiyerinde, 30 °C' de, *E. coli* ise DH10β LB besiyerinde 37°C'de büyütüldü.

2.2. DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega) kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan *Serratia marcescens* bakterisi, 3 ml LB besiyerinde 30 °C'de bir gece inkübe edilerek büyütüldü. Elde edilen sıvı kültürün 1,5 ml'si 13,000×g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı dökülerek uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 600µl Nuclei Lysis Solution eklendi ve pipetle hafifçe karıştırıldı. 80°C'de 5 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Karışımın üzerine 3 µl RNase Solution eklendi ve tüp 2-5 kez alt-üst edildi. Daha sonra karışım 37°C'de 15-60 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Örneğin üzerine 200 µl Protein Precipitation Solution eklendi ve 20 saniye vortekslendi. Daha sonra 5 dakika buzda bekletildi ve 14,000×g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, içinde 600 µl izoproponal bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı ve pellet oluşuncaya kadar tüp alt-üst edildi. 14,000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpe 600 µl oda sıcaklığında %70 etanol ilave edildi ve alt-üst edilerek 14,000×g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp ağzı açık bir şekilde 37°C'de 10-15 dakika bekletilerek etanolün buharlaşması sağlandı. Tüpe 100 µl DNA Rehydration Solution

eklendi ve 65°C’de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen genomik DNA 2-8°C’de muhafaza edildi.

2.3. Primerlerin Dizayn Edilmeleri

Çalışmada kullandığımız *Xyleborus dispar*’dan izole edilmiş *Serratia marcescens* bakterisine ait kitinaz genlerini, kendi promotorları, transkript başlangıç ve bitiş dizileri ile birlikte shuttle vektöre yerleştirmek amacıyla dejenerat primerler hazırlandı (Tablo 6). Bunun için gen bankasında mevcut olan ve *S. marcescens* bakterilerine ait olan B ve C genlerine ait nükleotid sıraları toplandı. Bu sıralar Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla alt alta dizilerek karşılaştırıldı. Primerler genlerin 5’ yukarı (promotor da dahil olacak şekilde) ve 3’ aşağı bölgelerini ihtiva edecek şekilde dizayn edildi.

Tablo 6. *S. marcescens* kitinaz genlerine ait 5’ yukarı ve 3’ aşağı bölgelerini içeren dejenerat primer dizileri.

Gen	Primer	Sıra (5’-3’)
<i>ChiB</i>	KitinazBF	5’-GGGAATTCGTGATTTATTTTCGACTTTTTRT-3’
<i>ChiB</i>	KitinazBR	5’-CCAAGCTTGAGACGAAGGGACGCGAAAATC-3’
<i>ChiC</i>	KitinazCF	5’-GGGGATCCCCCTTCCGTCGCCGATATCAC-3’
<i>ChiC</i>	KitinazCR	5’-CCAAGCTTGCTGCGGGAGATGCAAGCG-3’

2.3.1. Kitinaz Genlerinin PCR ile Çoğaltılması

Kitinaz genlerine ait dejenerat primerler kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı. Reaksiyonlar 50 µl’lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 50 ng genomik DNA, 1,5 µl 1mM ileri primeri, 1,5 µl 1mM geri primeri, 1,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl 50 mM MgCl₂, 10µl 5x Phusion HF tamponu ve 1 ünite Phusion DNA polimeraz (FINNZYMES) bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl’ye tamamlandı.

PCR şartları 98 °C'de 30 saniyelik denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 98 °C'de 10 saniye, 48 °C'de 20 saniye ve 72 °C'de 40 saniye ve son olarak da 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR 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. *Kitinaz* Genlerinin Klonlama Vektörüne Klonlanmaları

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *chiB* ve *chiC* genleri agaroz jelden kesilerek Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Doğrulama aktivitesi yüksek olan Phusion DNA Polymerase PCR'da küt uçlara sahip ürün oluşturmaktadır. PCR'da çoğaltılan *chiB* ve *chiC* genlerini pGEMT-Easy plazmidine klonlayabilmek için bu genlerin sarkık uçlu olması gerekmektedir. Bu yüzden bu genlere 1 Adenin (A) eklendi ve ayrı ayrı pGEMT-Easy plazmidine klonlandılar. 1 Adenin (A) eklemek için, 6.5 µl DNA, 2 µl 5 X reaksiyon tamponu, 0.6 µl MgCl₂, 0.5 µl 10mM dATP ve 0.4 µl Taq polymerase (Promega) karışımı 72°C de 30 dakika inkübe edildi. Klonlama için 1µl PGEMT-Easy, 8µl (150 ng) klonlanacak gen, 5 µl 2X reaksiyon tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz kullanıldı. Reaksiyonlar 16°C de 16 saat inkübe edildi.

- *Kitinaz* genlerinin elektrokompotent *E. coli*'ye aktarımı

Petriye ekilmiş *E. coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca üretildi. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde üretildi. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4.000×g hızında 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti %10'luk soğuk gliserolde çözüldü ve 4.000 rpm'de 4°C 'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti 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, diğerine hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nın 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 aktararak 6000 \times g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 μ l kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 50 μ g/ml ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100mg/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 plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

- Rekombinant plazmidlerin izolasyonu ve restriksiyon endonükleazlar ile muamelesi

Mavi/beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek 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 için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 μ l kalacak şekilde döküldü ve çökelti 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. Bunu takiben üzerine 150 μ l 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000 \times g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 μ l %100'lük etanol ilave edilerek 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 μ l ddH₂O'da çözüldü. İzole edilen plazmit DNA'ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *chiB* için *EcoRI* restriksiyon enzimi ve *chiC* için *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. *chiB* için 2 μ g DNA, 0,5 μ l *EcoRI* (promega), 2 μ l enzime ait 10X reaksiyon tamponu ve 7,5 μ l dH₂O ve *chiC* için 2 μ g DNA, 0,5 μ l *BamHI* (promega), 0,5 μ l *HindIII*

(promega), 2 µl enzime ait 10X reaksiyon tamponu ve 7 µl dH₂O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.5. *Kitinaz* Genlerinin Dizi Analizi

Elde edilen klonlardan seçilen 3 tanesinin 5 ml ampisilinli LB besiyerine ekimi yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültürler, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, USA) kiti kullanılarak izole edildi. Plazmit DNA konsantrasyonları OD₂₆₀'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek MacroGen Firmasına (Güney Kore) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi.

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

2.6. *Kitinaz* Genlerinin pHY300PLK Shuttle Vektöre Klonlanması

pHY300PLK shuttle vektörünü içeren *E. coli* DH10β bakterisine ait bir koloniden 50 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu büyütüldü. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmit DNA izolasyonu, "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

- pHY300PLK shuttle vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

İzole edilen plazmit DNA'sından *chiB* ve *chiC* genlerinin klonlanabilmesi için iki farklı kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Birinci reaksiyon için; 2 µg plazmit DNA, 1,5 µl *EcoRI*, 4 µl 10X Buffer (*EcoRI*) ve 19,5 µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 40 µl olacak şekilde hazırlandı. İkinci reaksiyon ise 2 µg plazmit DNA, 1,5 µl *BamHI* ve 1,5 µl *HindIII*, 4 µl 10X TA tamponu ve 19,5 µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 40

µl olacak şekilde hazırlandı. Her iki reaksiyon 37 °C’de 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen ürünler %1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hale getirilmiş ve 4870 bp büyüklüğündeki iki farklı kesim ürünü olan pHY300LK shuttle vektörleri, DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendiler.

- *Kitinaz* genlerinin pGEMT-Easy klonlama vektöründen kesilerek çıkarılmaları

chiB ve *chiC* genlerini PGEMT-Easy vektörüne klonlanmış durumda 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 boyunca çöktürüldükten sonra plazmit DNA izolasyonu kiti (Promega) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmit DNA’sından iki farklı kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Birinci reaksiyon; *chiB* genini içeren rekombinant plazmit DNA’dan 2 µg alınarak, 1,5 µl *EcoRI*, 4 µl 10 X Buffer (*EcoRI*) ve 19,5 µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 40 µl olacak şekilde hazırlandı. İkinci reaksiyon için ise, *chiC* genini içeren rekombinant plazmit DNA’dan 2 µg alınarak, 1,5 µl *BamHI* ve 1,5 µl *HindIII*, 4 µl 10X TA tamponu ve 18 µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 40 µl olacak şekilde hazırlandı. Her iki reaksiyon 37 °C’de 4 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri DNA standardı olarak 1kb DNA Ladder (Promega) ile birlikte %1’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pGEMT-Easy vektöründen *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilerek ayrılmış *chiB* ile *HindIII* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılmış *chiC* genleri, agaroz jelden kesilerek alındılar ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendiler.

- *chiB* ve *chiC* genlerinin pY300PLK vektörüne aktarımı

Jelden temizlenen *kitinaz B* ve *C* genleri ve pHY300PLK shuttle vektörüne klonlandılar. Buna göre her bir gen için reaksiyon; 7,5 µl 2 X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 1,5 µl pHY300PLK shuttle vektörü, 7 µl insert DNA olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16 °C’de 16 saat bekletildi.

- pY300PLK vektöre klonlanan *chiB* ve *chiC* genlerinin *E.coli* DH10β’a aktarımı

Daha önceden hazırlanan ve -80'de saklanan elektrokompotent *E. coli* DH10 β hücrelerinden 2 tüp alınarak buza yerleştirildi. Tüplere her bir gen için 3 μ l ligasyon ürünü bırakıldı. 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 1,5 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000 \times g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorf'ta 100 μ l kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 50 μ g/ml ampisilin içeren LB agar petrilere yayıldı. Gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

- Rekombinant plazmidlerin seçilmesi

chiB ve *chiC* genlerini içeren rekombinant plazmid DNA'larını izole etmek 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 için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 μ l kalacak şekilde döküldü ve çökelti 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. Bunu takiben üzerine 150 μ l 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000 \times g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 μ l %100'lük etanol ilave edilerek 14.000 \times g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 μ l ddH₂O'da çözüldü. İzole edilen plazmit DNA'ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *chiB* için *EcoRI* restriksiyon enzimi ve *chiC* için *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. *chiB* için 10 μ l DNA, 0,5 μ l *EcoRI* (promega), 2 μ l enzime ait 10 \times reaksiyon tamponu ve 7,5 μ l ddH₂O ve *chiC* için 10 μ l DNA, 0,5 μ l *BamHI* (promega), 0,5 μ l *HindIII* (promega), 2 μ l enzime ait 10 X TA tamponu ve 7 μ l ddH₂O olacak şekilde 20 μ l'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

- Elektrokompotent *Bacillus thuringiensis* hücrelerinin hazırlanması

Elektrokompotent *Bacillus thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücreleri Bone ve Ellar'a göre modifiye edilerek hazırlandı (Bone vd., 1989). Petriye ekilmiş *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B.thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerinden tek bir koloni alınıp ayrı ayrı NaCl ihtiva etmeyen 3ml Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,5 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4.000×g hızında 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti %10'luk soğuk gliserolde çözüldü ve 5.000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti 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.

- *chiB* ve *chiC* genlerini içeren pHY300PLK vektörünün *Bt* hücrelerine aktarımı

Daha önceden hazırlanan ve -80'de saklanan elektrokompotent *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerinden her bir kitinaz geni için 1 tüp alınarak buza yerleştirildi. Tüplere her bir gen için 5 µl ligasyon ürünü bırakıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon küvetlerine (0,2 cm) aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nin elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Küvetler 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 1,5 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000 g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 µl kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 15µg/ml tetrasiklin içeren LB agar petrilere yayıldı. Gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

- Rekombinant *Bacillus thuringiensis* hücrelerinden koloni PCR yapılması

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 kolonilerinden kürdan yardımıyla bir koloni alınıp PCR tüpünün iç cidarına dokunduruldu ve kürdan, içinde 15 µg/ml tetrasiklin içeren 3ml LB besiyerine bırakıldı. *Kitinaz* genlerine ait primerler kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı. Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 2,5 ünite Go Taq DNA polimeraz (Promega), 5 µl 5x PCR 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 bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 94 °C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 10 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 48 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika sonra 25 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ve son olarak da 72 °C'de 7 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR 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.

- Rekombinant *Bacillus thuringiensis* hücrelerinden hücre PCR yapılması

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve plazmit atılmayan *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücreleri 15µg/ml tetrasiklin içeren 3ml LB besiyerinde 37°C'de 200 rpm'de 16 saat büyütüldükten sonra hücre PCR yapıldı. *Kitinaz* genlerine ait primerler kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 2,5 ünite Go Taq DNA polimeraz (Promega), 5 µl 5x PCR tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 2,5 mM MgCl₂, 1,5 µl 1 mM ileri primeri, 1,5 µl 1 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 3 µl bakteri kültürü bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 94 °C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 10 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 48 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika sonra 25 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ve son olarak da 72 °C'de 7 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR 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.

2.7. Plazmit Stabilite Testi

-80 °C'de muhafaza edilen *chiB* ve *chiC* genlerinin klonlandığı rekombinant plazmitleri içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724, *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *E. coli* DH10β bakterileri 15 µg/ml tetrasiklin içeren LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekildi ve 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. Her bir örnekten 1 koloni alınıp tetrasiklinsiz 3 ml LB besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de 200 rpm'de 24 saat büyütüldü. Bu sürenin sonunda her bir kültürden 20'şer µl alınıp yeni tetrasiklinsiz 3 ml LB besiyerine inoküle edildi. 30 gün boyunca bu işleme devam edildi. Bu 30 gün süre içinde belirli günlerde (haftada 1 kez) örneklerden 100 µl alınıp 10⁻⁵ oranında dH₂O ile seyreltildi ve hem 15 µg/ml tetrasiklin içeren LB agar besiyerine hem de tetrasiklinsiz LB agar besiyerine yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 16 saat inkübe edildi. Ertesi gün koloniler sayıldı.

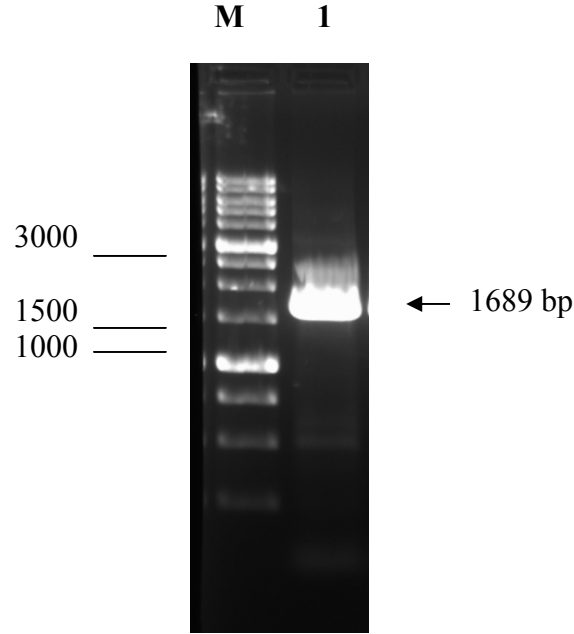
2.8. Rekombinant *Bacillus thuringiensis* Hücrelerinin İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerimizin insektisidal aktivitesinin belirlenmesi için laboratuvar kültürümüz olan *Galleria mellonella* (Lepidoptera) 3. instar larvaları kullanıldı. Biri kontrol diğerleri *Serratia marcescens*, *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiB* ve *chiC* genlerinin klonlandığı rekombinant plazmitleri içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 bakterileri için toplam 11 grup oluşturuldu. Her bir grupta 10 tane larva bulunduruldu. Larvalar bioassay kaplarına konuldu ve bir gece aç bırakıldılar. Eş zamanlı olarak yukarıda belirttiğimiz bakterilerden 3ml LB'ye kültür atıldı ve 30 °C'de 16 saat 200 rpm'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 1.89 olacak şekilde büyütüldü. Büyüyen hücrelerden *Galleria mellonella* besinlerine 200 µl enjekte edildi. Kontrol grubunun besinine ise 200 µl su enjekte edildi. Besinler larvaların bulunduğu kaplara konuldu. Her bir bakterinin insektisidal etkisi 10 gün boyunca takip edildi. İnsektisidal aktivite testleri 3 tekrarlı yapıldı.

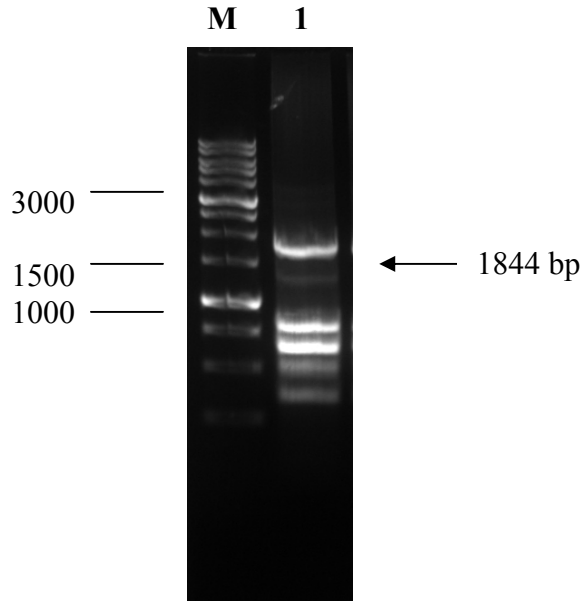
3. BULGULAR

3.1. *Kitinaz* Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

Serratia marcescens bakterisine ait *chiB* ve *chiC* genleri promotor bölgesini içerecek biçimde dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yapıldı. Sonuçta *chiB* ve *chiC* genlerinin promotor bölgeleri de dahil olmak üzere genlerin aşağı ve yukarı bölgelerini içerecek şekilde sırasıyla 1689 ve 1844 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu belirlendi. (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4. PCR ile çoğaltılmış *chiB* genin agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: *chiB*.



Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü.
M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: *chiC*.

3.2. *chiB* ve *chiC* Genlerinin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

chiB ve *chiC* genleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genlerin her iki tarafından gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre, *chiB* için toplam 1.689 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi. *chiB* geni upstream ve downstream askı bölgelerini içerecek şekilde 1.689 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgenin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*ChiB* ara bölge Fw; (5'-CCTTCTACAATGCGCTGCGCG-3')) dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için dizin analizine tekrar gönderildi. Böylece ara bölgenin de sırası belirlenerek DNA dizin analizi tam olarak gerçekleştirildi (Ek Şekil 1). *chiC* için ise toplam 1.844 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi. *chiC* geni upstream ve downstream askı bölgelerini içerecek şekilde 1.844 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgenin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*ChiC* ara bölge Fw; (5'-CCTGGATTATATTAACGCCC-3')) dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için dizin analizine tekrar gönderildi. Böylece ara bölgenin de sırası belirlenerek DNA dizin analizi tam olarak gerçekleştirildi (Ek Şekil 2).

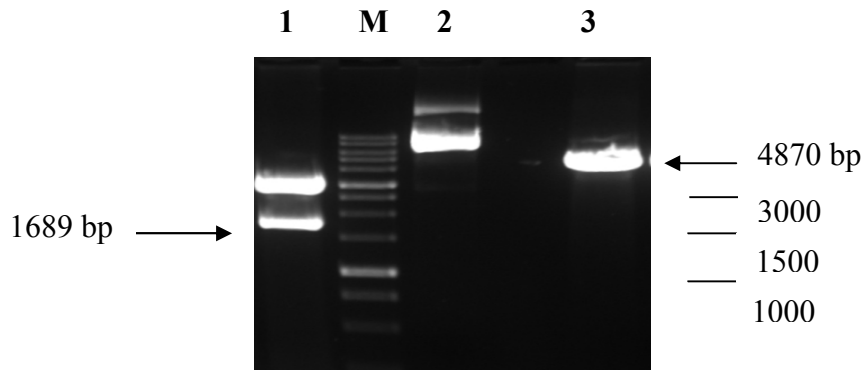
DNA dizin analizi gerçekleştirilen genlerin aminoasit sıraları da belirlendi. Bu sıralar *chiB* için 499 aa ve *chiC* için 480 aa olarak tespit edildi.

3.3. *Kitinaz* Genlerinin Nükleotid Sıralarının Karşılaştırılması

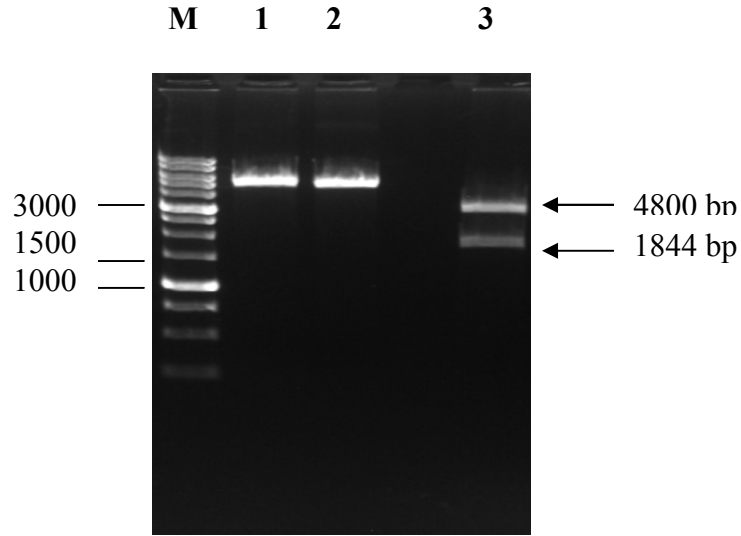
Elde edilen mevcut nükleotid sıraları Clustal W Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut *kitinaz* sıraları ile karşılaştırmaları yapıldı. Karşılaştırma sonucuna göre, izolatımıza ait *chiB*, gen bankasında ki *S. marcescens* (BJL200) *chiB* genine %96, *S. marcescens chiB* genine (X15208.1) %95, *S. marcescens chiB* (AB0159997.1) genine %95 ve *S. marcescens chiB* (GQ855218.1) genine ise %95 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. İzolatımıza ait *chiC* ise, gen bankasında ki *S. marcescens chiC* (AJ630582.1) genine %96, *S. marcescens chiC* (AB019238.1) genine %95, *S. marcescens chiC* (AF454464.1) genine %95 ve *S. marcescens chiC* (DQ990374.1) genine %95 oranında benzerlik göstermektedir.

3.4. *Kitinaz* Genlerinin pHY300PLK Shuttle Vektörüne Klonlanması

Sekansı elde edilen klonların birer tanesinden kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış *chiB* ve *chiC* genleri pHY300PLK shuttle vektörüne aktarılmak üzere *chiB* için *EcoRI* ve *chiC* için *HindIII* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 6, 7). Aynı şekilde pHY300PLK shuttle vektörü de aynı enzimler ile kesildi. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve *kitinaz* genleri birbirine yapıştırıldı.



Şekil 6. *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilen *chiB* ve pHY300PLK shuttle vektörünün %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder, 1: *chiB*'nin *EcoRI*, 2: kesilmemiş pHY300PLK shuttle vektörü, 3: pHY300PLK shuttle vektörünün *EcoRI* kesim sonucu).

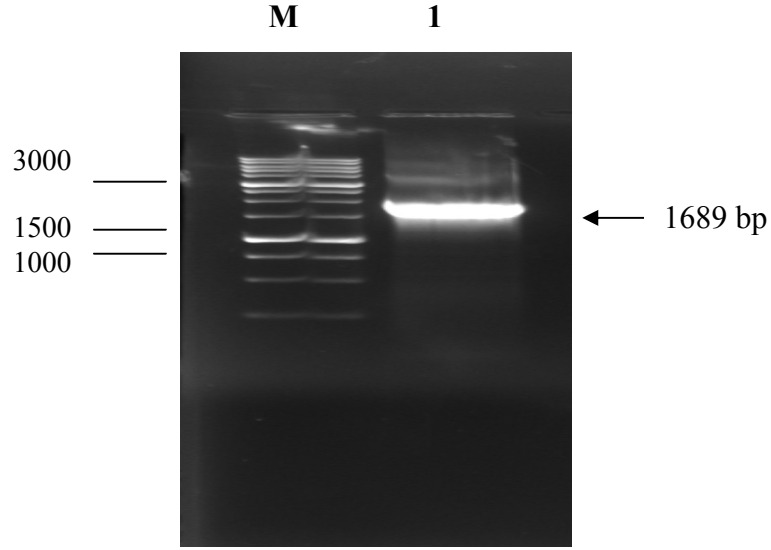


Şekil 7. *Hind*III ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilen pHY300PLK shuttle vektörü ve *chiC*'nin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 1 kb DNA Ladder, 1, 2: pHY300PLK shuttle vektörünün *Hind*III ve *Bam*HI ile 3: *chiC*'nin *Hind*III ve *Bam*HI ile kesim sonucu).

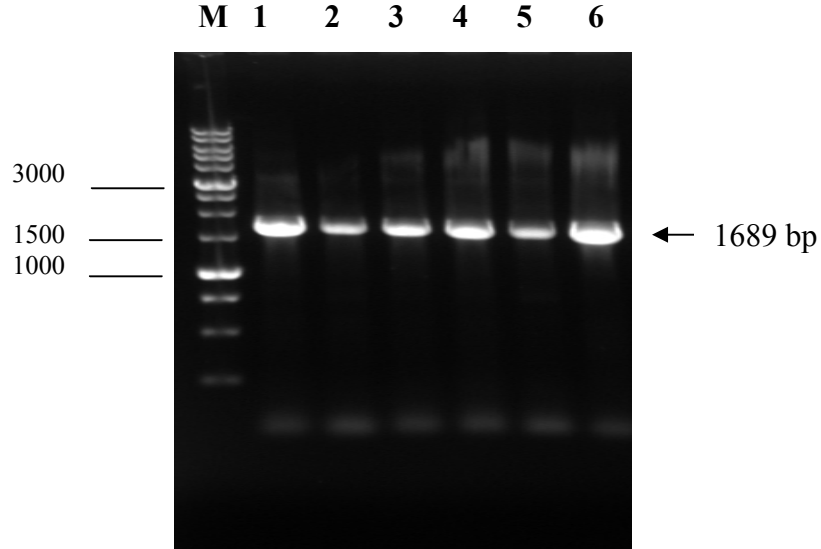
kitinaz genlerini yapıştırdığımız pHY300PLK shuttle vektörü elektrokompotent *E. coli* DH10 β konak hücrelerine aktarıldı. Elde edilen kolonilerden plazmid DNA'lar izole edildi. Bu plazmitlerin *kitinaz* genlerini içerip içermediği, *chiB* için *Eco*RI, *chiC* için ise *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek bakıldı. *kitinaz* genlerini içeren plazmitler seçildi ve elektrokompotent *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine transformasyon yapıldı.

- Rekombinant *Bacillus thuringiensis* hücrelerinden koloni PCR yapılması

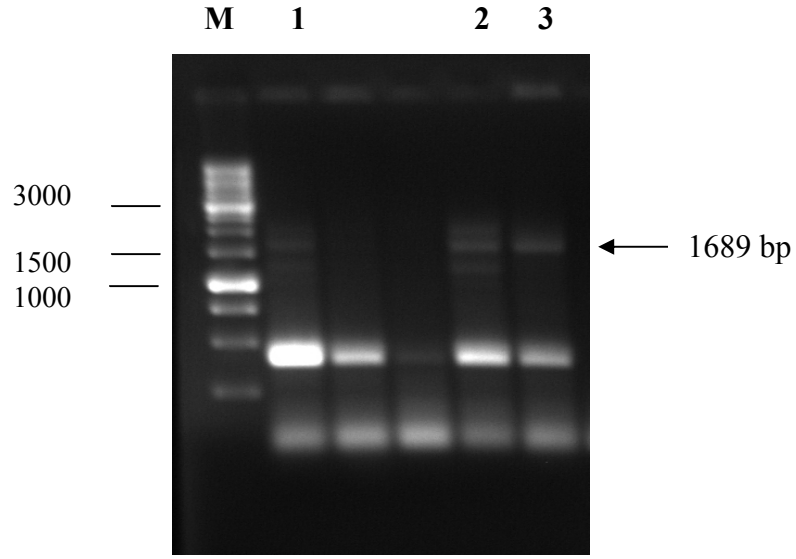
chiB ve *chiC* genlerine ait primerler kullanılarak rekombinant plazmit (pHYB ve pHYC) içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine koloni PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Sonuç olarak *chiB* geni için 1.689 bp'lik bir bant elde edildi (Şekil 8, 9, 10).



Şekil 8. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 hüresine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M:1 kb DNA ladder (Promega),1: *chiB* geni).

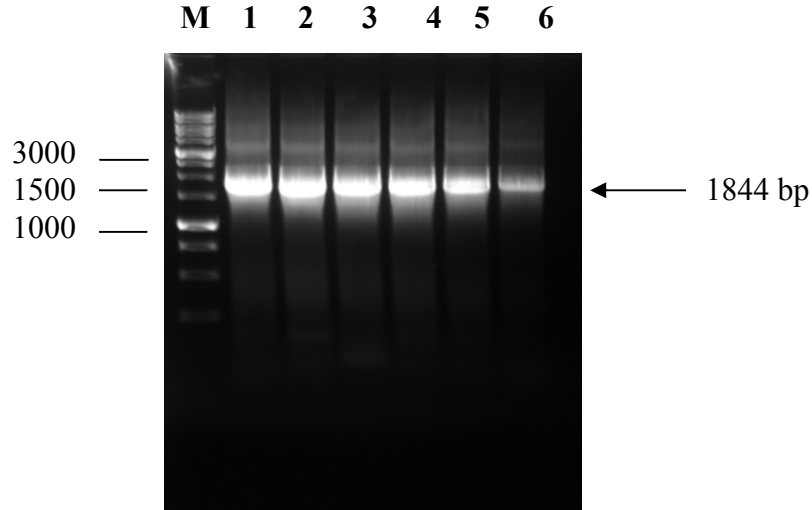


Şekil 9. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1, 2, 3, 4, 5, 6 *chiB* geni).

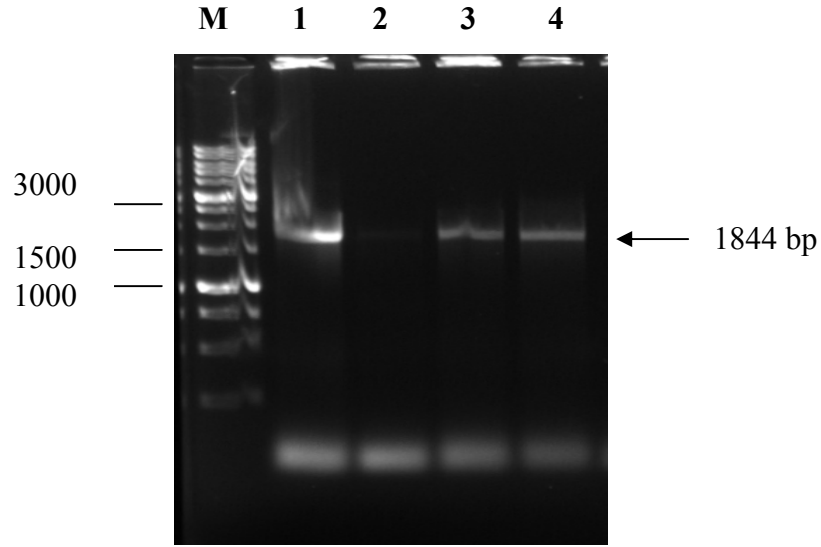


Şekil 10. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 5724 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 k DNA ladder (Promega), 1, 2, 3 *chiB* geni).

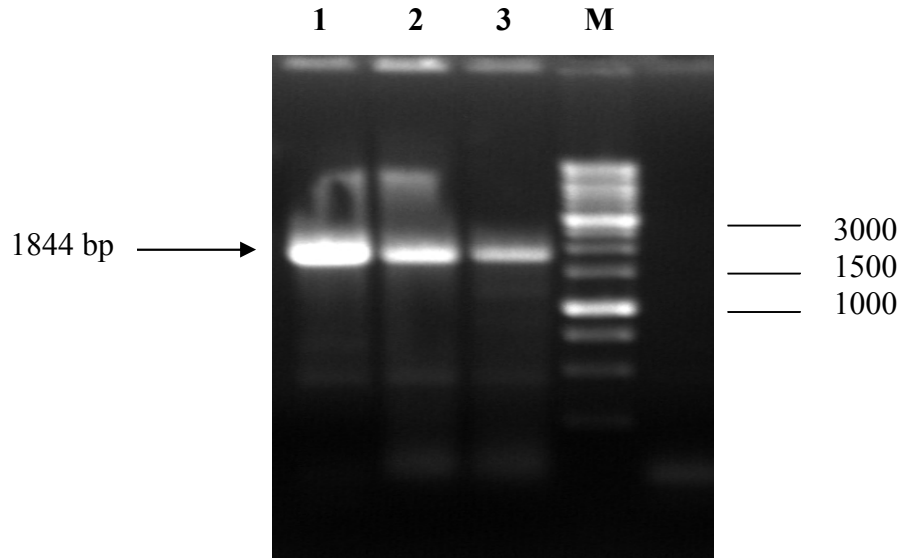
Koloni PCR sonucunda *chiC* geni için ise 1.844 bp büyüklüğünde bir bant elde edildi (Şekil 11, 12, 13).



Şekil 11. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1kb DNA ladder (Promega), 1, 2, 3, 4, 5, 6: *chiC* geni)



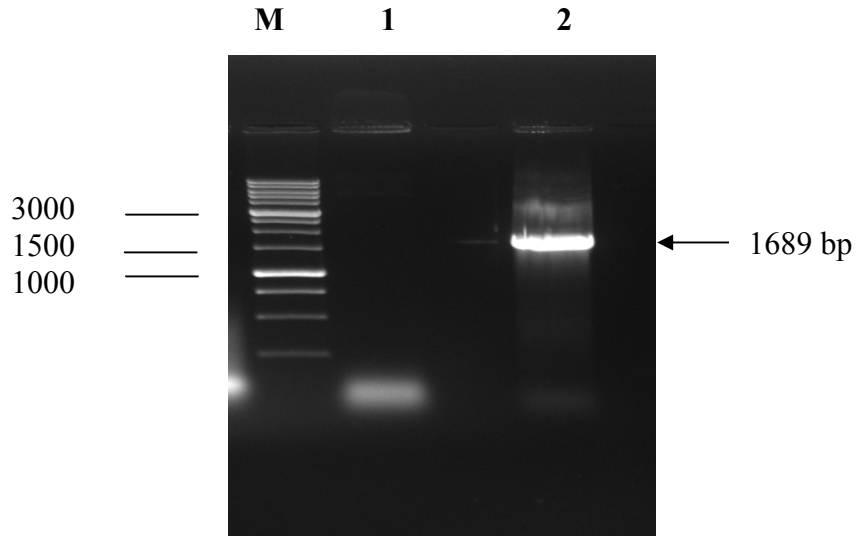
Şekil 12. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kbDNA ladder (Promega), 1, 2, 3, 4: *chiC* geni).



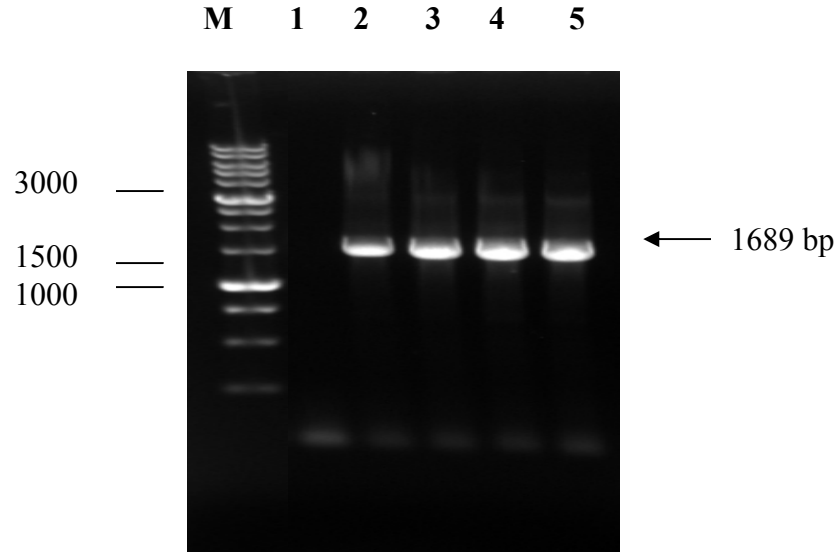
Şekil 13. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 5724 hücrelerine yapılan koloni PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kbDNA ladder (Promega), 1, 2,3: *chiC* geni).

- Rekombinant *Bacillus thuringiensis* hücrelerinden hücre PCR yapılması

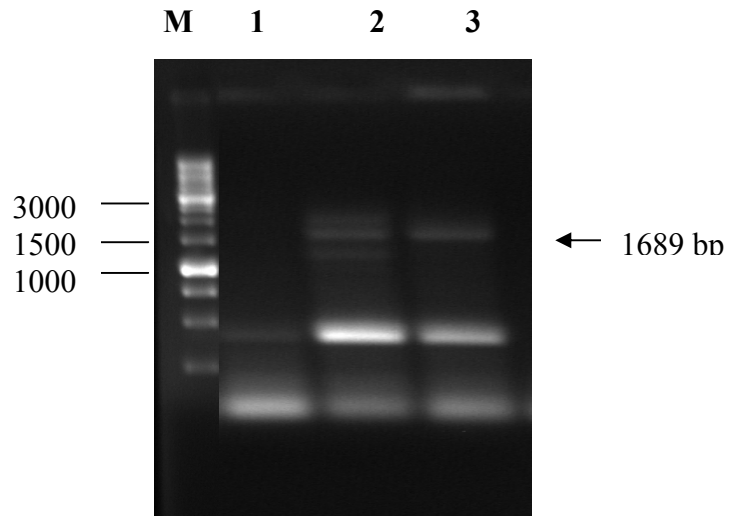
chiB ve *chiC* genlerine ait primerler kullanılarak rekombinant plazmit (pHYB ve pHYC) içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine ve *B. thuringiensis* türlerinin kendi kitinazlarını kontrol amacıyla rekombinant plazmit içermeyen *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine hücre PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Sonuç olarak *chiB* geni için 1.689 bp büyüklüğünde bant elde edildi (Şekil 14, 15, 16).



Şekil 14. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: Kontrol 2: *chiB* geni).

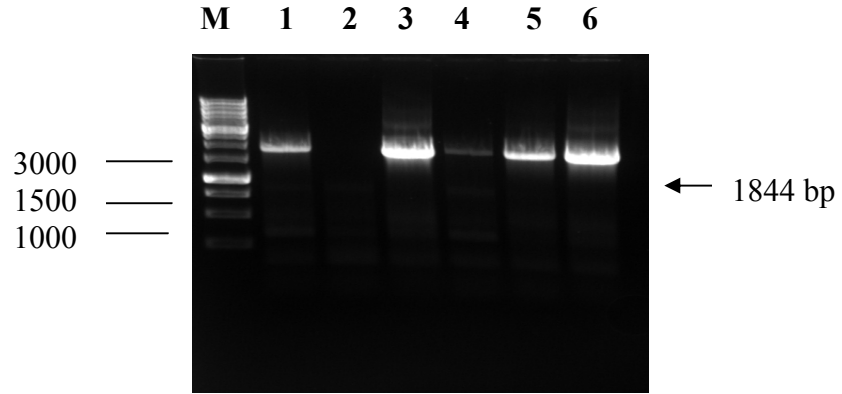


Şekil 15. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: Kontrol, 2, 3, 4, 5: *chiB* geni).

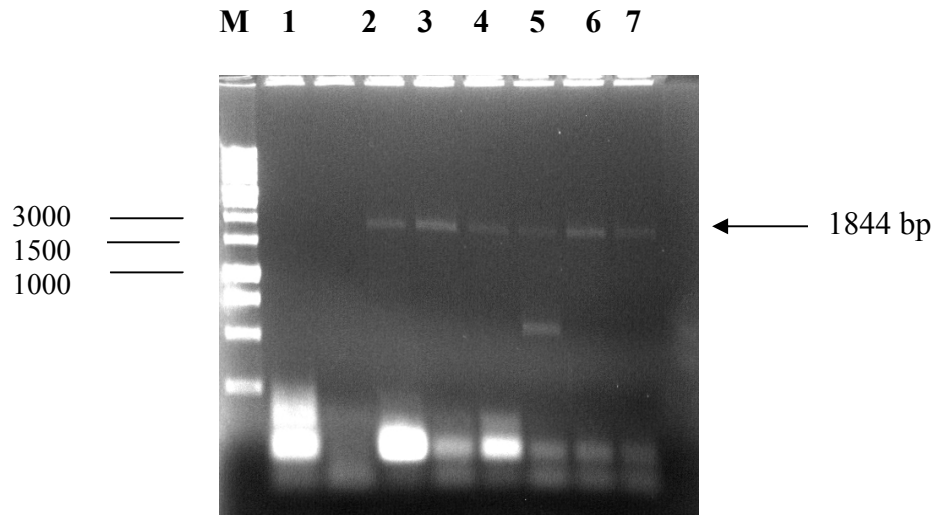


Şekil 16. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis israelensis* 5724 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiB* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1: Kontrol, 2, *chiB* geni).

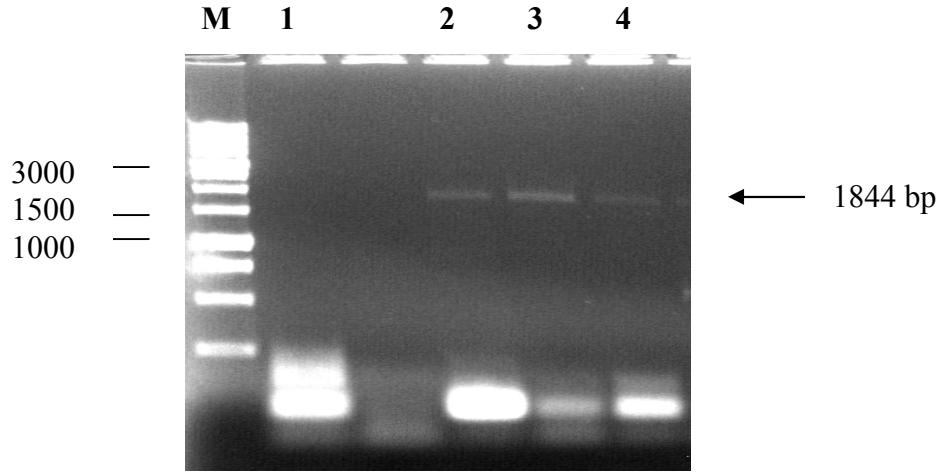
Kitinaz C geni için 1.844 bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. Rekombinant plazmit içermeyen *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerinde kitinaz genlerine ait bir bant saptanamadı (Şekil 17, 18, 19).



Şekil 17. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B.thuringiensis israelensis* 4Q7 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kb DNA ladder (Promega), 1, 3, 4, 5, 6: *chiC* geni, 2: Kontrol).



Şekil 18. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 DNA ladder (Promega) 1: Kontrol 2, 3, 4, 5: *chiC* geni).



Şekil 19. pHY300PLK rekombinant plazmitini içeren *B. thuringiensis* 5724 hücrelerine yapılan hücre PCR ile çoğaltılan *chiC* geninin agaroz jel görüntüsü. (M: 1 kbDNA ladder (Promega), 1: Kontrol 2, 3, 4: *chiC* geni).

3.5. Plazmit Stabilite Testi

chiB ve *chiC* genlerinin klonlandığı rekombinant plazmitleri içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724, *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *E. coli* DH10 β bakterilerine uygulanan 30 günlük plazmit stabilite testi sonucunda yüksek oranda bir plazmit kaybı gözlemlenmiştir. *chiB* ve *chiC* genlerinin klonlandığı rekombinant plazmitleri içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 suşu diğer rekombinant plazmit içeren suşlara göre daha kısa zamanda plazmit kaybetmiştir (Tablo 7)

Tablo 7. Plazmit stabilite testi.

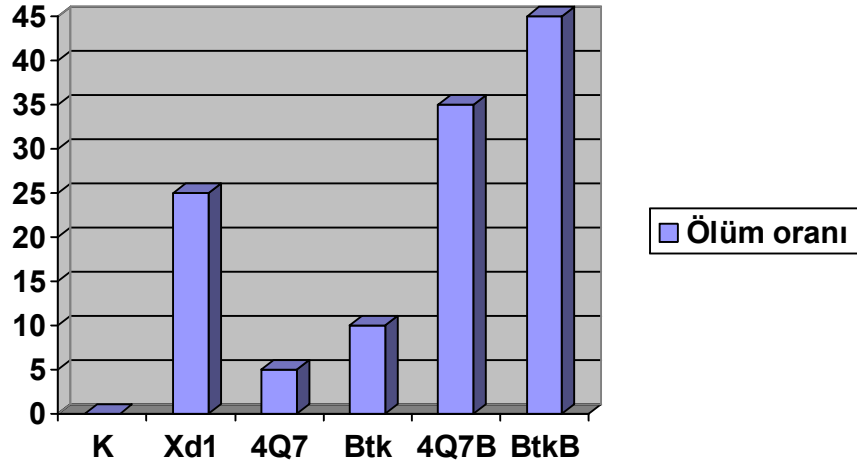
Bakteri /Koloni Sayısı	8. gün	15. gün	22. gün	30. gün
BtkB	110	9	7	7
BtkC	205	140	45	7
BtisB	750	200	14	14
BtisC	720	600	10	5
4Q7B	22	0	0	0
4Q7C	200	95	0	0
EpHYB	800	350	55	4
EpHYC	755	400	65	1

Not: Tüm bakteri grupları 10^{-5} oranında sulandırılmıştır.

3.6. Rekombinant *Bacillus thuringiensis* Hücrelerinin İnsektisidal Aktivitesinin Belirlenmesi

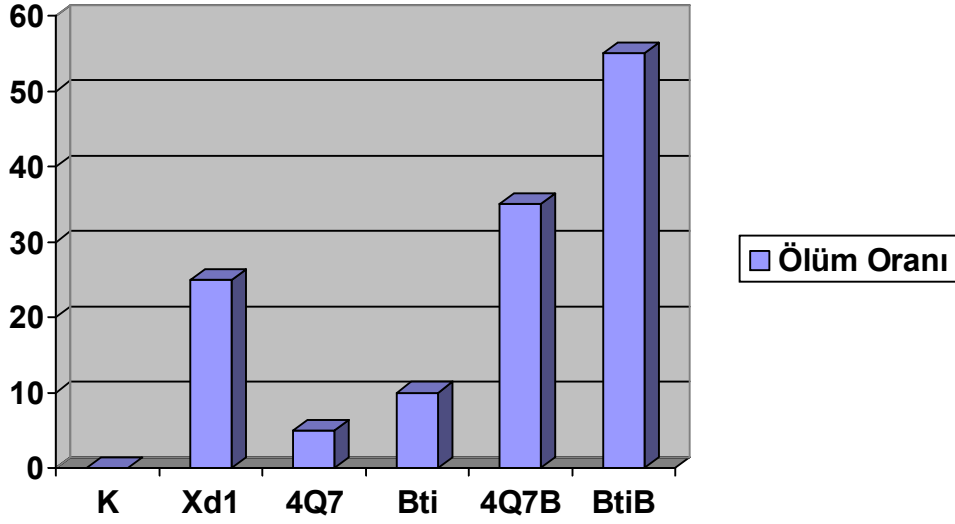
Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerimizin insektisidal aktivitesinin belirlenmesi için *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvaları üzerinde yapılan bioassay sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Şekil 20’de Xd1, 4Q7, Btk ve *chi B* geninin aktarıldığı 4Q7B ve BtkB’nin *G. mellonella larvaları* üzerindeki insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve 4Q7B’nin yabancı tiplere göre %10-%30, BtkB’nin ise %20-%40 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Yabancı suş Btk %10 insektisidal aktivite gösterirken, BtkB %45 insektisidal aktivite göstermiştir.



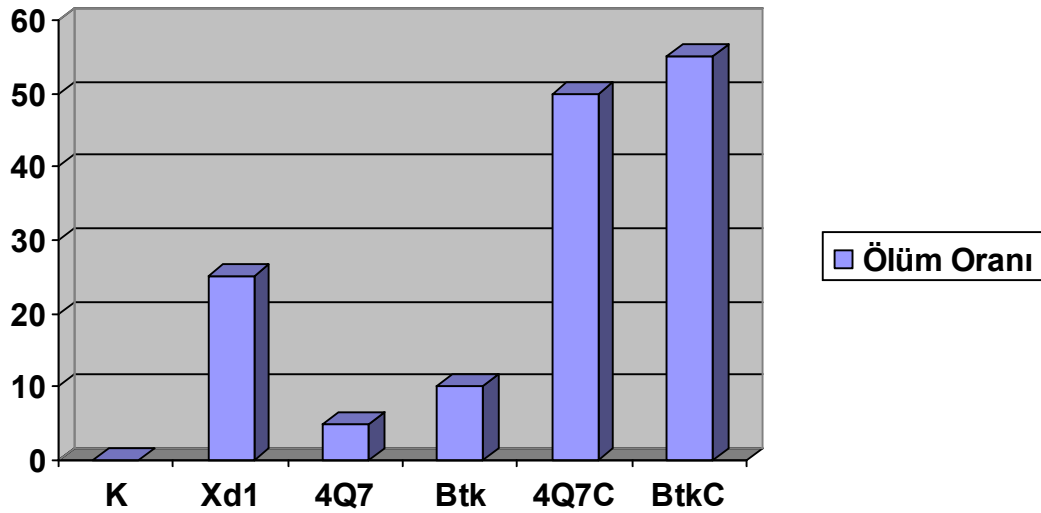
Şekil 20. Kontrol grubu ve bakteri gruplarına ait insektisidal aktivite (K: Kontrol, Xd1: *Serratia marcescens*, 4Q7: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, Btk: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1, 4Q7B: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiB*, BtkB: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiB*).

Şekil 21’de Xd1, 4Q7, Bti ve *chiB* geninin aktarıldığı 4Q7B ve BtiB’nin *Galleria mellonella larvaları* üzerindeki insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve 4Q7B’nin yabanil tiplere göre %10-%30, BtiB’nin ise %30-%50 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Yabanil suş Bti %10 insektisidal aktivite gösterirken, BtiB %55 insektisidal aktivite göstermiştir.



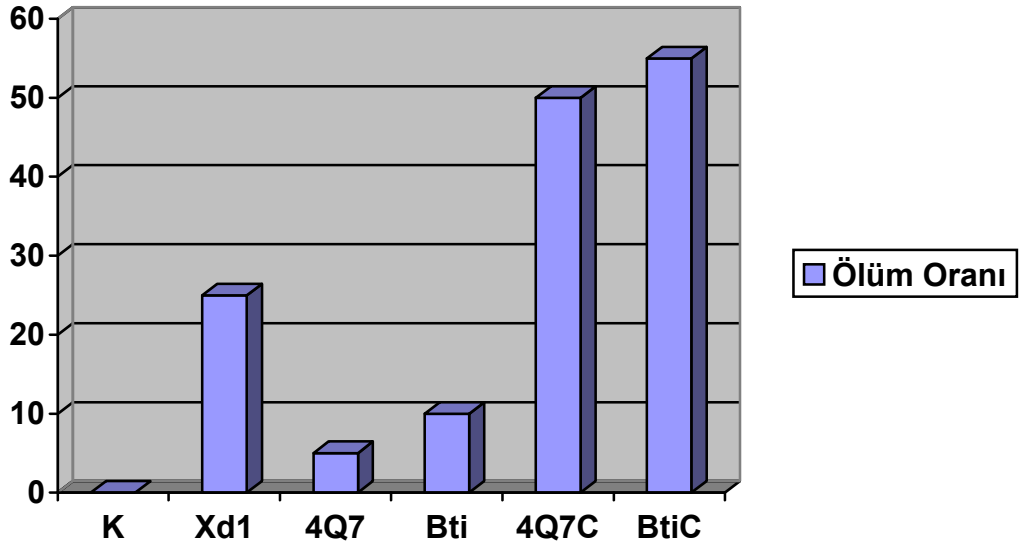
Şekil 21. Kontrol grubu ve bakteri gruplarına ait insektisidal aktivite (K: Kontrol, Xd1: *Serratia marcescens*, 4Q7: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, Bti: *B. thuringiensis israelensis* 5724, 4Q7B: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiB*, BtiB: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiB*).

Şekil 22’de Xd1, 4Q7, Btk ve *chiC* geninin aktarıldığı 4Q7C ve BtkC’nin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve 4Q7C’nin yabancı tiplere göre %25-%45, BtkC’nin ise %30-%50 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Yabancı suş Btk %10 insektisidal aktivite gösterirken, BtkC %55 insektisidal aktivite göstermiştir.



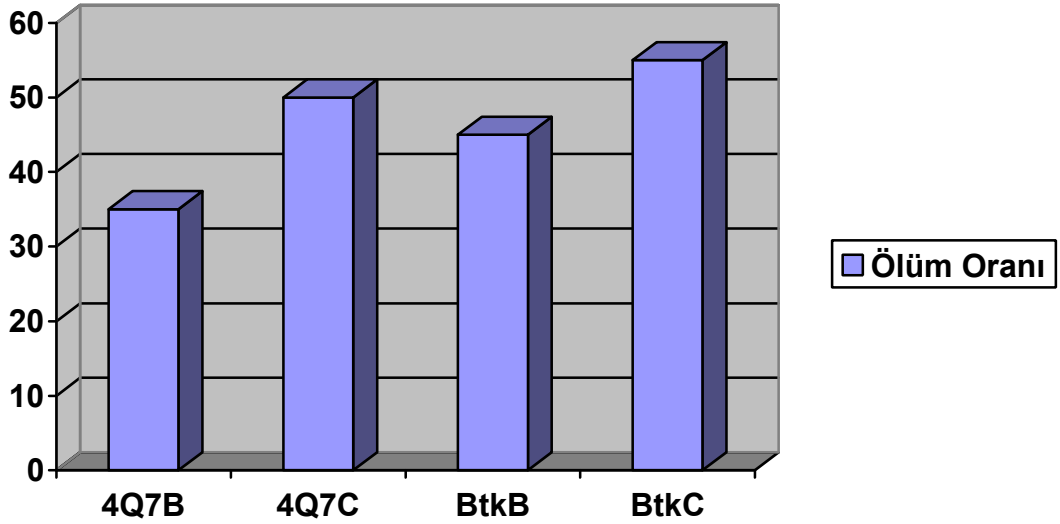
Şekil 22. Kontrol grubu ve bakteri gruplarına ait insektisidal aktivite (K: Kontrol, Xd1: *Serratia marcescens*, 4Q7: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, Btk: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1, 4Q7C: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiC*, BtkC: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiC*).

Şekil 23’de Xd1, 4Q7, Bti ve *chi C* geninin aktarıldığı 4Q7C ve BtiC’nin *Galleria mellonella larvaları* üzerindeki insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve 4Q7C’nin yabancı tiplere göre %25-%45, BtiC’nin ise %30-%50 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Yabancı suş Bti %10 insektisidal aktivite gösterirken, BtiC %55 insektisidal aktivite göstermiştir.



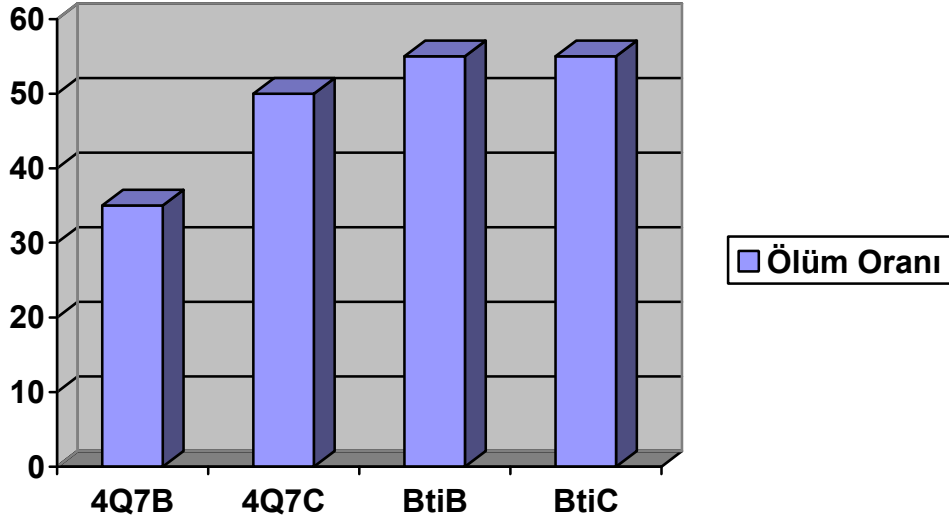
Şekil 23. Kontrol grubu ve bakteri gruplarına ait insektisidal aktivite (K: Kontrol, Xd1: *Serratia marcescens*, 4Q7: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, Bti: *B. thuringiensis israelensis* 5724, 4Q7C: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiC*, BtiC: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiC*).

Şekil 24’de *chiB* ve *chiC* genlerinin aktarıldığı *cry* geni taşımayan Bti ve *cry* geni taşıyan Btk suşlarının insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve *chiC* geninin aktarıldığı suşların %5-%20 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. BtkB %45 insektisidal aktivite gösterirken, BtkC %55 insektisidal aktivite göstermiştir.



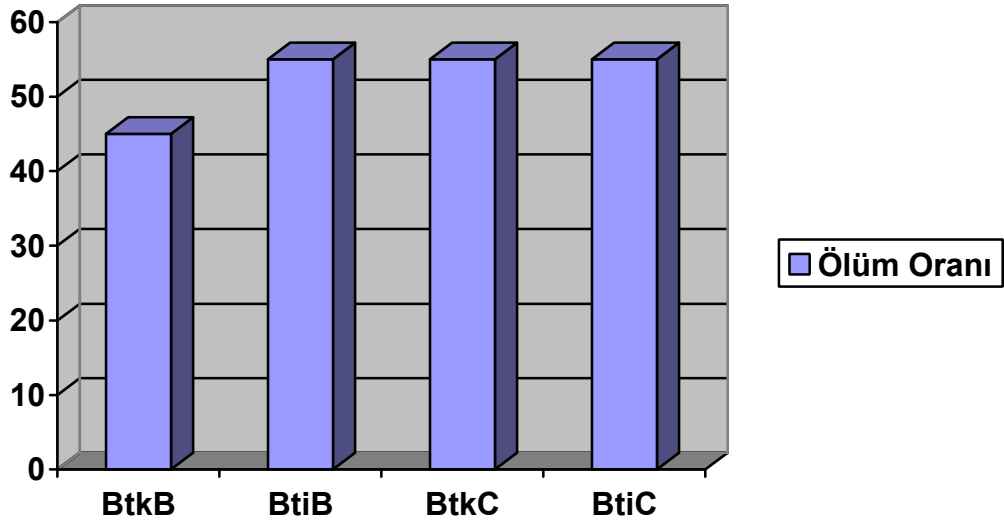
Şekil 24. *chiB* ve *chiC* geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi (4Q7B: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiB*, 4Q7C: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiC*, BtkB: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiB*, BtkC: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiC*).

Şekil 25’de *chiB* ve *chiC* genlerinin aktarıldığı *cry* geni taşımayan Bti ve *cry* geni taşıyan Bti suşlarının insektisidal aktiviteleri karşılaştırılmış ve *chiB* ve *chiC* geninin aktarıldığı *cry* geni taşıyan Bti suşlarının %5-%20 oranında daha fazla insektisidal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 25. *chiB* ve *chiC* geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi (4Q7B: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiB*, 4Q7C: *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 ve *chiC*, BtiB: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiB*, BtiC: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiC*).

Şekil 26. *chiB* ve *chiC* geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan farklı bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi karşılaştırılmış ve BtiB, BtkC ve BtiC'nin eşit oranda (%55), BtkB'nin ise %45 oranında insektisidal aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 26. *chiB* ve *chiC* geninin klonlandığı rekombinant plazmiti taşıyan farklı bakteri gruplarının insektisidal aktivitesi (BtkB: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiB*, BtiB: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiB*, BtkC: *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *chiC* ve BtiC: *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *chiC*).

4. TARTIŞMA

Bakteriler arasında *Streptomyces* (özellikle *S. griseus*), *Serratia*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Chitinophaga*, *Cytophaga* ve *Lasobacter* türleri potansiyel kitinaz üreticileridirler (Thamthiankul vd., 2001; Okay, 2005; Kuzu, 2008). Bakteriye kitinazlar en fazla *Serratia* cinsi bakterilerle çalışılmaktadır. Bu çalışmada da bir fındık zararlısı olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş *Serratia marcescens* bakterisi kullanıldı.

Entomopatojenik bir bakteri olan *S. marcescens* bakterisinin içerdiği kitinaz genlerinin tespit edilebilmesi için dejenerat primerler dizayn edilerek PCR ile genler çoğaltıldı ve pGEMT easy vektöre klonlandı. Elde edilen doğru klonlar DNA dizin analizine gönderilerek gelen sonuçlar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda *S. marcescens* izolatımızın *chiB* ve *chiC* genleri genlerine sahip olduğu belirlendi ve genlerin tam sırası aydınlatıldı. Elde edilen *chiB* ve *chiC* gen sıraları literatürde bulunan diğer kitinaz genleri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonuçlarına göre; *chiB*, gen bankasında ki *S. marcescens* (BJL200) *chiB* genine %96, *S. marcescens chiB* genine (X15208.1) %95, *S. marcescens chiB* (AB0159997.1) genine %95 ve *S. marcescens chiB* (GQ855218.1) genine ise %95 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. *chiC*'nin ise, gen bankasında ki *S. marcescens chiC* (AJ630582.1) genine %96, *S. marcescens (chiC)* (AB019238.1) genine %95, *S. marcescens chiC* (AF454464.1) genine %95 ve *S. marcescens chiC* (DQ990374.1) genine %95 oranında benzerlik göstermektedir.

Kolay çalışılabilir olması, daha önce yapılan çalışmalarda verimli sonuçlar alınması ve rahat elde edilebilmesi nedeniyle bu çalışmada klonlama için ara konak olarak *E. coli* kullanıldı. Yapılan bu çalışmada farklı konaklarda replike olabilmesi nedeniyle pHY300PLK shuttle vektörü kullanıldı. *S. marcescens* bakterisinin *chiB* ve *chiC* genleri tam olarak elde edildikten sonra pHY300PLK shuttle vektörüne klonlandı ve *E. coli* DH10 β 'da çoğaltıldı. Çoğaltılan rekombinant plazmit daha sonra *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine aktarıldı. Konaklar üzerinde yapılan plazmit stabilite testi sonucunda yüksek oranda plazmit kaybı gözlemlendi.

Okay ve arkadaşları (2008) *S. marcescens chiA* genini *B. thuringiensis*'e aktarmışlar ve kitinaz geninin *B. thuringiensis*'de orijinal konağından daha fazla ekspres edildiğini gözlemlemişlerdir. Literatürde yer alan başka bir çalışmada *Aeromonas hydrophila*'ya ve *B. circulans*'a ait kitinaz genleri *B. thuringiensis*'in çeşitli suşlarına aktarılmış ve *B. circulans*'a ait kitinaz genlerinin *A. hydrophila*'dan aktarılan kitinaz genlerine göre daha stabil olduğu

belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada *B. circulans*'a ait *kitinaz* genlerinin aktarıldığı *B. thuringiensis aizawai* suşunun *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvalarına karşı *A. hydrophila*'dan aktarılan *kitinaz* genlerini içeren aynı suştan ve *B. thuringiensis aizawai* suşundan daha toksik etki gösterdiğini rapor edilmiştir (Lertcanawanichakul vd., 2004).

Genlerin delesyonuna Bt suşlarında bulunan modifikasyon ve restriksiyon sisteminin ya da *Bacillus* spp.'deki spesifik endonükleaz bölgelerinin olabileceği tahmin edilmektedir. *B. subtilis* kromozomunun 45. pozisyonu böyle bir özelliğe sahiptir ve bu Bt suşlarında da olabilir (Ikawa vd., 1981). Gram negatif bakterilerden izole edilen *kitinaz* genlerinin stabilitesi ya da ekspresyonu gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus*'larda olumsuz yönde etkilenebilir (Sudha vd., 1999). Örneğin; *B. licheniformis*'den izole edilen *kitinaz* geni Bt'lerde muhafaza edilirken, *A. hydrophila*'dan veya *P. maltophilia*'dan izole edilen *kitinaz* genleri Bt'lerde muhafaza edilememiş ve genlerin ekspresyonu düşük oranda olmuştur (Wiwat vd., 1996).

Literatürde, bakterilerde heterolog proteinlerin birikiminin konak için toksik etki gösterebileceği ve plazmit kaybıyla sonuçlanabileceği belirtilmiştir (Mari vd., 1999). Ayrıca rekombinant yapıların kararlılığı sıcaklıktan, besiyerinin pH'sından, havalandırma koşullarından besiyerinin kompozisyonundan ve seyreltme oranlarından etkilenebilir (Brigidi vd., 1996).

Bizim çalışmamızda Bt türlerine ek olarak *E. coli* DH10 β suşunda da plazmit stabilite testi gerçekleştirilmiştir. *E. coli* DH10 β gram negatif bir bakteri olmasına rağmen *kitinaz B* ve *C* genlerinin klonlandığı rekombinant plazmit bu konakta da muhafaza edilememişir. Ayrıca Bt'nin *Cry* içermeyen suşu olan *B. thuringiensis israelensis* 4Q7 suşu *Cry* içerenlere göre daha çabuk rekombinant plazmiti kaybetmiştir.

Genetik mühendisliği uygulamalarında *B. subtilis* klonlama için uygun bir konaktır. Ancak *B. subtilis* kullanımının dezavantajı plazmit kararsızlığının bulunmasıdır. Organizmanın alt kültürlerinin çok sayıda nakledilmesi sırasında plazmit replikasyonunun sürmesinde zorluklar olabilmektedir. Ayrıca yabancı DNA molekülü *Bacillus subtilis* içinde iyi korunmamakta ve böylece klonlanan DNA sıklıkla kaybolmaktadır (Madigan-Martinko 2006).

Çalışmamızda *kitinaz* genlerinin aktarıldığı *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 suşlarının *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Belirtilen bu suşların rekombinant plazmit içermeyen Bt suşlarına ve *kitinaz* kaynağımız olan *S. marcescens*'e göre *G. mellonella* larvaları üzerinde daha yüksek

bir ölüm oranı (%10-%50) gerçekleştirdikleri gözlemlenmiştir. Bilindiği üzere Cry 4 insektisidal kristal proteinlerini taşıyan *B. thuringiensis israelensis* Diptera grubu böcekler üzerinde etkilidir. Ancak çalışmamızda *chiB* ve *chiC* geninin aktarıldığı *B. thuringiensis israelensis* suşunun bir Lepidoptera olan *G. mellonella*'nın üzerindeki insektisidal aktivitesi araştırılmış ve *chiB* ve *chiC* geninin aktarıldığı *B. thuringiensis kurstaki* uygulaması ile hemen hemen eşit bir ölüm oranı gözlemlenmiştir. Ayrıca *chiC*'yi içeren suşların *B*'yi içeren suşlara göre daha etkili olduğu saptanmıştır.

Bakteriyal kitinazların, Cry proteinleriyle birlikte kullanıldıklarında potansiyel insektisit olabilecekleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Regev vd., 1996; Barboza-Corona vd., 1999; Barboza-Corona vd., 2003). Kitinolitik enzimler ve mikrobiyal insektisidler arasındaki sinergistik etki 1970'li yıllardan beri bilinmektedir. Bakteriyal kitinolitik enzimler *B. thuringiensis* bakterisinin ve AcMNPV'nin aktivitesini güçlendirmek için kullanılmıştır (Kramer, 1997). *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera) zararlısı, kitinaz-Bt karışımıyla muamele edildiğinde enzimle ya da bakteriyle ayrı ayrı muamele edilmesinden daha hızlı bir şekilde ölmüştür (Smirnoff, 1974; Lysenko, 1976; Morris, 1976).

S. marcescens bakterisine ait olan *chiA* ve *chiB* genleri *Pseudomonas fluorescens* ve *E. coli* gibi diğer bakteri türlerine aktarılmış ve fungal patojenleri kontrol edebilme kabiliyetleri artırılmış (Sundheim vd., 1988; Koby vd., 1994; Downing vd., 2000) ve yeni biyolojik ajanlar oluşturulmuştur (Shapira vd., 1989; Oppenheim vd., 1992).

Downing'in 2000 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada rekombinant tekniklerle kitinaz ve cry toksinlerini ekspres edecek şekilde inşa edilmiş iki farklı *P. fluorescens* suşunun *Eldana saccharina* larvaları ile beslendiğinde bu böceğin çoğalmasının sinergistik olarak sınırlandırıldığı bulunmuştur. Kitinazın böcek bağırsağındaki kitin içeren peritrofik membranlarda delik oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Böylece *Bt.* insektisidal toksininin orta bağırsak membranlarına ulaşmasını artırmasının yanı sıra membran lizisine sebep olmakta ve böceğin ölümüne yol açmaktadır. Bu çalışma kitinazın böcek bağırsağındaki peritrofik membranı yok ederek patojeniteyi artırmadaki başarısını açıkça göstermektedir.

Bt preparatlarına kitinaz eklenmesiyle ladin tomurcuk böceği (*Choristoneura fumiferana*) ve lahana yaprak güvesine (*Plutella xylostella*) karşı insektisidal etkilerinin arttığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak böcek kontrolünde kitinazların, Bt Cry toksinlerinin gücünü ve etkisini artırdığı bulunmuştur. Bt preparatlarındaki kitinaz enzimi ladin tomurcuk böceğinde septiseminin gelişmesini ve ölüm oranının artmasını hızlandırmıştır (Smirnoff, 1974).

Literatürdeki bir başka çalışmadaki bulgular *Spodoptera littoralis* orta bağırsağından izole edilen *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*'a ek olarak kitinolitik bakterilerin 2. instardaki larvaların ölüm oranını %12 ile %100 oranında artırdığını göstermiştir (Sneh vd., 1983).

Sonuç olarak kutikula ve peritrofik membranın yapısında bulunan kitinin kitinaz enzimleri tarafından parçalanması, böceğin beslenmesini ve korunmasını düşürmekte ve böylece böceğin zayıf duruma gelmesine neden olmaktadır. Cry toksinlerinin ve kitinazların birlikte kullanılmaları durumunda larval ortabağırsaktaki endokitinaz seviyesinin artmasıyla peritrofik membranda aşınmalar meydana gelir ve delta-endotoksin moleküllerinin spesifik reseptölerinin bulunduğu epitelyal membrana girebilme seviyesi artar. Bunun sonucunda larvasidal etki yükselir (Regev vd., 1996).

5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda *Serratia marcescens* bakterisine ait *chiB* ve *chiC* genlerinin *Bacillus thuringiensis* türlerinde ekspresyonu ve rekombinant *B. thuringiensis* türlerinin zararlı böceklerle karşı insektisidal aktivitelerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

S. marcescens bakterisine ait *chiB* ve *chiC* genleri, dizayn edilen dejenerat primerler yardımıyla çoğaltıldı ve pGEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. *chiB* ve *chiC* genlerinin promotor bölgeleri de dahil olmak üzere genlerin aşağı ve yukarı bölgelerini içerecek şekilde sırasıyla 1689 ve 1844 bp büyüklüğünde oldukları belirlendi.

Nükleotid sırasının mevcut genlerle karşılaştırılması sonucunda *chiB*, gen bankasındaki *S. marcescens* (BJL200) *chiB* genine %96, *S. marcescens chiB* genine (X15208.1) %95 oranında ve *chiC* geninin de, gen bankasındaki *S. marcescens chiC* (AJ630582.1) genine %96, *S. marcescens (chiC)* (AB019238.1) genine %95 oranında benzer olduğu tespit edildi.

chiB ve *chiC* klonlandığı pHY300PLK shuttle vektöründen çok sayıda elde edebilmek için *E. coli* DH10 β hüresine atıldı. Daha sonra çok sayıda elde edilen rekombinant plazmit *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerine atıldı.

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 ve *E. coli* DH10 β hücrelerine plazmit stabilite testi uygulandı. Test sonucunda konak hücrelerimizin rekombinant plazmiti muhafaza edemedikleri tespit edildi.

Rekombinant plazmit içeren *B. thuringiensis israelensis* 4Q7, *B. thuringiensis israelensis* 5724 ve *B. thuringiensis kurstaki* 4D1 hücrelerinin *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larvaları üzerindeki insektisidal aktivitesi araştırıldı. Rekombinant plazmiti taşıyan Bt suşlarının, taşımayan suşlara ve kitinaz kaynağımız olan *S. marcescens* bakterisine göre %10-%50 oranında daha yüksek bir insektisidal aktivite gösterdikleri tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Ormanlarımızın ve tarım bitkilerimizin sağlığını etkileyen çeşitli faktörler arasında böceklerin en başta geldiği kabul edilmektedir. Sarf edilen tüm çabalara rağmen orman ağaçlarımızın ve tarım bitkilerimizin yaprak, çiçek, tomurcuk, meyve, gövde ve kökleri sürekli olarak böcekler tarafından büyük zarar görmektedir.

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

Yıllardan beri entomopatojenik bir bakteri olan *Serratia marcescens* bakterisinin ve bu bakteride bulunan *kitinaz* genlerinin üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve hala daha yapılmaktadır. Bunun yanı sıra kitinolitik enzimlerin ve Cry gibi insektisidal proteinlerin birlikte kullanıldıklarında potansiyel insektisid olabilecekleri tespit edilmiştir. Kitinazların ve Cry proteinlerinin kombine uygulamalarını kapsayan araştırmalar da karşılaşılan en büyük problemlerden biri, *kitinaz* genini içeren plazmitlerin Bt tarafından muhafaza edilememesidir. Bu nokta da istediğimiz ürünün yüksek düzeyde ekspres edilmesi için replikasyon orijini konağa ait olan plazmitler oluşturulabilir (Lertcanawanichakul vd., 2003) ya da kitinaz geni konağın genomuna homolog rekombinasyonla entegre edilebilir. Bunun yanı sıra kitinaz geni kendi promotörü altında değil de konağın bir promotörü altında ekspres edilebilir (Lertcanawanichakul vd., 2003).

Gerek böcek dirençliliğinin önlenmesi, gerekse konak spektrumunun genişletilmesi açısından kitinaz ve Cry proteinlerinin ortak uygulamaları üzerine yapılan araştırmalar mikrobiyal mücadele için önemli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Adang, M. J., 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: Structure, action, and utilization. *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*. K. Maramorosch (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1, 3-24
- Aronson A. I., Beckman, W. ve Dunn, P., 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
- Barboza-Corona, J. E., Contreras, J. C., Velazquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gomez-Ramirez, M., Cruz-Camarillo, R. ve Ibarra, J. E., 1999. Selection of strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 21, 1125–1129.
- Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzocco, E., Velazquez-Robledo, R., Salcedo-Hernandez, R., Bautista, M., Jimenez, B. ve Ibarra, J. E., 2003. Cloning, sequencing, and Expression of the chitinases gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1023–1029.
- Beegle, C. C. ve Yamamoto T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* 124, 587-616.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. ve Gupta, K. R., 2007. Bacterial Chitinase: Properties and Potentiel. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 21-28.
- Bobrovski, V. L., Pasquali, G., Bodanese-Zanetini, M. H., Pinto, L. M. N., ve Fiuza, L. M., 2002. Characterization of two *B. thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biol. Cont.*, 25, 129-135.
- Boller, T., 1986. Chitinase: A defense of higher plants against pathogens. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 223–231.
- Bone, E. J. ve Ellar, D. J., 1989. Transformation of thuringiensis by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 58, 171-177.
- Bonning, B.C. ve Hammock, B. D., 1996. Development of recombinant Baculoviruses for insect control, *Annual. Rev. Entomol.*, 41, 191-210.
- Botha, A. M., Nagel, M. A. C., Van der Westhuizen A. J. ve Botha, F. C., 1998. Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Bot Bull Acad Sin.*, 39, 99-106.

- Brigidi P., Gonzalez-Vara R. A., Rossi M. ve Matteuzzi D., 1996. Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus stearothermophilus* NUB3621 in nonselective medium *Biotech Bioeng.*, 53, 340–344.
- Brurberg, M. B., Eijsink V. G. ve Nes I. F., 1994. Characterization of a *chitinase* gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* B JL200 and one-step purification of the gene product. *FEMS Microbiol Letters*, 124, 3, 399-404.
- Brurberg, M. B., Eijsink V. G., Haandrikman A. J., Venema G. ve Nes I. F., 1995. Chitinase B from *Serratia marcescens* B JL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiology*, 141,1, 123-131.
- Brurberg, M. B., Nes I. F. ve Eijsink V. G., 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142, 7, 1581–1589.
- Brurberg, M. B., Synstad, B., Klemsdal, S. S., van Aalten, D. M. F., Sundheim, L. ve Eijsink, V. G. H., 2000. Chitinases from *Serratia marcescens*. *Rec Res Dev Microbiology*, 5, 187–204.
- Burges, H. D. ve Hussey, N.W., 1971. *Microbial Control of Insects and Mites*, Academic Press, London, New York, 861.
- Chernin, L. S., De La Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vogias, C. E., Oppenheim, A. B. ve Chet, I., 1997. Molecular Cloning, Structural Analysis and Expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*, *Appl. Environ. Microbiology*, 63, 834-839.
- Chet, I. ve Inbar, J., 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem Biotechnology*, 48, 37-43.
- Cohen-Kupiec, R. ve Chet, I., 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnology*, 9, 3, 270–277.
- Da Silva Amorim, R. V., de Souza, W., Fukushima, K. ve de Campos-Takaki, G. M., 2001. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Braz J Microbiology*, 32, 20-23.
- De-Maagd, D. R. A., Bravo, A. ve Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.*, 4, 193–199.
- Demir, A. ve Seventekin, N., 2009. Kitin, kitosan ve Genel Kullanım Alanları. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3, 92-103.

- Demirbağ, Z., Beldüz, A. O. ve Demir, İ., 1998. Baculovirüsün ekspresyon vektörü olarak biyoteknolojide kullanılması, *T. J. of Biology*, 22, 249-262.
- Demirbağ, Z., Nalçacıoğlu, R., Katı, H., Demir, İ., Sezen, K. ve Ertürk, Ö., 2008. Entomopatojenler ve Biyolojik Mücadele, 145.
- Ding, X., Luo, Z., Xia, L., Gao, B., Sun, Y. ve Zhang, Y., 2008. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant *cry1Ac* gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.*, 56, 442-447.
- Downing, K. J., Leslie G. ve J. A. Thomson., 2000. Biocontrol of the sugarcane borer by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugar-cane associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiology*, 66, 2804-2810.
- Feitelson, J. S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In L. Kim (ed.), *Advanced engineered pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 63-71.
- Feng, Q., Arif, B. M., Palli, S. R., Sohi, S. S. ve Retnakaran, A., 2001. Molecular modificataion of Baculoviruses for the control of forest insect pests, *Adv. Vir. Res.*, 57, 263-290.
- Fuchs, R. L., Mcpherson, S. A. ve Drahos, D. J., 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl Environ Microbiology*, 51, 504-509.
- Gill, S. S., Cowles E. A. ve Pietranto, P. V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins..., *Annu. Rev. Entomol.*, 37, 615-636.
- Gooday, G. W., 1986. Chitinase activities in mammals, fungi and bacteria. In: *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press, New York, 241-261.
- Hoell, I. A., Klemsdal, S. S., Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J. ve Eijsink, V. G. H., 2005. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. *BBA-Proteins&Proteomics* 1748, 2, 180-190.
- Höfte, H. ve Whiteley, H. R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53, 242-255.
- Ikawa S., Shibata T., Matsumoto K. ve Iijima T., 1981. Chromosomal loci of genes controlling site-specific restriction endonucleases of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 183:1-6.
- Inglis, G. D., Lawrence, A. M. ve Davis, F. M., 2000. Pathogens associated with southwestern corn borers and southern corn stalk borers (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol.*, 93, 6, 1619-1626.

- Inglis, G. D. ve Lawrence, A. M., 2001. Effects of *Serratia marcescens* on the F1 generation of laboratory-reared *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 94, 362-366.
- Joung K. B. ve Côté J. C., 2000. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Horticultural Research and Development Centre (Canada) Technical Bulletin No. 29.
- Kaur, S., 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 6, 781-793.
- Klemsdal, S. S. ve Tronsmo, A., 2006. Genetic Manipulation For Improvement of Microbial Biocontrol Agents. In, "Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops".
- Koby, S., Schickler, H., Chet, I. ve Oppenheim, A. B., 1994. The chitinase encoding Tn7-based *chiA* gene endows *Pseudomonas fluorescens* with the capacity to control plant pathogens in soil. *Gene*, 147, 81-83.
- Kramer, K. J. ve Muthukrishnan, S., 1997. Insect Chitinases: Molecular Biology And Potential Use As Biopesticides, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27, 11, 887-900.
- Krishna Kishore, G., Pande, S. ve Podile, A. R., 2005. Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria, *Biol. Cont.*, 95, 1157-1165.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1921-1971.
- Kuzu, S. B., 2008. Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsn, Ib. ve Mundy, J., 1995. Biochemical and molecular characterisation three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.*, 266, 1564-1573.
- Lereclus, D., Bougouin, C., Lecadet, M. M., Klier, A. ve Rapoport, G., 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal deltaendotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Regulation of Prokaryotic Development (Edited by I. Smith, R.A. Slepecky and P. Setlow). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 255-276.

- Lertcanawanichakul, M., Wiwat, C., Bhumiratana, A. ve Dean, D. H. 2004. Expression of chitinase-encoding genes in *B. Thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Curr. Microbiol.* 48, 175-181.
- Lonhienne, T., Mavromatis, K., Vorgias, C. E., Buchon, L., Gerday, C. ve Bouriotis, V., 2001. Cloning, sequences, and characterization of two *chitinase* genes from the antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: isolation and partial characterization of the enzymes. *J. Bacteriol.* 183, 1773-1779.
- Lysenko, O., 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 27, 385–386.
- Lysyk, T. J., Kalischuk-Tymensen, L. D. ve Selinger, L. B., 2002. Comparison of Selected Growth Media for Culturing *Serratia marcescens*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa* as Pathogens of Adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera:Muscidae). *J. Med. Entomol.*, 39, 1, 89-98.
- Madigan, T. M., ve Martinko, M. J., Brock Biology of Microorganisms, Eleventh Edition, 972, Pearson Education Inc. Publishing as Prentice Hall, USA, 2006.
- Mari Y. M., Espinoza A. E. S., Ubieta R., Batista O. F. ve Fernandez M. T., 1999. Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 258, 29–31.
- Martin, P. A. W., 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *Am. Entomol.*, 40, 1, 85-90.
- Morris O. N., 1976. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis*-chitinase combinations in spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) control. *Can. Entomol.*, 108, 3225–3233.
- Muzzarelli, R. A. A., 1977. Chitin. Pergamon Press, 163.
- Nawani, N. N. ve Kpandis B. P., 2001. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *J Appl Microbiol.*, 90, 5, 803–808.
- Okay, S., 2005. Kitinaz A geninin (*chiA*) *Serratia marcescens* Bn10'dan klonlanması ve Coleoptera-spesifik *Bacillus thuringiensis*'te ifade edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, ODTU.

- Okay, S., Tefon, B. E., Özkan M. ve Özcengiz G., 2008. Expression of *chitinase A (chiA)* gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. J Appl. Microbiol., 104, 161–170.
- Oppenheim, A. B. ve Chet, I., 1992. Cloned chitinases in fungal plant pathogen control strategies. *Trends in Biotechnology*. 10, 392-394.
- Ordentlich, A., Elad, Y. ve Chet, I., 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 78, 84–88.
- Pardo-Lopez, L., Munoz-Garay, C., Porta, H., Rodriguez-Almazan, C., Soberon, M. ve Bravo, A., 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *NIH Public Access.*, 30, 3, 589-595.
- Poinar, G.O., 1978. Identification of The Groups of Insect Pathogens, Plenum Press, New York.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielson-LeRoux, C., Lereclus, D. ve Crickmore, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18, 5, 189-194.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J. ve Zilberstein, A., 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3581–3586.
- Rojas-Avelizapa, Crus-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodriguesvazquez, R. ve Ibarra, J. E. 1999. Selection and characterisation of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis* able to grow in shrimp waste media. *World J. Microbiol. and Biothechnol.*, 15, 299-308.
- Roberts, W. K. ve Selitrennikoff, C. P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J Gen Microbiol., 134, 169-176.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R. ve Barboza-Corona, J. E., 2005. Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. Biotechnol Lett., 27, 649-653.
- Sakuda S., Nishinato Y., Ohi M., Watanabe M., Takayama S., Isogai A. ve Yamada Y. 1990. Effects of demethylallosamidin, a potent yeast chitinase inhibitor, on the cell division of yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1333-1335.
- Sampson, M. N. ve Gooday, ve G. W., 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiology, 144, 2189–2194.

- 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.*, 62, 3, 775–806.
- Shapira, R., Ordentlich, A., Chet, I. ve Oppenheim, A. B., 1989. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology* 79, 1246-1249.
- Shen, Z. ve Jacobs-Lorena, M., 1997. Characterization of a novel gut-specific *chitinase* gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem.*, 272, 46, 28895–28900.
- Sitrit, Y., Vorgias, C. E., Chet, I. ve Oppenheim, A. B., 1995. Cloning and primary structure of the *chiA* gene from *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.*, 177, 4187-4189.
- Smirnoff, W. A., 1974. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce bud worm. *J. Invertebr. Pathol.*, 24, 344–348.
- Sneh B., Schuster S. ve Gross S., 1983. Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and UV-protectant. *Z Ang Entomol.*, 96, 77–83.
- Someya, N., Nakajima, M., Watanabe, K., Hibi, T. ve Akutsu, K., 2005. Potential of *Serratia marcescens* strain b2 for biological control of rice sheath blight. *Biocontrol Science Technol.*, 15, 1, 105–109.
- Souza, R. F., Gomes, R. C., Coelho, R. R. R., Alviano, C. S. ve Soares, R. M. A., 2003. Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *FEMS Microbiol Lett.*, 222, 45-50.
- Sudha S. N., Jayakumar, R. ve Sekar V., 1999. Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Curr. Microbiol.*, 38, 163–167.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R. R., Svasti, J. ve Fothergill-Gilmore, L. A., 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 424, 171-180.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J. ve Prinz, H., 2005. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of *chitinase A* from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.*, 272, 3376-3386.

- Sundheim, L., Polawsky, A. R. ve Ellingboe, A. H., 1988. Molecular cloning of two chitinases genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 33, 481–491.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. ve Watanabe, T., 1999. The third *chitinase* gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relation ship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J*, 343: 587-596.
- Suzuki, K., Uchiyama, T., Suzuki, M., Nikaidou, N., Regue, M. ve Watanabe, T., 2001. LysR-type transcriptional regulator *chiR* is essential for production of allchitinases and a chitin-binding protein, CBP21, in *Serratia marcescens* 2170. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65, 2, 338-347.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S. ve Panbangred, W., 2001. Chitinas from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistanii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 3, 4, 395-401.
- Uchiyama, T., Kaneko, R., Yamaguchi, J., Inoue, A., Yanagida, T., Nikaidou, N., Regue M. ve Watanabe, T., 2003. Uptake of N, N'-Diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] via the phosphotransferase system is essential for chitinase production by *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriol.*, 185, 6, 1776-1782.
- URL-1, <http://img170.imageshack.us/i/chitinfk0.jpg/>
- URL-2, (<http://www.sunysccc.edu/academic/mst/microbes/23smarc.htm>)
- URL-3, <http://dalwoo.com/chitosan/whatischitosan.html>
- Usui, T., Matsui, H. ve Isobe, K., 1990. Enzymatic synthesis of useful chito oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydr. Res.*, 203, 65–77.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Rao, F. V., Peter, M. G., Synstad, B., van Aalten, D. M. F. ve Eijsink, V. G. H., 2004. Structure of the D142N mutant of the family 18 chitinase ChiB from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin. *BBA - Proteins&Proteomics*, 1696, 103-111.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M. F., Synstad, B. ve Eijsink, V. G. H., 2005. The non-catalytic chitin-binding protein Cbp21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem*, 280, 31, 28492-28497.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. ve Regue, M., 1997. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriol.*, 179, 7111-7117.

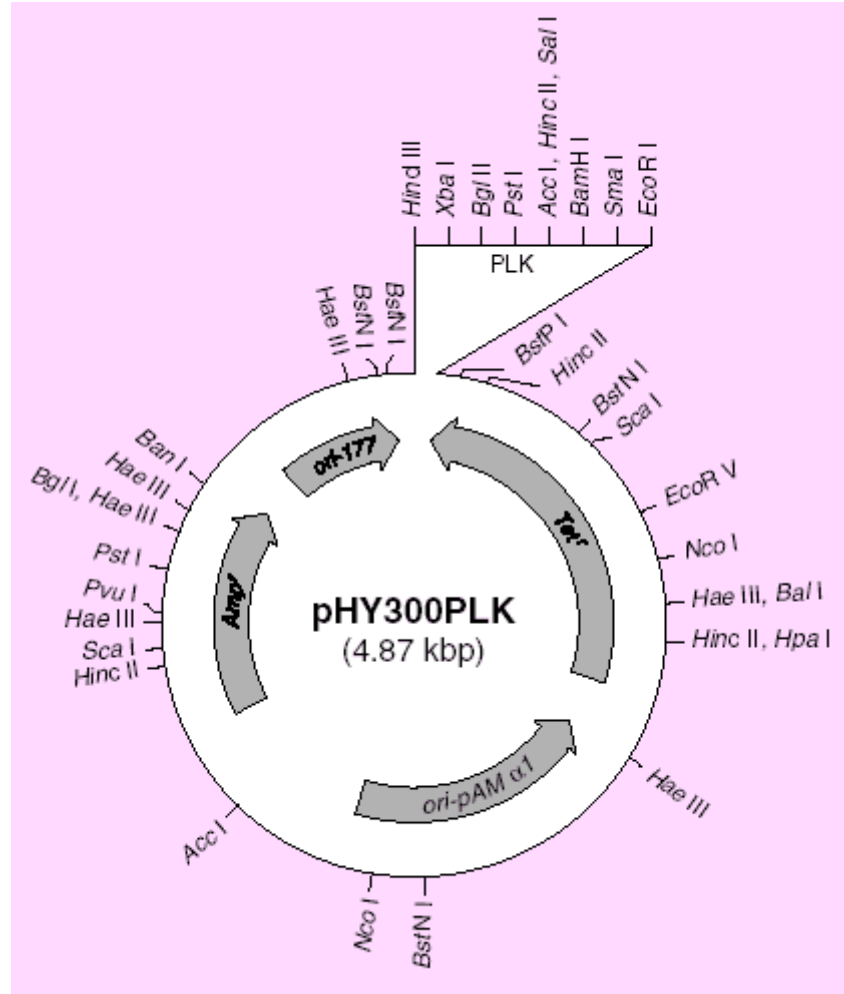
- Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng C. Y. ve Li1, Y. K., 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol Appl Biochem 35, 213–219.
- Wiwat, C., Lertcanawanichakul, M., Siwayapram, P., Pantuwatana, S. ve Bhumiratana, A., 1996. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas hydrophila* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene*, 179, 119–126.
- Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A. ve Fujii, T., 1984. Rapid method of converting fungal cells into protoplast with a high regeneration frequency. *Exp. Mycol.*, 8, 386–390.

8. EKLER

```
GGGAATTCGTGATTTATTTCTGACTGTTATTTCCGCGAAAAATAAACATTAATGGCAACGGGAAATATTTCC
CCACCGAAAAACATCCACTCTGGAGAAATGCCATGTCCACACGTAAAGCCGTTATTGGGTATTATTTTATT
CCGACCAACCAAATCAATAATTACACCGAGACCGATACGTCTGTCGTGCCGTTCCCGGTTTCCAACATCAC
GCCGGCCAAAGCCAAACAGCTGACGCACATTAACCTTCTCGTTCCCTGGATATCAACAGCAATCTGGAATGC
GCCTGGGATCCGGCCACCAACGACGCCAAGGCGCGCGATGTGGTCAACCGTCTGACCGCGCTCAAAGCG
CACAACCCAGCCTGCGCATCATGTTCTCCATCGGCGGCTGGTACTACTCCAACGATCTGGGTGTGTGCGCA
CGCCAACTACGTCAACGCGGTGAAAACCCCGGCGTCGCGCGCCAAGTTCGCCAATCCTGCGTGCATC
ATGAAGGATTACGGCTTCGACGGCGTGGACATCGACTGGGAGTACCCGCAAGCCGCGGAAGTGGACGG
TTTCATCGCCGCGCTGCAGGAGATCCGCACCTGCTGAACCAGCAAACCGTCGCCGACGGCCGAGGCG
TTGCCGTACCAGTTGACCATCGCCGGCGCCGGCGGCGCCTTCTTCTGTCGCGCTATTACAGCAAGCTGGC
GCAGATCGTCGCGCCGCTCGATTACATCAACCTCATGACCTACGATCTGGCCGGCCCCTGGGAGAAAGTA
ACCAACCACCAGGCGGCGCTGTTCCGGCGATGCGGCCGGGCCGACCTTCTACAATGCGCTGCGCGAAGCC
AACCTGGGCTGGAGCTGGGAAGAGCTGACCCGCGCCTTCCCCAGCCGTTACGCCTGACGGTTCGACGCC
GCGGTGCAGCAACACCTGATGATGGAAGGCGTGCCGAGCGCCAAAATCGTGATGGGCGTGCCCTTCTAC
GGCCGCGCCTTCAAGGGCGTCAGCGGCGCAACGGCGGGCAATACAGCAGCCACAGCACGCCGGGCGA
AGATCCGTACCCGAACACCGATTACTGGCTGGTGGGCTGCGAAGAGTGCCTGCGCGACAAGGATCCGCG
CATCGCCTCCTATCGCCAACTGGAGCAGATGCTGCTGGGCAACTACGGCTATCAGCGGCTGTGGAACGAC
AAGACCAAACGCCTTACCTGTATCATGCGCAGAAAGGGCTGTTTCGTCACCTATGACGATGCCGAGAGCT
TCAAATACAAAGCGAAATACATCAAGCAGCAGCAGTTGGGCGGCGTGATGTTCTGGCATCTGGGGCAAG
ACAACCGCAACGGCGATCTGCTGGCCTCGCTGGATCGCTATTTCAACGCCGCGGACTACGACGACAGCCA
GCTGGATATGGGCACCGGGCTGCGCTACACCGGCGTCGGCCCCGGCAACCTGCCGATCATGACCGCGCC
GGCTTATGTGCCGGGCACCACTTACGCGCAGGGCGCGCTGGTGTCTATCAGGGTTACGTCTGGCAAACC
AAATGGGGTTACATCACCTCGGCGCCCGGTTCTGACGGCGCCTGGCTGAAGGTGGGCCGCGTGGCGTAA
GCCGTAAAAAAACCCCGTAGCCGAATGCTGCGGGGTTTTATTGAGTTAACCGTTTGATTTTCGCGTCCCT
TCGTCTC AAGCTTGG
```

Ek Şekil 1. *Serratia marcescens* bakterisine ait *chiB* geninin DNA sırası (1689 bp).

GGGGATCCCCCTTCCGTCGCCGATATCACCATCTTCTGATGCGGCCATGGCGGCCGCCCGGCC
GCCATTATTTCTTCTCCCTCAGCGTCAGTTTGAATTTAATTCGTTTCATGGCCGTAAAAGGTTT
CAGCCTGCCTGCGTTAAAAATCCTCATTATAACGTTACGCCCCGCCAATAGCTGATATTGCCG
GCGAGCGGAAAACCCCTTACCCCTAATTAATGAGGCTACC**ATG**AGCACAAATAACACGATTAA
TGCCGTGCGCCCGATGACGCGGCCATTATGCCGTCTATCGCCAATAAAAAGATCCTGATGG
GTTTCTGGCACAACCTGGGCCGCCGGCGCCAGTGACGGCTATCAGCAGGGCCAGTTCACCAAT
ATGAACCTGACCGACATTCCCGCCGAGTACAACGTGGTGGCCGTCGCCTTTATGAAAGGCCA
GGGCATCCCACCTTCAAGCCTTACAACCTGTCCGATGCCGAGTTCGCCGCCAGGTGGGCG
TGCTGAACAGCCAGGGCCGCGCGGTGCTGATCTCCCTCGGCCGCGCAGACGCGCATATCGA
GCTGAAAACCGGCGACGAAGACAAGCTGAAAGACGAGATTATTCGCCTGGTGGAAAGTCTAT
GGCTTCGACGGCCTGGATATCGATCTGGAACAGGGCGCGATCGGCCGCCCAATAATAAAA
CCGTCTTGCCTGCGGCGCTGAAAAAAGTAAAAGACCATTACGCCGCCAGGGGAAAAAATTT
ATTATCAGCATGGCGCCGGAATTCCTGATTTACGCACCAACGGCACCTACCTGGATTATATT
AACGCCCTCGAAGGCTATTACGACTTTATCGCGCCGCAATATTATAACCAGGGCGGCGACGG
TATTTGGGTGGATGAACTCAATGCCTGGATCACGCAGAATAACGACGCCATGAAAGAGGACT
TCCTCTACTACCTGACGGAAAGCCTGGTTACCGGCACCCGCGGCTATGCGAAGATCCCAGCG
GCAAAATTCGTCATCGGCCTGCCGAGCAACAACGATGCCGCCGCCACCGGCTACGTGGTCAA
CAAACAGGCGGTGTATAACGCTTTCTCGCTCTCGACGCCAAAAACCTGTCGATCAAGGGCC
TGATGACCTGGTCAATCAACTGGGATAACGGCAAGAGCAAAGCCGGCGTTCGCTACAATTG
GGAGTTCAAACCCGCTATGCGCCGCTGATTACGGGCGGCGTCACCCCGCCGCCGGGAAAG
CCTAATGCGCCGACGGCGCTGACGGTCGCCGAGCTGGGCGCCACCTCGCTGAAACTGAGCT
GGGCCGCCGCCACCGGCGCCTACCGATCGCCAGCTACACCGTCTACCGCAACGGCAACCCG
ATCGGCCAAACCGCCGGTCTGTGCTGGCCGACAGCGGTCTGACGCCGGCAACCCAGTACAG
CTACTTCGTTACCGCGACCGACACCCCTGGGCAATACCTCCCTGCCGAGCAGCGCGCTGGCGG
TCAAACCGCCAATGACGGTACGCCGCCGATCCGGGCGCGCCCGAGTGGCAGAACAACCA
CAGCTACAAAGCCGGCGACGTCGTGAGTTATAAAGGAAGAATAACACCTGTATTCAGGCGC
ACACCTCCAATGCCGGCTGGACGCCGGATGCCGCGTTCACCCTCTGGCAGCTCATCGCT**AAT**
CGCTAATCGATTGCCGGTCAAACCTGGCCGGCAATCCCGCCATCACGCTAAAAATTGCATAATC
GATAATTTTTACGCCGATAACTGAAAATCCGTTAAAAACCTCAGCTACGCAAACAACCTATTT
TCAGCGCATGGCTAAAACGCTTGCATCTCCCGCAGCAAGCTTGG



Ek Şekil 3. pPHY300PLK shuttle vektörünün restriksiyon haritası.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Bayburt'da doğdu. İlkokulu 1978–1983 yılları arasında Trabzon 27 Mayıs İlkokulu'nda, ortaokulu 1983–1986 yılları arasında Bayburt Ortaokulu'nda ve liseyi 1986–1989 Bayburt Lisesi'nde tamamladı. 1991-1992 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 1995 yılında bu bölümden mezun oldu. 2008-2009 Eğitim–Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk annesidir.