

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI ENTOMOPATOJENİK BAKTERİLERİN VEJETATİF İNSEKTİSİDAL
PROTEİN (*vip*) GEN İÇERİKLERİNİN VE İNSEKTİSİDAL ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysun ADIGÜZEL

HAZİRAN 2017
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Bazı Entomopatojenik Bakterilerin Vejetatif İnsektisidal Protein (*vip*) Gen İçeriklerinin ve İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi” adlı 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 Prof. Dr. Kazım SEZEN’e, laboratuvarında maddi ve manevi imkânlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan Prof. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU, Prof. Dr. İsmail DEMİR, Yrd. Doç. Dr. Hacer MURATOĞLU’na ve tez jüri üyelerinden Prof. Dr. Hatice KATI’ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Aydın YEŞİLYURT’a, Dr. Mehtap DANIŞMAZOĞLU’na, Arş. Gör. Aşkın TEKİN’e, Dr. Cihan İNAN’a, çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmek üzere laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Yrd. Doç. Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, biyotest çalışmalarımında kullandığım *Spodoptera littoralis*’in temininde destek olan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Doç. Dr. Umut TOPRAK ve Gözde GÜNEY’e, laboratuvarında birlikte çalıştığım ve sadece bununla kalmayıp her zaman bana maddi manevi destek olan, lisansüstü hayatımda yanımda olmalarından büyük keyif aldığım Seda BİRYOL, Çağla AKSU ve Arş. Gör. Gözde Büşra ELÇİN’e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK-BİDEB’e (2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı) teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim için geldiğim bu şehrin bana kazandırmış olduğu ve en zor zamanlarımda yanımda olan Yasin YILMAZ’a, geri kalan hayatım boyunca da yanımda olacak olan arkadaşlarım Merve BEKTAŞ, Didem ÇETİNDİR ERDOĞAN, Büşra DEMİRKAYA’ya, daima bana güvenen, her türlü kararımdaya arkamda duran ve maddi manevi beni destekleyen canım anneme ve kardeşime, uzakta olsa da varlığını hep yanımda hissettiğim babama sonsuz teşekkürler...

Aysun ADIGÜZEL
Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Entomopatojenik Bakterilerin Vejetatif İnsektisidal Protein (*vip*) Gen İçeriklerinin ve İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kazım SEZEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda 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. 19/06/2017

Aysun ADIGÜZEL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Böcek Populasyonlarının <i>Bacillus thuringiensis</i> Toksinlerine Karşı Dirençliliği	5
1.3. Vip Toksinleri.....	7
1.3.1. İkili Vip1/Vip2 Toksini.....	9
1.3.1.1. Vip1/Vip2 Toksininin Protein Yapısı ve Fonksiyonu	10
1.3.1.2. Vip1/Vip2 Toksininin İnsektisidal Aktivitesi	11
1.3.1.3. Vip1/Vip2 Toksininin Etki Şekli.....	15
1.3.1.4. Vip1/Vip2 Toksininin Bitkilerde İfadesi	16
1.3.2. Vip3 Proteini	16
1.3.2.1. Vip3 Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu.....	17
1.3.2.2. Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Aktivitesi.....	19
1.3.2.2.1. Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Spektrumları.....	20
1.3.2.2.2. Vip3 Proteinlerinin Diğer İnsektisidal Proteinlerle Etkileşimleri	25
1.3.2.2.3. Genetik Olarak Tasarlanmış <i>vip3A</i> Genleri	26
1.3.2.3. Vip3 Proteinlerinin Etki Şekli	28
1.3.2.3.1. Davranışsal ve Histopatolojik Etkiler	28
1.3.2.3.2. Proteolitik İşlemler	29
1.3.2.3.3. Larval Orta Bağırsak Epitelyumuna Bağlanma.....	31
1.3.2.3.4. Gözenek Oluşumu	33
1.3.2.4. Direnç ve Çapraz Direnç.....	33
1.3.2.5. Vip3 Proteininin Bitkilerde İfadesi.....	34

1.4.	Çalışmanın Amacı	35
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	37
2.1.	Lokal İzolatlara Ait <i>vip</i> Genlerinin Taranması, Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	37
2.1.1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatları ve Büyüme Şartları.....	37
2.1.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu.....	37
2.1.3.	<i>vip</i> Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması.....	38
2.1.4.	<i>vip</i> Genlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	39
2.1.5.	Kompotent Hücre Hazırlanması	39
2.1.6.	<i>vip</i> Gen Bölgesinin Kompotent <i>E. coli</i> JM101'e Aktarımı.....	40
2.1.7.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz (<i>EcoRI</i>) ile Muamelesi	40
2.1.8.	Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi	41
2.2.	Vip3 Proteinlerinin Eldesi ve Kısmen Saflaştırılması	41
2.2.1.	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> (MnD, BnBt) İzolatlarının Büyüme Eğrisinin ve Vejetatif Safhasının Belirlenmesi	41
2.2.2.	Kültür Süpernatantlarından Vip3 Proteinlerinin İzolasyonu.....	42
2.2.2.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	42
2.2.2.2.	İyon Değişimi Kromatografisi.....	42
2.2.2.3.	Hızlı Gümüş Boyama.....	43
2.2.2.4.	Protein Miktarının Belirlenmesi	44
2.3.	<i>vip3A</i> Geninin Belirlenmesi, Klonlanması ve İfade Edilmesi.....	45
2.3.1.	Primer Sentezi	45
2.3.2.	<i>vip3A</i> Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	45
2.3.3.	<i>vip3A</i> Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne Klonlanmaları	46
2.3.4.	<i>vip3A</i> Genlerinin Kompotent <i>E. coli</i> DH10β'ya Aktarımı	46
2.3.5.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi	47
2.3.6.	Klonların İçerdiği <i>vip3A</i> Geninin Dizi Analizi	47
2.3.7.	Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi.....	48
2.3.8.	Belirlenen Vip3A Proteinlerinin Literatürdeki Diğer Vip3A Proteinleriyle Karşılaştırılması ve MEGA Programı ile Ağaç Çizimi	48
2.3.9.	<i>vip3A</i> Genlerinin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Klonlanmaları	48
2.3.9.1.	pGEX-2T Ekspresyon Vektörünün <i>EcoRI</i> ve <i>BamHI</i> Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi	48
2.3.9.2.	<i>vip3A</i> Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektöründen Kesilerek	

	Çıkarılmaları.....	49
2.3.9.3.	<i>vip3A</i> Genlerinin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Aktarımı.....	49
2.3.10.	pGEX-2T Vektörüne Klonlanan <i>vip3A</i> Genlerinin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı.....	49
2.3.11.	Vip3A Proteinleri, Ekspresyonu ve İzolasyonu	50
2.3.12.	Protein Miktarının Belirlenmesi	50
2.3.13.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	51
2.3.14.	Western Blot Hibridizasyonu	51
2.3.15.	Üretilen Proteinlerin Saflaştırılması	52
2.4.	Elde Edilen Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi.....	53
3.	BULGULAR	54
3.1.	Lokal İzolatlara Ait <i>vip</i> Genlerinin Taranması, Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	54
3.1.1.	<i>vip</i> Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Yöntemiyle Belirlenmesi.....	54
3.1.2.	<i>vip</i> Genlerinin Klonlanması ve Baz Sıralarının Belirlenmesi	55
3.1.3.	<i>vip</i> Genlerinin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması	56
3.2.	Vip3 Proteinlerinin Eldesi ve Kısmen Saflaştırılması	60
3.2.1.	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> (MnD, BnBt) İzolatlarının Büyüme Eğrisinin ve Vejetatif Safhasının Belirlenmesi	60
3.2.2.	Kültür Süpernatantlarından Vip3 Proteinlerinin İzolasyonu.....	60
3.2.2.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	61
3.2.2.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve SDS-PAGE Analizi.....	61
3.3.	<i>vip3A</i> Geninin Belirlenmesi, Klonlanması ve İfade Edilmesi.....	62
3.3.1.	<i>vip3A</i> Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması.....	62
3.3.2.	<i>vip3A</i> Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne Klonlanmaları ve Baz dizilimlerinin Belirlenmesi ve Filogenetik Analizi	63
3.3.3.	<i>vip3A</i> Geninin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	67
3.3.4.	Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi	69
3.4.	Elde Edilen Vip3 Proteinlerinin <i>Spodoptera littoralis</i> Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi	70
4.	TARTIŞMA	72
5.	SONUÇLAR	78
6.	ÖNERİLER.....	79
7.	KAYNAKLAR.....	81
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

BAZI ENTOMOPATOJENİK BAKTERİLERİN VEJETATİF İNSEKTİSİDAL
PROTEİN (*vip*) GEN İÇERİKLERİNİN VE İNSEKTİSİDAL ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

Aysun ADIGÜZEL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2017, 108 sayfa

Bu çalışma ile daha önceki çalışmalarda izole ve karakterize edilmiş lokal *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BnBt, MnD) ve *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarında *vip* (*vip1*, *vip2* ve *vip3*) genlerinin PCR ile taranması, izolatlara ait bazı *vip* genlerinin klonlanması, karakterizasyonu gerçekleştirildi. BnBt ve MnD izolatlarından kısmi olarak saflaştırılan Vip3 proteinlerinin *Spodoptera littoralis* larvalarına karşı insektisidal aktivitesi belirlendi. Yapılan PCR taraması ve klonlama sonucunda MnD ve BnBt suşlarında *vip3* geninin, Xd3 ve Mm2 suşlarında ise *vip1* ve *vip2* geninin varlığı tespit edildi. BnBt ve MnD izolatlarına ait Vip3 proteinleri, kültür süpernatantlarından iyon değişim kromatografisiyle elde edilerek SDS-PAGE analizi yapıldı ve proteinlere ait 90 kDa'luk bant belirlendi. Elde edilen proteinler *S. littoralis* larvalarına karşı kullanıldı ve biyotest sonucunda BnBt'ye ait Vip3 proteininin % 40, MnD'ye ait Vip3 proteininin % 31 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Tezin ikinci kısmında BnBt ve MnD izolatlarına ait tam uzunluktaki *vip3A* genleri klonlandı ve baz dizilimleri belirlendi. *vip3A* geninin, 2.370 bp uzunluğunda olup 790 aminoasit içerdiği belirlendi. Daha sonra pGEX-2T ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21(DE3)'de ifade edildi ve kısmi olarak saflaştırıldı. SDS-PAGE analizi sonucunda ~90 kDa'luk Vip3A proteinine eklenmiş 26 kDa'luk GST kuyruğu ile ~116 kDa'luk bir bant gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Mikrobiyal mücadele, *Spodoptera littoralis*, Vejetatif insektisidal protein (Vip)

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEIN (*vip*) GENE
CONTAINS AND INSECTICIDAL ACTIVITIES OF SOME ENTOMOPATHOGENIC
BACTERIA

Aysun ADIGÜZEL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Kazım SEZEN
2017, 108 Pages,

In this study, the screening by PCR, the cloning and the characterization of *vip* genes of local *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BnBt, MnD) and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) isolates which isolated and characterized in previous studies were performed. The insecticidal activity of partly purified Vip3 proteins of BnBt and MnD isolates against the *Spodoptera littoralis* larvae was determined. As a result of the PCR analysis and the cloning, *vip3* gene in MnD and BnBt isolates, *vip1* and *vip2* genes in Xd3 and Mm2 isolates were determined. Vip3 proteins of BnBt and MnD isolates by obtained from culture supernatants by ion exchange chromatography were subjected to SDS-PAGE analysis and a 90 kDa band of proteins were determined. The obtained proteins were used against the larvae of *S. littoralis* and according to results, the insecticidal effects of the Vip3 proteins of BnBt and MnD were observed as 40% and 31%, respectively. In the second part of the thesis, the full-length *vip3A* genes of BnBt and MnD isolates were cloned and the base sequences were determined. *vip3A* gene was 2,370 bp in length and had 790 amino acids. Then Vip3A proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) by cloning into pGEX-2T expression vector and purified. SDS-PAGE analysis showed a band of totally 116 kDa for the Vip3A protein (~90 kDa) with the 26 kDa GST tag attached.

Key Words: *Bacillus thuringiensis*, Microbial control, *Spodoptera littoralis*, Vegetative insecticidal protein (Vip)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> INTATA24-6'nın elektron mikroskop görüntüsü.....	3
Şekil 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in böcekler üzerindeki etki mekanizması	4
Şekil 3. Vip proteinlerinin amino asit derecelerine dayalı dendrogramları	8
Şekil 4. Aktive edilmiş Vip2Aa'nın üç boyutlu yapısı	11
Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış <i>vip1</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 6. PCR ile çoğaltılmış <i>vip2</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 7. PCR ile çoğaltılmış <i>vip3</i> genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 8. <i>vip1</i> genlerini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün <i>EcoRI</i> ile kesimi	55
Şekil 9. <i>vip2</i> genlerini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün <i>EcoRI</i> ile kesimi	56
Şekil 10. Mm2 izolatına ait <i>vip1</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip1</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	57
Şekil 11. Mm2 izolatına ait <i>vip2</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip2</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	57
Şekil 12. Xd3 izolatına ait <i>vip1</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip1</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	57
Şekil 13. Xd3 izolatına ait <i>vip2</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip2</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	58
Şekil 14. BnBt izolatına ait <i>vip3</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip3</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	58
Şekil 15. MnD izolatına ait <i>vip3</i> geninin nükleotid sıralarının literatürdeki <i>vip3</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	59
Şekil 16. <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i> BnBt ve MnD izolatlarının büyüme eğrisi	60
Şekil 17. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarından kısmen saflaştırılmış Vip3 proteinlerinin SDS-PAGE analizi	62
Şekil 18. PCR ile çoğaltılmış <i>vip3A</i> geninin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	63
Şekil 19. <i>vip3A</i> genlerini içeren pJET1.2/blunt vektörünün <i>BglIII</i> ile kesimi	64
Şekil 20. BnBt ve MnD izolatlarına ait <i>vip3A</i> geninin DNA sırası.....	65
Şekil 21. BnBt ve MnD izolatlarına ait <i>vip3A</i> geninin aminoasit sırası	66
Şekil 22. BnBt ve MnD izolatlarına ait <i>vip3A</i> geninin literatürdeki diğer <i>vip3A</i> gen sıralarıyla karşılaştırılması	66
Şekil 23. Vip3A proteininin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı	67

Şekil 24. <i>vip3A</i> genlerini içeren pJET1.2/blunt vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI restriksiyon enzimleriyle kesimi	68
Şekil 25. pGEX-2T vektörünün ve <i>vip3A</i> genini içeren pGEX-2T vektörünün <i>Bam</i> HI ve <i>Eco</i> RI restriksiyon enzimleriyle kesimi	69
Şekil 26. pGEX-2T vektörüne klonlanıp kısmen saflaştırılan rekombinant Vip3A proteininin SDS-PAGE analizi.....	70
Şekil 27. Vip3 proteinin <i>Spodoptera littoralis</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi...	71



TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Vip1 ve Vip2 protoksinlerinin bireysel ve ikili toksinler olarak kombinasyonlarının insektisidal spektrumu	12
Tablo 2. Vip3Aa alt ailelerine ait proteinlerinin aktivite ve toksisite spektrumu.....	21
Tablo 3. Vip3Aa alt ailesi dışındaki Vip3A proteinlerinin aktivite ve toksisite spektrumu	24
Tablo 4. Vip3B ve Vip3C protein ailelerinin aktivite ve toksisite spektrumu	25
Tablo 5. Genetik olarak tasarlanmış Vip3A proteinleri ve böcek toksisitesi üzerine etkileri	28
Tablo 6. Çalışmada kullanılan lokal <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatları	37
Tablo 7. <i>vip</i> genlerinin PCR ile çoğaltılması için kullanılacak olan primerler	39
Tablo 8. <i>EcoRI</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içeren primerler ...	45
Tablo 9. Lokal izolatlarda tespit edilen <i>vip</i> genleri.	59

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

aa	: Aminoasit
Amp	: Amfisilin
ADP	: Adenozin difosfat
BBMV	: Fırça Kenar Membranı Vezikülleri
bp	: Baz Çifti
BSA	: Sığır Serum Albumin
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
Cry	: Kristal
Cyt	: Sitolitik
ddH ₂ O	: Distile Su
DDT	: Dikloro-difenil-trikloroetan
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleosit Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	: Yerçekimi İvmesi
HCl	: Hidroklorik Asit
ICP	: İnsektisidal Kristal Protein
IPTG	: İzopropil β -D-1-tiyo galaktopiranosid
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilodalton
LC ₅₀	: Populasyonun % 50'sini öldüren toksin konsantrasyonu
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit

ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Buffer Salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS	: Tris Buffer Salin
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEMED	: N'N'N'N'-Tetra-metiletildiamin
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktopiranosid
Vip	: Vejetatif İnsektisidal Protein
V	: Volt
β	: Beta
°C	: Derece santigrad
σ	: Sigma
%	: Yüzde
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanoğlu varoluşundan günümüze kadar böceklerin sebep olduğu sorunlarla uğraşmak zorunda kalmıştır. Bazı hastalıkları yaymaları ve tarım alanlarına verdiği zararlar yüzünden böceklerle mücadele etmek kaçınılmaz olmuştur. Tarımsal ürünlerin veriminin artırılması ve korunması için böceklerle yapılan kimyasal ve biyolojik mücadele sırasında doğal habitatların korunması esastır. Çünkü ekolojik özellikler dikkate alınmadan yapılan mücadele yöntemleri biyolojik çeşitliliğin azalmasına, başka zararlıların ortaya çıkmasına ve uzun vadede verim düşüşüne neden olmaktadır. Mevcut tarım alanlarının yanlış kullanılması hem çevreyi, hem de besin ihtiyacı hızla artmakta olan insan topluluklarını olumsuz etkilemektedir. Bu durum dünya genelindeki nüfus artışı ve besin sıkıntısı düşünüldüğünde tarımın önemini daha da artırmaktadır (Miller, 1998; Ayvaz, 2001; Yılmaz, 2010).

Böcekler ile mücadele yöntemleri, doğal yöntemler ile başlayıp sentetik kimyasalların kullanımıyla devam etmiştir. Fakat daha sonra kimyasalların hem çevreye hem de hedef olmayan canlılara vermiş olduğu zararlar nedeniyle çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde kullanılan kimyasallar geçmişte kullanılanlarla kıyaslandığında (DDT gibi) daha güvenli ve yarılanma ömrü az olmasına rağmen yine de bir takım sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Örneğin, sentetik insektisitlere uzun süre maruz kalındığında kanser, karaciğer hastalıkları, immunotoksisite, doğum anormallikleri, insan ve diğer hayvanlarda görülen kısırlık problemleri gibi birçok problem ortaya çıkmaktadır (Kegley ve Wise, 1998). Ayrıca kullanılan kimyasal insektisitler, hayatımızın en önemli parçalarını oluşturan su, hava ve toprağın ölçülebilir düzeyde kirlenmesine neden olmaktadır (Newsom, 1996). Tarım ilacı kalıntılarının suda eser miktarda bulunması bile sucul ekosistemlerdeki besin zincirlerinin bozulmasına ve buradaki canlı türlerinin hızla yok olmasına neden olmaktadır (Aguilar vd., 1997).

Ticari olarak satılan kimyasal insektisitlerin birçoğu özgülük göstermediği için arılar, kuşlar, balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümlere neden olmaktadır. Ayrıca kuş, balık ve diğer organizmalarda

üreme potansiyelinin azalması, hedef olmayan organizmalarda dirençlilik oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması, ekosistemin yapısının ve tür sayısının değişmesi gibi birçok yan etkileri belirlenmiştir (Yücel, 2007).

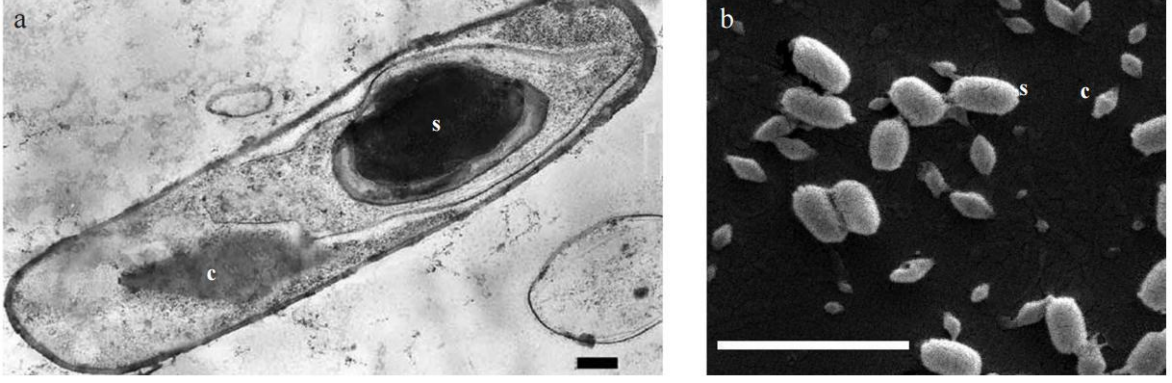
Kullanılan kimyasalların doğal düşmanların ölümüne neden olmasından dolayı zararlılar tekrar çoğalarak ekosistemdeki yerini alır ve zarar vermeye devam eder. Bununla birlikte eğer doğal düşman ortamdaki başka zararlıları kontrol ediyorsa, yeni bir zararlı popülasyonu ortaya çıkarılmış olur. Kimyasallarla zararlının biri ortadan kaldırılırken diğeri istemeden de olsa çoğalmaya başlar ve yeni bir problem ortaya çıkar (Yücel, 2007).

Tüm dünyada ve ülkemizde tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olan zararlı böcekler ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitler hem böceklerin bu ilaçlara karşı direnç kazanmalarına neden olmakta hem de çevredeki faydalı böcekleri, arıları, kuşları, balıkları ve insanları olumsuz yönde etkileyerek çevresel dengeyi bozmaktadır (Ecevit, 1988; Ayvaz, 2001). Bu nedenlerden dolayı alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmekte ve bu yöntemler arasında biyolojik mücadele önemli bir yer tutmaktadır.

Biyolojik mücadele, istenmeyen zararlı bir organizmanın faydalı başka bir organizma tarafından popülasyonunun zarar seviyesinin altında tutulması olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadele klasik biyokontrol, kitlesel salıverme, entomopatojen organizmaların kullanımı ve koruyucu yöntemler şeklinde uygulanmaktadır (Yılmaz, 2010). Biyolojik mücadelede rol oynayan ajanlar genel olarak virüsler, bakteriler, funguslar, protozoonlar ve nematodlardır.

2013 yılı verilerine göre dünya da biyopestisitlerin payı 1,5 milyar dolar iken, yetkililerin beklentisine göre, 2020 yılında 6-7 milyar dolar, 2050 yılında ise, toplam pazardan % 40 pazar payına ulaşması beklenmektedir. Temiz ve güvenli gıda bilinciyle biyopestisitler, her yıl pazar payını % 16 arttırarak dikkatleri üzerine çekmektedir (URL-1, 2016).

Biyolojik mücadelede kullanılan en etkili entomopatojen *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)'dir. *B. thuringiensis* Bacillaceae familyası içerisinde yer alan, gram-olumlu ve aerobik bir toprak bakterisidir (Şekil 1). Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda bir toksin protein üreten ve spor oluşturan bir bakteridir (Beegle ve Yamamoto, 1992).



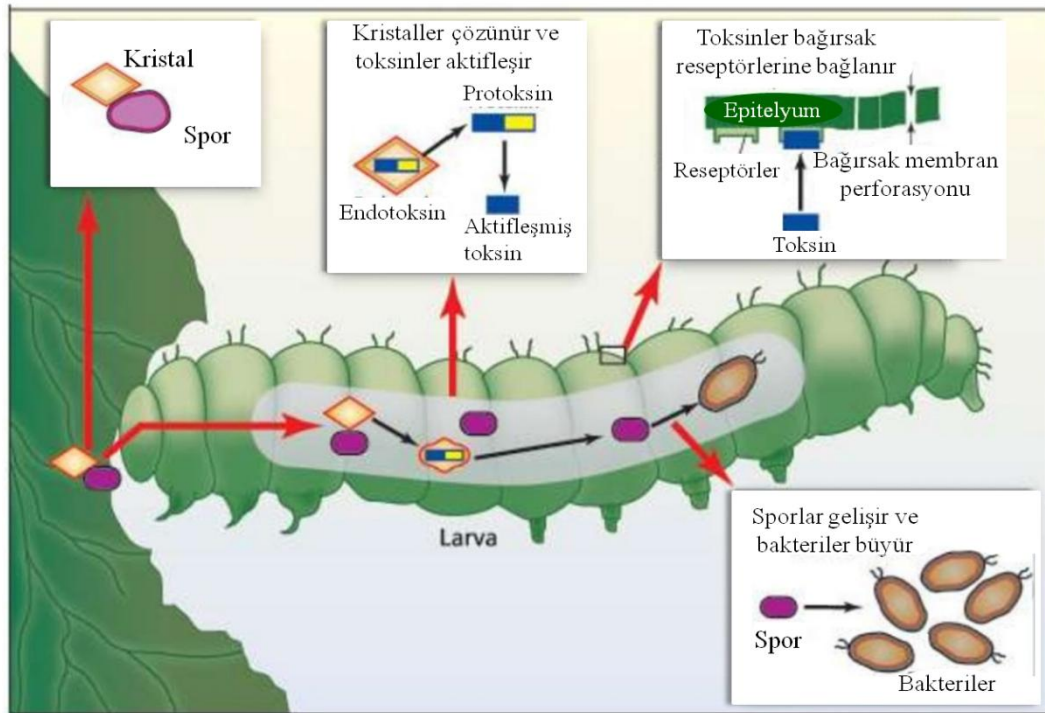
Şekil 1. *Bacillus thuringiensis* INTATA24-6'nin elektron mikroskop görüntüsü a) Spor oluşturan bir hücrenin TEM görüntüsü, bir spor (S) ve bir bipiramidal kristal (C). Bar: 0.2 μm ; b) Sporların (S) ve kristallerin (C) SEM görüntüsü. Bar: 5 μm (Sauka vd., 2010).

Bt'nin ticari biyopestisit olarak kullanımı ilk olarak 1938'de başlamıştır. 1950'li yıllarda bazı gelişmiş ülkelerde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bitkilere püskürtülerek yapılan uygulama en etkili yöntemlerden birisidir. Toksinlerin doğada uzun süre etkisini koruyamaması nedeniyle zararlının biyolojik yapısına bağlı olarak, uygulamanın belirli aralıklarla tekrarlanması gerekir (Van Frankenhuyzen vd., 1993). Kimyasal insektisitlerin böceklerde dirençliliğe neden olmasıyla birlikte etkisiz hale gelmeye başlaması ve çevresel sebeplerden dolayı kullanımının sınırlandırılması 1980'li yıllarda *Bt* ürünlerine olan ilgiyi iyice artırmıştır.

Bt toksinlerinin, kimyasal insektisitlerin ulaşamadığı kısımlarda zarar veren böceklere karşı bitkide ifade edilmesi tarım ürünlerindeki verim bakımından oldukça faydalıdır. Bunlara en iyi örnek mısır zararlısı olan *Ostrinia nubilalis*'tir. *O. nubilalis* larvaları koçan ve gövde kısımlarını zarara uğrattıkları için kimyasal insektisitlerden zarar görmezler ve bitkinin yapısal bütünlüğünü bozarlar. Fakat toksinlerin bitkide ifade ettirilmesi *O. nubilalis* larvalarının doğrudan toksine maruz kalmasına neden olur (Ely vd., 1993). Transgenik pamuk, mısır ve patates gibi bitkilerin ürünleri Kanada, Japonya, Meksika, Arjantin ve Avustralya gibi ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Frutos vd., 1999). *Bt* ürünleri dünyada çeşitli formülasyonlar halinde kullanılmakla beraber transgenik bitki şeklinde kullanımı da gün geçtikte yaygınlaşmaktadır (Liu ve Tabashnik, 1997). *Bt* ürünleri ekolojik dengeyi tehdit etmediği gibi sekonder zararlıların ortaya çıkmasına da neden olmaz. Bu yüzden *Bt* ürünleri tarım zararlılarına karşı oldukça önemli bir mücadele etmenidir (Walker vd., 2003).

B. thuringiensis'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera takımlarındaki hassas böceklere karşı kristal protein (*cry*) genlerinin oluşturduğu aktif insektisidal kristal proteinler (ICP) sayesinde. Bu proteinlerin böceklerde öldürücü etkisini gösterebilmesi için böcekler tarafından sindirilmesi gerekir (Visser vd., 1993).

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



Şekil 2. *Bacillus thuringiensis*'in böcekler üzerindeki etki mekanizması (URL-2, 2017).

ICP'lerin özgül reseptörlere bağlanmasının insektisidal etki spektrumuyla ilgili olduğu tespit edilmiştir (Denolf vd., 1997). Van Rie ve arkadaşları (1989), ICP'lerin tütün kurdu (*Heliothis virescens*) ve domates kurdunun (*Manduca sexta*) fırça şeklindeki membran veziküllerine bağlandıklarını göstermiştir. Fakat bağlanma yerlerinin sayısı farklıdır ve değişik biyolojik aktiviteler gösterir. Bağlanma yerleri için bütün böceklerde toksin ilgisi aynı değildir.

Türkiye'de kimyasal insektisitlerin zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanıldığı gözönüne alındığında, uzun vadede ürün veriminde azalma, ekosistemin dengesinin bozulması, sağlık problemlerinin artması ve tüm bunlara bağlı olarak ciddi ekonomik kayıpların ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu nedenle *Bt* ürünlerinin zararlılarla mücadelede kullanılması, yaygınlaştırılması, farklı zararlılara karşı yeni *Bt* izolatlarının taranması, laboratuvar ortamında toksik etkilerinin belirlenmesi, farklı formülasyonlar ve uygulama yöntemleri geliştirilerek ticari kullanımının sağlanması faydalı olacaktır (Yılmaz, 2010).

Bu saydığımız avantajlarının yanında böcek zararlılarının *B. thuringiensis* toksinlerine karşı da direnç geliştirdikleri de bilinmektedir.

1.2. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis* Toksinlerine Karşı Dirençliliği

Kimyasal insektisitlerin kullanımındaki artışlar, böcek populasyonları arasında kimyasallara karşı dirençliliğin gelişmesine yol açmıştır. Bu durum, ilginin kimyasal insektisitler yerine, *B. thuringiensis*'e dayalı preparat ve biyoformülasyonlara kaymasını sağlamıştır (Eryüzlü, 2010). Zararlıların *B. thuringiensis* toksinlerine karşı direnç geliştirmelerinin oldukça zor olduğu düşünülmüş, fakat 1980'li yıllarda hem laboratuvar hem de doğal ortamdan elde edilen birçok böcek türünün *B. thuringiensis* toksinlerine karşı farklı seviyede direnç geliştirdiği görülmüştür (Tabashnik, 1994; Ferre, vd., 1995).

McGaughey (1985), *B. thuringiensis* formülasyonu uygulanmış tahıl ambarlarındaki Hint unu güvesi populasyonunun yüksek oranda LC₅₀ değerleri gösterdiğini rapor etmiştir. Ayrıca, bir çeşit güve olan *Plutella xylostella* populasyonunda da *B. thuringiensis* insektisitlerine karşı dirençlilik tespit edilmiştir (Schnepf vd., 1998). Maagd ve arkadaşları (1999) *B. thuringiensis* toksinlerinin, böceklerin direnç geliştirmelerinde bir istisna olmadığını ortaya koymuştur. Cry11A ve Cry1Ac proteinlerine karşı dirençlilik, *Leptinotarsa decemlineata* ve *P. xylostella*'da tespit edilmiştir. Küresel olarak *P.*

xylostella'nın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'ye karşı direnç geliştirmesi Florida, Japonya, Filipinler ve Çin'de rapor edilmiştir (Schnepf vd., 1998).

Yakın geçmişteki laboratuvar çalışmaları, 10. jenerasyonun sonunda *Helicoverpa armigera* için Cry1Ac delta endotoksin'e karşı dirençte 76 kat artış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Son zamanlarda *B. thuringiensis* δ -endotoksinine karşı gösterilen dirençteki bu artış nedeniyle, bilim adamları böceklerdeki direnç artışı ile ilgili mekanizmayı anlamak için yapılacak çalışmaları üstlenmek zorunda kaldılar. Birçok dirençli popülasyon üzerinde yapılan çalışmalar, direncin asıl sebebinin fırça membran yapısı olduğunu göstermiştir. Bunun aksine, Gould ve arkadaşlarının (1992) yaptığı araştırmalar sonucunda *B. thuringiensis* toksinlerine karşı geliştirilen çapraz direnç modellenmiştir. Direncin sebebi olarak protoksinlerin proteolizisi veya kristallerin bağırsaktaki azalan solubilizasyonu gösterilmiştir. Van Rie ve arkadaşları (1990), Cry1Ab proteinlerinin hedef böcek reseptörlerine bağlanmada göstermiş olduğu 50 kat azalma sebebi ile direnç geliştirdiklerini belirtmişlerdir.

Böcek kontrolünde Cry proteinlerinin geniş başarısına rağmen, mısır fidesine hasar veren *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) ve *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) gibi bazı önemli zararlıların Cry proteinlerine karşı çok toleranslı oldukları bulunmuştur (Warren, 1997).

Ayrıca yapılan çalışmalarla laboratuvar koşullarında farklı böcek türlerinde *B. thuringiensis* toksinlerine karşı dirençlilik tespit edilmiştir (Schnepf vd., 1998). Dirençlilik tespit edilen böcek türleri: *Plodia interpunctella*, *Cadra cautella*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Heliiothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* ve *Culex quinquefasciatus*'tur (Schnepf vd., 1998). Direnç gözlenen *B. thuringiensis* suşları, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer *B. thuringiensis* alt türleridir.

Başta Lepidoptera olmak üzere Diptera ve Coleoptera takımlarındaki zararlılara karşı kullanılan *B. thuringiensis* preparatlarının, mevcut preparatlara direnç geliştirilmesi ve bunların çevre koşullarına uyum sağlayamaması yeni preparatlar geliştirilmesi çalışmalarını zorunlu kılmaktadır. Bu sebeple tüm dünyada tarım ve ormancılıkta zararlı böceklere karşı kullanılacak, insektisidal aktivitesi yüksek, dirençlilik problemlerini aşabilen yeni bir mikrobiyal mücadele materyali elde edilmesi hedeflenmiştir.

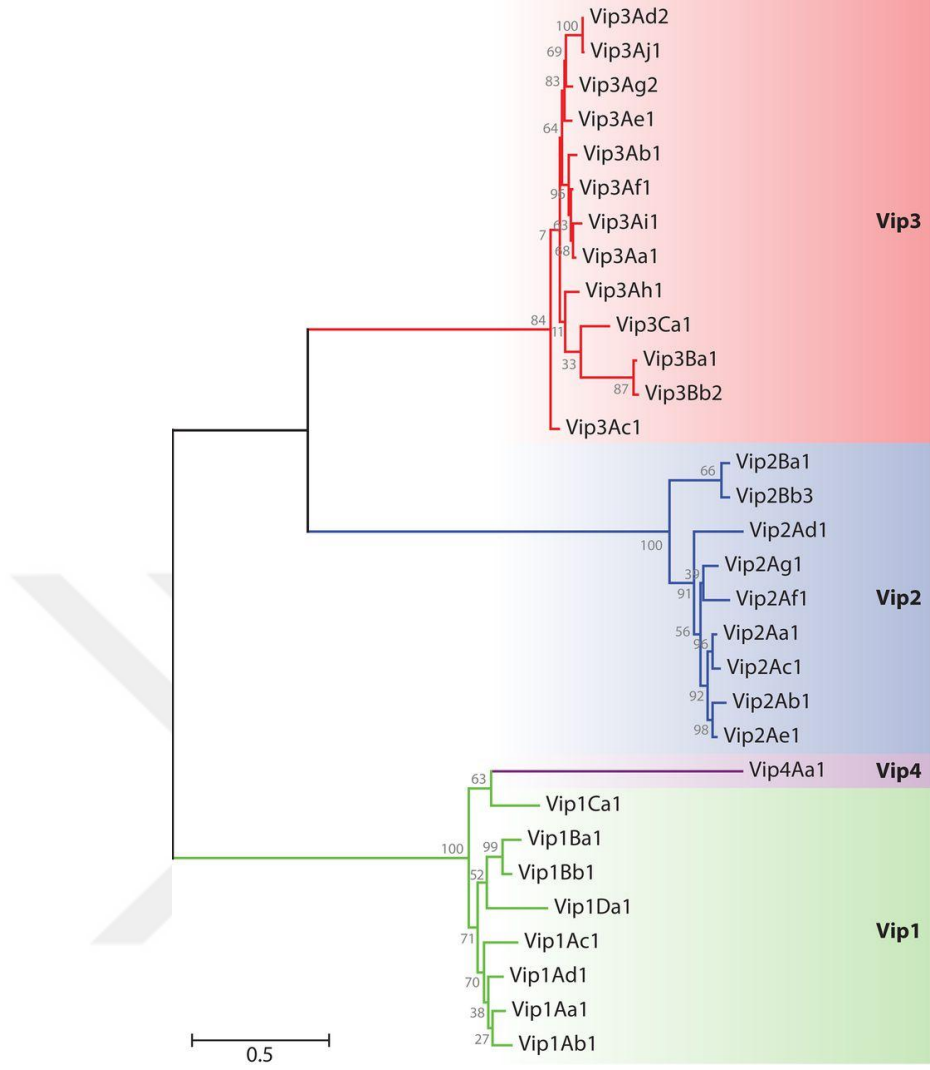
Bu problemin aşılması için önemli yol haritalarından biri *Bacillus* izolatlarının süpernatantlarında yeni böcek öldürücü aktif bileşenlerin varlığının araştırılması olmuştur (Chakroun, 2015). Günümüze kadar Cry proteinlerine ek olarak sporulasyon aşamasında üretilen Cyt (sitolitik), vejetatif safhada üretilen ve ortama salgılanabilen Vip (vejetatif insektisidal proteinler) ve Sip (salgılanmış insektisidal proteinler) toksinleri belirlenmiştir (Estruch vd., 1996; Warren vd., 1998; Donovan vd., 2006; Crickmore, vd., 2014).

1.3. Vip Toksinleri

Bacillus izolatlarının kültür süpernatantlarındaki böcek öldürücü aktif maddeleri değerlendirmeye yönelik yapılan çalışmalar ile *Bacillus cereus* AB78'de *Diabrotica virgifera virgifera* ve *Diabrotica longicornis barberi*'ye karşı % 100 insektisidal aktivite gösteren bir bileşen bulundu. Süpernatanttaki bu aktif maddenin proteinimsi yapıda olduğu belirlendi. Anyon değişim kromatografisini takiben yapılan SDS-PAGE, insektisidal aktivitenin sırasıyla Vip1Aa ve Vip2Aa olarak adlandırılan, 80 ve 45 kDa büyüklüğündeki iki farklı proteinden kaynaklandığını gösterdi (Warren, 1997).

Test edilen 463 *B. thuringiensis* suşunun yaklaşık % 12'sinin ilgili *vip1Aa* ve *vip2Aa* genlerine yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlendi. Aynı çalışmada, *B. thuringiensis* AB88 suşunun vejetatif kültür süpernatantında *A. ipsilon* ve diğer lepidopteranlar için oldukça toksik olan ve Vip3Aa olarak adlandırılan 88.5 kDa büyüklüğünde bir protein tespit edildi (Estruch vd., 1996). 2010 yılında, Vip4Aa olarak adlandırılan yeni bir protein daha bildirildi (NCBI erişim numarası: AEB52299) ve yapılan siliko analizinde yaklaşık olarak 108 kDa büyüklüğünde bir molekül kütleyle sahip olduğu öngörüldü (URL-3, 2017).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 15 adet Vip1, 20 adet Vip2, 106 adet Vip3 ve 1 adet Vip4 proteini tespit edildi (Crickmore vd., 2017). Vip proteinlerinin aminoasit derecelerine göre hiyerarşisi Şekil 3'de dendrogram ile gösterilmektedir.



Şekil 3. Vip proteinlerinin amino asit derecelerine dayalı dendrogramları. Amino asit sekansları Clustal X arayüzü kullanılarak hizalandı ve MEGA 5 programı kullanılarak ağaç çizildi (Chakroun vd., 2016).

Şimdiye kadar Vip1 ve Vip2 ile ilgili yapılan çalışmalarda, Coleoptera takımına ait 8 türe (Warren, 1997; Boets vd., 2011; Shingote vd., 2013; Palma vd., 2014; Bi vd., 2015) ve Homoptera takımına ait *Aphis gossypii*'e (Sattar ve Maiti, 2011; Yu vd., 2011) karşı toksisite gözlemlendi. Vip3A proteinini ise Lepidopteran böceklerin geniş bir kısmı için toksik etki göstermektedir (Estruch vd., 1996; Yu vd., 1997; Donovan vd., 2001; Selvapandiyar vd., 2001; Doss vd., 2002; Lee vd., 2003; Franco-Rivera vd., 2004; Abdelkefi-Mesrati vd., 2005; Bhalla vd., 2005; Fang vd., 2007; Sena vd., 2009; Palma vd., 2013; Figueiredo vd., 2013; Baranek vd., 2015; Boukedi vd., 2015). Bu proteinlerin Cry proteinlerine toleranslı olduğu bilinen *Agrotis* cinsi böcek türlerine ve aynı zamanda Cry proteinlerine nispeten

daha az duyarlı *Spodoptera* cinsi böcek türlerine karşı son derece etkin olduğu belirtilmiştir (Van Frankenhuyzen ve Nystrom, 2009). Vip4 olarak adlandırılan ailenin yeni üyesi için henüz hiçbir hedef böcek bulunamamıştır.

Cry protein ailesinin aksine, Vip1, Vip2 ve Vip3 proteinleri arasında hemen hemen hiç dizi homolojisi bulunmamaktadır. Vip proteinleri arasındaki en yüksek benzerlik ise % 34'lük oranla Vip1 ve Vip4 proteinleri arasındadır (Chakroun, 2015). Buna ek olarak Vip proteinleri, *B. thuringiensis* tarafından geç büyüme fazında üretilen Cry ve Cyt δ -endotoksinlerinden yapısal olarak farklıdır ve bunlar ile hiçbir dizi homolojisi paylaşmamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar ile bağlanma bölgeleri için aralarında rekabet olmadığı görülmüştür (Lee vd., 2003, 2006; Abdelkefi-Mesrati vd., 2009; Sena vd., 2009; Liu vd., 2011; Gouffon vd., 2011; Ben Hamadou-Carfi vd., 2013; Caccia vd., 2014; Ruiz de Escudero vd., 2014). Bu nedenle Vip proteinleri Cry proteinleri ile birlikte ya da dönüşümlü kullanılarak hedef zararlılarda gelişen direncin üstesinden gelebilmek için çok umut verici olmaktadır (Caccia vd., 2014).

1.3.1. İkili Vip1/Vip2 Toksini

vip1 ve *vip2* genleri, *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'e ek olarak, *Lysinibacillus sphaericus* (eski adıyla *Bacillus sphaericus*) ve *Brevibacillus laterosporus* gibi diğer bakteri türlerinde de bulunmuştur (Schnepf vd., 2005; Ruiu, 2013). *vip1* ve *vip2* genlerinin dağılımı üzerine yapılan çalışmalar ile *B. thuringiensis* suşlarının yaklaşık % 10'unda bulunduğu tespit edilmiştir (Hernandez Rodriguez vd., 2009; Yu vd., 2011a; Shingote vd., 2013). Bu iki gen aynı operon ve 4 - 16 bp'lik bir arabölge ile birbirinden ayrılan iki farklı açık okuma zinciri (ORF) tarafından hem 4 - 5 kb'lık bir genomik dizide (Warren, 1997; Shi vd., 2007; Bi vd., 2015) ve hem de *B. thuringiensis* IS5056 suşundaki bir megaplazmitte (Yaklaşık 328 kb uzunluğunda) (Murawska vd., 2013) taşınır.

Şu ana kadar Bt Toksin Adlandırma veri tabanının listelediği *vip1* ve *vip2* genleri: 3 *vip1Aa*, 1 *vip1Ab*, 1 *vip1Ac*, 1 *vip1Ad*, 2 *vip1Ba*, 3 *vip1Bb*, 1 *vip1Bc*, 2 *vip1Ca* ve 1 *vip1Da* ve 3 *vip2Aa*, 1 *vip2Ab*, 2 *vip2Ac*, 1 *vip2Ad*, 3 *vip2Ae*, 2 *vip2Af*, 2 *vip2Ag*, 2 *vip2Ba* ve 4 *vip2Bb* (Crickmore vd., 2017).

Vip1 ve Vip2 proteinleri eşzamanlı olarak ifade edilir ve aynı transkriptten translasyonu her iki proteinin de yüksek seviyede olmasını sağlamak için gereklidir. Vip1 ve Vip2 proteinleri *B. thuringiensis*'in vejetatif büyüme evresi sırasında üretilirler ve

sporülasyon aşamasının sonuna kadar seviyeleri yüksek kalır. Gen transkriptleri, logaritmik fazın başlangıcında bile bulunur, durağan fazda maksimum ifade meydana gelir ve sporülasyon aşamasında yüksek seviyelerde kalır (Estruch vd., 1996; Shi vd., 2004; Shi vd., 2007; Bi vd., 2015).

1.3.1.1. Vip1/Vip2 Toksininin Protein Yapısı ve Fonksiyonu

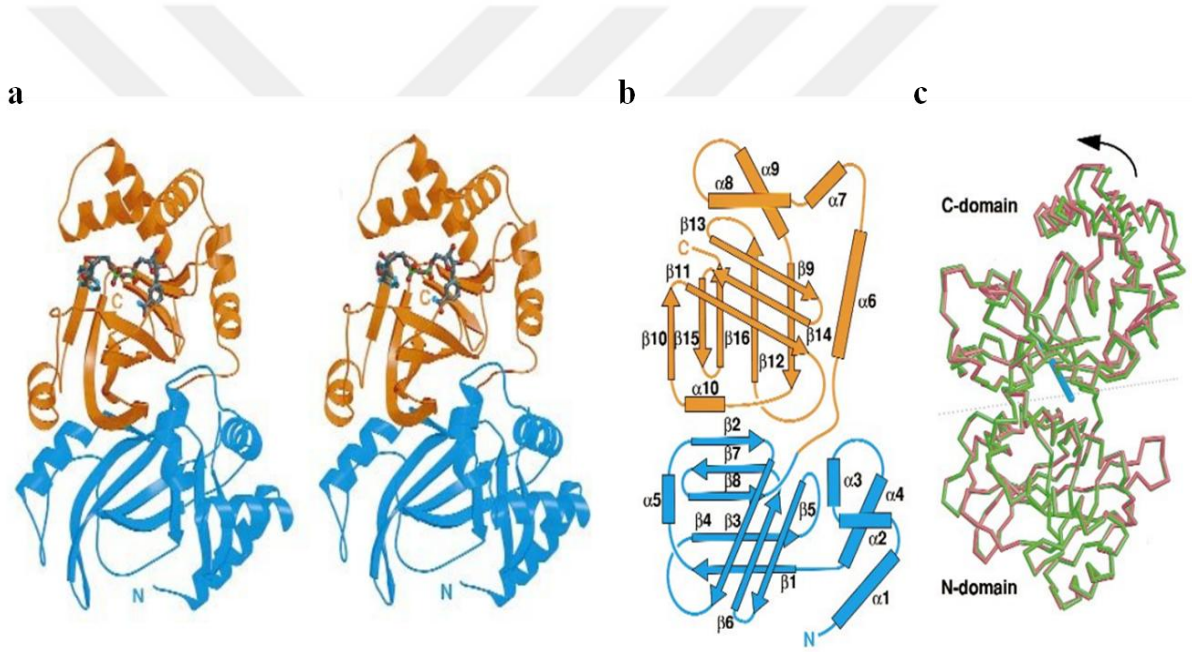
Kolera toksini gibi klasik bakteriyal A-B toksinleri bir veya birkaç polipeptit ihtiva eden bir kompleks olarak hücrelerle etkileşim halindedir. Alternatif olarak, *Clostridium* ve *Bacillus* cinsinden gram pozitif basiller, iki proteinin hücre yüzeyine bağlanmadan önce bir küme oluşturmayan, ikili etki mekanizmasına sahip proteinler üretmektedir (A + B toksinleri) (Barth vd., 2004). *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium spiriforme* ve *Bacillus anthracis*'e ait Vip1/Vip2 toksini memeli toksinleri ile ilişkili olan A+B toksininin bir örneğidir. Memeli toksinleri ile dizi homolojisi, bireysel proteinlerin toksisitesinin eksikliği ve *vip1* geninin translasyonel çerçeve kayma mutasyonu deneyleri ve duyarlı böceklerle karşı yapılan toksisite deneyleri bu proteinlerin ikili etkileşim tarzını doğrulamıştır (Warren, 1997).

Vip1Aa ve Vip2Aa proteinlerinin dizi analizi, sırasıyla, yaklaşık 30 ve 50 aminoasitlik bir N-terminal sinyal peptidinin varlığını ortaya koymuştur (Warren vd., 1998; Shi vd., 2004, 2007). Sinyal peptidinin salgılama sırasında ayrıldığı gösterilmiş, yaklaşık 82 kDa (Vip1Aa) ve 45 kDa (Vip2Aa) büyüklüğünde olgun proteinler elde edilmiştir (Warren, 1997; Bi vd., 2015). Dizi hizalanması, Vip1'in N-terminal bölümünün oldukça korunmuş (% 75-91) olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aksine, Vip1'in C-terminal kısmı daha az (% 23-35) korunmuştur (Warren, 1997; Shi vd., 2004, 2007).

Vip1, *C. botulinum*'in C2 toksininin C2-II bağlanma bileşeni ile % 29, *C. perfringens*'in iota toksininin Ib'si ile % 31, *C. spiroforme* toksini ile % 33, *B. anthracis* koruyucu antijeni ile % 38 ve *C. difficile* B toksininin 142-569 arasındaki aminoasitler ile önemli sekans benzerliğine sahiptir (Shi vd., 2004, 2007; Leuber vd., 2006). Vip2, klostridial Rho-ADP-ribozilasyonlu ekzotoksin C3 ile % 30'dan fazla sekans benzerliği göstermektedir (Han vd., 1999). Bu homolojiler Vip1 proteininin "B" olarak adlandırılan bileşen ve Vip2 proteininin ikili toksinin "A" bileşeni olduğunu ileri sürmektedir (Barth vd., 2004). Vip1 bağlanma ve translokasyon bileşeni (kanal oluşturma proteini) olarak

hareket ederken, Vip2 hücreye girerek toksik etkisini gösterir (Blaustein vd., 1989; Schmid vd., 1994; Knapp vd., 2002).

Vip2, NAD'ye bağlı bir aktin-ADP-ribozilasyon toksini olup, iki özgün domaine sahiptir: 60'dan 265'e kadar olan aminoasitler N-terminal domaini ve 266'dan 461'e kadar olan aminoasitler C-terminal domainidir (Han vd., 1999). Birbirleri ile sınırlı dizi benzerliğine rağmen, Vip2 N- ve C-terminal domainlerinin kristalografik yapı analizi kendi yapılarında homoloji göstermiştir. Her bir domain çekirdeği temelde üç iplikli bir antiparalel β -tabaka ve bir beş iplikli karışık β -tabakasının dikey paketlenmesi ile oluşturulmuştur (Han vd., 1999). Her bir domainin genel katlanması klasik A-B toksinlerinin katalitik alanlarına benzemektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Aktive edilmiş Vip2Aa'nın üç boyutlu yapısı. a) 2 domainin genel katlanması. Mavi: N-domaini; Turuncu: C-domaini. b) Domainler ve ikincil yapı terminoloji arasındaki homolojiyi gösteren şematik katlama düzeni. c) Vip2'nin açık durumunun (yeşil) ve kapalı durumunun (kırmızı) üst üste yerleşimi. Kapalı durumda NAD bağlayıcı yarık kapatılır (Han vd., 1999).

1.3.1.2. Vip1/Vip2 Toksininin İnsektisidal Aktivitesi

Vip1 ve Vip2'nin toksisitesi, Coleoptera (11 tür), Lepidoptera (12 tür), Diptera (2 tür), Homoptera (1 tür) ve Nematoda (2 tür) takımlarına ait çeşitli böcek türlerine karşı test edilmiştir (Tablo 1). Şu ana kadar, 8 Coleopteran türüne ve Homopteran *Aphis gossypii*'ye

karşı toksisite tespit edilmiştir (Warren, 1997; Boets vd., 2011; Sattar ve Maiti, 2011; Yu vd., 2011b; Shingote vd., 2013b; Bi vd., 2015) .

Tablo 1. Vip1 ve Vip2 protoksinlerinin bireysel ve ikili toksinler olarak kombinasyonlarının insektisidal spektrumu (Chakroun, 2016).

Protein	Takım	Tür	Aktivite	Referans	
Vip1Aa	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Warren, 1997	
Vip1Ac	Coleoptera	<i>Holotrichia oblita</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Tenebrio molitor</i>	-	Shi vd., 2004	
	Lepidoptera	<i>Chilo suppressalis</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Spodoptera litura</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Yu vd., 2004	
	Diptera	<i>Spodoptera exigua</i>	-	Shi vd., 2011	
		<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Shi vd., 2004	
Vip1Ad	Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	-	Yu vd., 2011	
		Coleoptera	<i>Anomala corpulenta</i>	-	Bi vd., 2015
		<i>Holotrichia oblita</i>	-	Bi vd., 2015	
Vip1Ae	Coleoptera	<i>Holotrichia parallela</i>	-	Bi vd., 2015	
		Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	-	Sattar ve Maiti, 2011
		Vip1Da	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-
Vip2Aa	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Warren, 1997	
Vip2Ac	Coleoptera	<i>Tenebrio molitor</i>	-	Shi vd., 2004	
	Lepidoptera	<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Shi vd., 2004	
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Shi vd., 2004	
		<i>Spodoptera litura</i>	-	Shi vd., 2004	
Vip2Ad	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Boets vd., 2011	
Vip2Ae	Coleoptera	<i>Holotrichia oblita</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Tenebrio molitor</i>	-	Yu vd., 2011	
	Lepidoptera	<i>Chilo suppressalis</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Yu vd., 2011	
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Yu vd., 2011	
	Diptera	<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Yu vd., 2011	
	Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	-	Sattar ve Maiti, 2011	

Tablo 1'in devamı

Vip2Ag	Coleoptera	<i>Anomala corpulenta</i>	-	Bi vd., 2015
		<i>Holotrichia oblita</i>	-	Bi vd., 2015
		<i>Holotrichia parallela</i>	-	Bi vd., 2015
Vip1Aa+Vip2Aa	Coleoptera	<i>Diabrotica longicornis</i>	+	Warren, 1997
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	+	Warren, 1997
		<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Warren, 1997
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	-	Warren, 1997
		<i>Tenebrio molitor</i>	-	Warren, 1997
	Lepidoptera	<i>Agrotis ipsilon</i>	-	Warren, 1997
		<i>Heliothis virescens</i>	-	Warren, 1997
		<i>Helicoverpa zea, Manduca sexta</i>	-	Warren, 1997
		<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	Warren, 1997
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Warren, 1997
Diptera	<i>Culex pipiens</i>	-	Warren, 1997	
Vip1Aa+Vip2Ab	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Warren, 1997
Vip1Ab+Vip2Aa	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Warren, 1997
Vip1Ab+Vip2Ab	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Warren, 1997
Vip1Ac+Vip2Ac	Coleoptera	<i>Tenebrio molitor</i>	-	Shi vd., 2004
	Lepidoptera	<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Shi vd., 2004
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Shi vd., 2004
		<i>Spodoptera litura</i>	-	Shi vd., 2004
Vip1Ac+Vip2Ae	Coleoptera	<i>Holotrichia oblita</i>	-	Yu vd., 2011
		<i>Tenebrio molitor</i>	-	Yu vd., 2011
	Lepidoptera	<i>Chilo suppressalis</i>	-	Yu vd., 2011
		<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Yu vd., 2011
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Yu vd., 2011
	Diptera	<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Yu vd., 2011
	Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	+	Yu vd., 2011
	Vip1Ad+Vip2Ag	Coleoptera	<i>Anomala corpulenta</i>	+
<i>Holotrichia oblita</i>			+	Bi vd., 2015
<i>Holotrichia parallela</i>			+	Bi vd., 2015
Vip1Ae+Vip2Ae	Homoptera	<i>Aphis gossypii</i>	+	Sattar ve Maiti, 2011

Tablo 1'in devamı

Vip1Ca+Vip2Aa	Coleoptera	<i>Tenebrio molitor</i>	-	Shi vd., 2007
	Lepidoptera	<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Shi vd., 2007
		<i>Spodoptera exigua</i>	-	Shi vd., 2007
		<i>Spodoptera litura</i>	-	Shi vd., 2007
	Diptera	<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Shi vd., 2007
Vip1Da+Vip2Ad	Coleoptera	<i>Anthonomus grandis</i>	+	Boets vd., 2011
		<i>Diabrotica barberi</i>	+	Boets vd., 2011
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	+	Boets vd., 2011
		<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Boets vd., 2011
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	+	Boets vd., 2011
	Lepidoptera	<i>Heliothis virescens</i>	-	Boets vd., 2011
		<i>Helicoverpa zea, Manduca sexta</i>	-	Boets vd., 2011
		<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	Boets vd., 2011
		<i>Spodoptera frugiperda</i>	-	Boets vd., 2011
		<i>Spodoptera littoralis</i>	-	Boets vd., 2011
		<i>Sesamia nonagrioides</i>	-	Boets vd., 2011
Vip1Ac-benzeri/ Vip2Ac-benzeri	Coleoptera	<i>Sitophilus zeamais</i>	+	Shingote vd., 2013
Vip1/Vip2	Nematoda	<i>Pristionchus pacificus</i>	-	Iatsenko vd., 2014
		<i>Caenorhabditis elegans</i>	-	Iatsenko vd., 2014
Vip1Ba1- Vip2Ba1	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Schnepf vd., 2003
Vip1Aa2- Vip2Aa2	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Feitelson vd., 2003
	Lepidoptera	<i>Heliothis virescens, Helicoverpa zea</i>	-	Feitelson vd., 2003
Vip1Bb1- Vip2Bb1	Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	+	Feitelson vd., 2003
	Lepidoptera	<i>Heliothis virescens, Helicoverpa zea</i>	-	Feitelson vd., 2003

Yapılan bir çok çalışma ile Vip1 ve Vip2'nin ikili bir toksin olarak hareket ettiği *in vivo* olarak gösterilmiştir (Warren, 1997; Boets vd., 2011; Sattar ve Maiti, 2011; Yu vd., 2011b; Shingote vd., 2013b; Bi vd., 2015).

Her iki protein kombinasyon halinde kullanıldıklarında etkili olurken tek başına ifade edildiğinde çok az veya hiç aktivite göstermemişlerdir (Warren, 1997; Boets vd., 2011; Sattar ve Maiti, 2011; Yu vd., 2011b; Bi vd., 2015). Bu toksinlerin bir diğer ilginç özelliği ise farklı protein çiftlerinin birleştirilmesiyle yapılan deneylerden de etkili sonuçlar alınmasıdır. Vip1Aa/Vip2Aa çifti *Diabrotica*'ya karşı aktif iken Vip1Ab/Vip2Ab çiftinin aktif olmadığı görülmüştür. İlginç olarak, Vip1Aa/Vip2Ab çifti aktif iken, Vip1Ab/Vip2Aa çifti aktif değildir. Bu da Vip1Ab/Vip2Ab çiftinin *D. virgifera*'ya toksisitesinin eksikliğinin Vip1Ab bileşeninden kaynaklandığını düşündürmektedir (Warren, 1997).

1.3.1.3. Vip1/Vip2 Toksininin Etki Şekli

Vip1/Vip2 toksininin insektisidal aktivitesinin moleküler mekanizması tamamen anlaşılammıştır. Toksinin larva tarafından tüketilmesiyle başlar, muhtemelen tripsin benzeri proteazlar ile orta bağırsağın proteolitik aktivasyonu izlemektedir (Chakroun, 2015).

Vip1Ac'nin aktive edilmiş 66 kDa monomerinin, yedi tane Vip1 molekülünü içeren oligomeri oluşturduğu gösterilmiştir (Leuber vd., 2006). Bu oligomerler, orta bağırsak fırça kenar membranındaki spesifik reseptörleri tanır ve daha sonra membrana ilişirir. Vip1 bileşeninin reseptör tanınmasına dair kanıt, kısmen, *Diabrotica virgifera* için toksisitesini kaybetmeden Vip1Aa'nın Vip1Ab ile değiştirilememesi gerçeği ile sağlanmıştır (Warren, 1997).

Vip1Aa ve Vip1Ab, N-terminal domaininde % 97 ve C-terminalinde sadece % 31 homoloji paylaşmaktadır. Bu da proteinlerin C-terminal domaininin böcek özgüllüğünde rol aldığını düşündürmektedir. Ligand blot deneyleri ile bir Vip1 proteini için tarif edilen ilk reseptör, *A. gossypii*'de tanımlanan yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde bir proteindir ve duyarlı olmayan böceklerin BBMV ((Brush border membrane vesicle (fırça kenarlı zar vezikülleri))'sine bağlanma gözlenmemiştir (Sattar ve Maiti, 2011).

In vitro deneyler ile, yapay lipit çift katmanında Vip1'in zar gözenekleri oluşturduğu gösterilmiştir (Leuber vd., 2006). Gözenekler iki farklı iletkenlik durumuna sahiptir, bu da iki farklı kanalın aynı anda oluştuğunu düşündürmektedir. Vip1Ac kanallarının asimetrik ve orta derecede anyonlu olduğu bulunmuştur. Vip1'in varsayılan kanal oluşum alanı, kanalın seçiciliğine katkıda buldukları öne sürülen iki negatif yüklü (E340 ve E345) ve

iki pozitif yüklü aminoasit (K351 ve H363) içerir (Leuber vd., 2006). Cry ve Vip3 proteinleri tarafından oluşturulan gözeneklerin aksine, Vip2 bileşeni yokluğunda Vip1 tarafından oluşturulan gözeneklerin duyarlı böcekler için toksik etkisi yoktur (Leuber vd., 2006).

Vip1 gözenekleri, Vip2'nin hücre içine girmesiyle aktinin polimerizasyonu önlenecek ve böylece mikrofilament ağı oluşumunu engellenerek dengesiz hale getirilmesiyle toksik etkisini göstereceği bir kanal sağlayacaktır (Han vd., 1999). Katalitik Vip2 domaini, ADP-riboz grubunun NAD'den aktin polimerizasyonunu önleyecek büyük sitoskeleton oluşturma proteinine (aktin) transferini katalize etmektedir (Han vd., 1999; Jucovic vd., 2008).

1.3.1.4. Vip1/Vip2 Toksininin Bitkilerde İfadesi

Bir mısır zararlısı olan *D. virgifera*'ya karşı Vip1 ve Vip2'nin etkili toksinler olarak ekonomik öneme sahip olmasına rağmen, bitkilerde ikili toksinin ifadesi, Vip2 proteininin sitolitik aktivitesi bilinmediğinden mümkün değildir (Chakroun, 2015). Oysa, mayadaki Vip2 ifadesi, ciddi gelişimsel patoloji ve fenotipik değişikliklerle sonuçlanmıştır (Jucovic vd., 2008). Bu sorunun üstesinden gelebilmek için Jucovic ve arkadaşları (2008), "ProVip2" adı verilen bir zimojenik Vip2 formunun sentezlenmesinden oluşan yeni bir zimojen stratejisini tasarlamıştır. Vip2 proenzimi, proteinin C-terminal kısmının, enzimatik aktiviteyi maskeleyecek şekilde uzatılmasıyla elde edilmiştir. C-terminali eklenmiş olan peptid, *D. virgifera* orta bağırsak enzimlerinin proteolitik etkisi ile etkili bir şekilde yok edildiği gösterilmiştir ve ProVip2 transgenik mısır ve Vip1 ihtiva eden bir diyet ile böcekler tamamen öldürülmüştür.

1.3.2. Vip3 Proteini

B. thuringiensis'in vejetatif büyüme evresinde Vip1 ve Vip2 proteinlerine benzer şekilde Vip3 proteinleri de üretilir ve aşılardan 15 saat sonra sporülasyonun ötesine geçerek yüksek stabilitesini gösterir ve kültür süpernatantlarında tespit edilebilir (Estruch vd., 1996; Mesrati vd., 2005).

vip3Aa16 geni üzerinde yapılan bir araştırma ile transkripsiyon başlangıç noktasının başlangıç kodonunun 101 bp üstünde bulunduğu ve promotor -35 ve -10 bölgelerinin *B.*

subtilis promotörü σ^E ile *B. thuringiensis* promotörü σ^{35} 'e çok benzediği ve bu da *vip3Aa16* geninin bir holoenzim $E\sigma^{35}$ ile kopyalandığı rapor edilmiştir (Mesrati vd., 2005).

Vip3 proteinlerini kodlayan genler *B. thuringiensis* suşları arasında yaygın olarak bulunur. Yapılan bazı çalışmalar ile test edilen suşların % 50 ile % 87'sinde, *cry1* ile *cry2* genleri taşıyan suşların % 90'ında bile bu genler bulunmuştur (Espinasse vd., 2003; Mesrati vd., 2005a; Beard vd., 2008; Hernandez-Rodriguez vd., 2009, Yu vd., 2011a).

vip3 genleri yaklaşık 2,4 kb uzunluğundadır ve normal olarak büyük plazmidlerde taşınırlar (Wu vd., 2004; Mesrati vd., 2005a), ancak bazı durumlarda bakteri kromozomunda buldukları öngörülmüştür (Franco Rivera vd., 2004).

Bugüne kadar 64 tane *vip3Aa*, 2 tane *vip3Ab*, 1 tane *vip3Ac*, 6 tane *vip3Ad*, 1 tane *vip3Ae*, 4 tane *vip3Af*, 15 tane *vip3Ag*, 1 tane *vip3Ah*, 1 tane *vip3Ai*, 2 tane *vip3Aj*, 2 tane *vip3Ba*, 3 tane *vip3Bb* ve 4 tane *vip3Ca* geni bildirilmiştir (Crickmore vd., 2017).

Vip3 proteinleri üzerine yapılan en çok çalışma, Vip3Aa proteinleri ile gerçekleştirilmiştir. Vip3B, Vip3C ve daha az yaygın olan diğer Vip3A (Vip3Ab, Vip3Ac, gibi) proteinleri hakkında çok az bilgi mevcuttur.

1.3.2.1. Vip3 Proteininin Yapısı ve Fonksiyonu

Vip3 proteinlerindeki aminoasitlerin sayısı 787 civarındadır ve ortalama moleküler kütlesi 89 kDa'dur. Vip3 proteinlerinin N-terminal'inin yarısı oldukça korunmuşken, C-terminal bölgesi oldukça değişkendir (Rang vd., 2005; Wu vd., 2007; Ruiz de Escudero vd., 2014). Bu nedenle C-terminalinin hedef özgülüğü ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Wu vd., 2007).

Vip3A proteinleri üç sistein kalıntısı içerir. Deneysel olarak disülfid bağlarının varlığını saptamak için bu üç kalıntıdan her birinde nokta mutasyonları yapılmıştır. Aktivitenin kaybı, bir disülfid bağının parçalanmasından ziyade tripsin duyarlılığı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Dong vd., 2012).

Vip3 proteinlerinin N-ucu, proteinin hücre zarı boyunca periplazmik boşluğa translokasyonundan sorumlu olan bir sinyal peptidi içermektedir. Birkaç pozitif yüklü aminoasitten meydana gelir, bunu takiben *B. thuringiensis*'den salgılamadan sonra çıkartılmayan bir hidrofobik bölge oluşur (Estruch vd., 1996; Doss vd., 2002; Chen vd., 2003). Sinyal peptidi uzunluğu protein sekansına ve tahmin için kullanılan programa bağlı olarak değişir ve 11 ila 28 aminoasit arasındadır (Estruch vd., 1996; Doss vd., 2002; Chen

vd., 2003). Proteinlerin salgılanması yaygın olarak sinyal peptidinin eksizyonunu gerektirdiğinden, Vip3 proteinlerinin salgı mekanizması halen belirsizdir.

Vip3A proteinlerinin N-terminal bölgesinin oldukça korunmuş aminoasit dizisi, bu bölgenin protein katlanmasında veya membran reseptörlerine doğrudan bağlanmada önemli bir rol oynaması gerektiğinin bir göstergesidir (Chakroun, 2015). Bununla birlikte mutant Vip3A proteinlerinin insektisidal aktivitesini N-terminal ucundaki delesyonlarla test eden deneylerde çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

İlk 198 aminoasitin silinmesi, *Helicoverpa armigera* ve *Spodoptera exigua*'ya karşı toksisiteyi ortadan kaldırmıştır (Li vd., 2007). Bu silinen kısım, Estruch ve diğerleri (2001) tarafından tanımlanan 20 kDa proteolitik fragmente karşılık gelmektedir. Vip3Aa'dan gelen 27 N-terminal aminoasitin silinmesi, toplam çözünürlük kaybına bağlı olarak pasif bir protein oluşturmuştur (Chen vd., 2003).

Vip3Aa'dan 39 N-terminal aminoasitin silinmesi, bu proteinin iki duyarlı böcek türüne (*Spodoptera littura* ve *Chillo partellus*) karşı toksikliğini farklı şekilde etkilemiştir (Selvapandiyan vd., 2001). Yukarıdaki sonuçların tersine, Gayen ve arkadaşları (2012), 200 N-terminal aminoasitin silinmesinin, *H. armigera*, *A. ipsilon*, *S. littoralis* ve *Scirpophaga incertulas*'a karşı çekirdek aktif toksininin insektisidal potansiyelini yaklaşık 2-3 misli arttırdığını bulmuştur. Benzer şekilde, başka bir çalışmada, Vip3Aa N-terminalinden 33 aminoasitin yok edilmesiyle, *S. littura*, *Plutella xylostella* ve *Earias vitella*'ya karşı toksisite kaybına neden olmamıştır (Bhalla vd., 2005).

Bazı C-terminal değişikliklerinin fonksiyonu da incelenmiştir ancak genel bir sonuca varılamamıştır. Genellikle aynı değişikliğin etkisi farklı böcek türleri arasında değişir ve bazı bölgelerin katkısı veya toksisitesi için Vip3A proteinlerinin pozisyonlarının katkısı konusunda bir fikir birliği sağlanamamıştır (Selvapandiyan vd., 2001; Chen vd., 2003; Bhalla vd., 2005; Li vd., 2007; Gayen vd., 2012).

C-terminalinin son aminoasitlerinin Vip3 proteinlerinin aktivitesi ve kararlılığı açısından kritik olduğu konusunda genel bir mutabakat vardır. Çünkü bunların silinmesi, koruyucu olmayan kalıntılarla yer değiştirme veya proteinin sonuna aminoasitler eklenmesi protein aktivitesini ve proteazlara karşı kararlılığı tamamen ortadan kaldırmıştır (Estruch vd., 2001; Selvapandiyan vd., 2001; Li vd., 2007; Gayen vd., 2012).

Vip3Aa1'in C-ucundaki üçlü mutasyonu *A. ipsilon* larvalarının orta bağırsak sıvısı tarafından tamamen hidrolize edilen ancak Sf9 hücrelerine karşı toksikliğini koruyan kararsız bir protein ile sonuçlanmıştır (Estruch vd., 2001).

Vip3Aa1 ile hem Vip3B hem de Vip3C proteinleri arasında bazı farklılıklar vardır. Bu farklılıklar, Vip3A proteinlerinde olduğu gibi, C-terminalinde maksimum uyuşmazlık bulunmasına rağmen, protein dizisi boyunca dağılmıştır. Vip3B ve Vip3C'nin varsayılan sinyal dizisinin N-ucu neredeyse tüm Vip3A toksinlerindeki ile aynıdır. Proteolitik işleme bölgeleri, üç Vip3 proteini arasında daha az korunmuştur, ancak protein sekansının ortasında önemli farklılıklar bulunur. Vip3C için birinci işleme bölgesinin aşağısına 5 aminoasit ilavesi ve Vip3B için ikinci işleme bölgesinin aşağısına doğru 17 aminoasit eklenmesi 66 kDa ila 69 kDa "aktif form" toksinin beklenen boyutunda bir değişikliğe neden olabilir. Vip3B eklenmiş sekans, yüksek miktarda negatif yüklü aminoasitler (D ve E) ve sistein kalıntıları ile karakterize edilen DCCEE motifinin üç tekrarından oluşur. Vip3B proteinlerinde bulunan toplam 11 sistein kalıntısından sekizi (% 78) bu eklenen sekansta bulunur (Rang vd., 2005; Palma vd., 2012; Chakroun, 2015). Bu tekrarlı motifin eklenmesinin, bu proteinlerin sınırlı insektisidal aktivitesine katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

Vip3 proteinlerinin konformasyonel yapısı açıklığa kavuşmamıştır. İkincil yapı tahmini, N-terminal parçasının esas olarak α -heliks yapılarından oluştuğunu, buna karşılık C-terminal parçasının temel bileşeninin böcek özgüllüğünde öngörülen rolü ile tutarlı olacak şekilde β -heliks yapıları ve bobinler olduğunu ileri sürmektedir (Rang vd., 2005; Wu vd., 2007).

Vip3 proteinlerinin grup dışındaki herhangi bir proteine homoloji göstermemesi, yapı homolojisine dayalı silico modellemeyi önler (Chakroun, 2015). Vip3 proteininin son 200 aminoasite karşılık gelen kısmen üçüncül yapısı, Cry proteinlerinin II domainine homoloji ile modellenmiştir (Wu vd., 2007).

1.3.2.2. Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Aktivitesi

Vip3 proteinlerinin insektisidal aktivitesiyle ilgili bilgiler genellikle Vip3Aa alt sınıfının proteinleri ile elde edilmiştir ve Vip3B, Vip3C ve Vip3Aa alt sınıfından farklı olan diğer Vip3A'larının toksikliği hakkında çok az veri mevcuttur.

1.3.2.2.1. Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Spektrumları

Vip3A proteinleri çok sayıda lepidopteran böcekler için toksiktir. Vip3A proteinlerinin, Cry proteinlerine karşı toleranslı oldukları bilinen *Agrotis* cinsi böcek türlerine ve Cry proteinlerine nispeten daha az duyarlı olan *Spodoptera* cinsinden türlere karşı çok aktif oldukları söylenebilir (Van Frankenhuyzen ve Nystrom, 2009). Bu bağlamda *B. thuringiensis* HD-1 suşundan *vip3A* geninin silinmesinin *A. ipsilon* ve *S. exigua*'ya karşı toksikliğini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Donovan vd., 2001). Öte yandan, *Ostrinia nubilalis*, *Culex quinquefasciatus* ve *Chironomus tepperi* gibi Cry proteinlerine duyarlı diğer türlerin, test edilen herhangi bir Vip3A proteinine karşı çok az duyarlı olduğu veya duyarlı olmadığı görülmüştür (Estruch vd., 1996; Yu vd., 1997; Doss vd., 2002; Yu vd., 2012).

Dikkate alınan böcek türlerine bağlı olarak Vip3 proteinleri ile mortaliteye bu proteinin yüksek bir konsantrasyonunda ulaşılırken, düşük konsantrasyonlarda güçlü bir büyüme inhibisyonu (ya da tam bir büyüme durması) gözlenmiştir (Jamoussi vd., 2009; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a; Palma vd., 2012; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Ruiz de Escudero vd., 2014). Bu nedenle, "fonksiyonel mortalite" (Ölü böcekler ve L1'de kalanlar), bu durumlarda Vip3 proteininin etkinliğini daha iyi temsil eder (Ali ve Lutrell, 2011; Chakroun vd., 2012; Ruiz de Escudero vd., 2014).

Tablo 2, Vip3Aa proteinlerinin insektisidal etkinliği hakkında rapor edilen sonuçları özetlemektedir (Chakroun, 2015). Sadece protoksin formunun değerleri verildiğinden, protoksin ile aktive edilmiş form arasındaki insektisidal aktivite farklılıkları gösteren raporlar olmadığı için (Ruiz de Escudero vd., 2014) yalnızca *S. exigua*'ya karşı Vip3Aa16 ve *Spodoptera frugiperda*'ya karşı Vip3Af1 değerleri verilmiştir (Chakroun vd., 2012; Hernández-Martínez vd., 2013).

Vip3Aa sekansları arasındaki çok küçük farklılıklar olmasına rağmen, bazı proteinler aynı böcek türlerine karşı toksisite bakımından önemli farklılıklar gösterebilir (Selvapandiyan vd., 2001; Palma vd., 2013; Ruiz de Escudero vd., 2014). Örneğin test edilen tüm Vip3Aa proteinleri arasında sadece Vip3Aa1 ve Vip3Aa14, *H. armigera*'ya karşı düşük veya aktif olmayan olarak tanımlanmıştır (Tablo 2). Bununla birlikte, Tablo 2'deki verilerin çoğunun farklı laboratuvarlarda elde edildiği göz önüne alındığında, insektisidal farklılıkların, protein hazırlamada kullanılan protokol, numunenin saflığı, miktar tayini yöntemi, biyotest koşulları ya da böcek popülasyonları arasında değişkenlik

gibi protein dizilimindeki hafif farklılıklar dışındaki faktörlerden kaynaklanma olasılığı yüksektir (Chakroun, 2015).

Hernández-Martínez ve arkadaşları (2013), metal-şelat kromatografisiyle saflaştırıldıktan sonra Vip3A proteinlerinin toksisitesindeki azalmayı kanıtlamıştır. Saflaştırma yönteminin etkisi ikili (tandem) protein hedef türlerine bağlıdır. Bu etki aynı zamanda Cry proteinleri için de tarif edilmiştir (Hernández-Rodríguez vd., 2012).

Ali ve Lutrell (2011), *Helicoverpa zea* ve *Heliothis virescens*'in Vip3Aa'ya karşı gösterdiği insektisidal tepkisinin aynı proteinin farklı grupları arasında büyük ölçüde değiştiğini bulmuştur. Ayrıca, birkaç alan ve laboratuvar popülasyonu arasında ve beş ardışık mevsimde oldukça değişkenlik bildirilmiştir. Tablo 3, Vip3Aa dışındaki Vip3A proteinleri üzerindeki biyotest verilerini özetlemektedir. Tablo 4 ise, Vip3A dışındaki Vip3 proteinlerinin tablosudur.

Tablo 2. Vip3Aa alt ailelerine ait proteinlerinin aktivite ve toksisite spektrumu (Chakroun, 2016).

Protein	Tür	Aktivite	Referans
Vip3A	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Yu vd., 1997; Lee vd., 2003; Gayen vd., 2012; 2015
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	Yu vd., 1997; Lee vd., 2003
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Yu vd., 1997; Lee vd., 2003
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Liao vd., 2002; Gayen vd., 2012; 2015
	<i>Helicoverpa punctigera</i>	+	Liao vd., 2002
	<i>Heliothis virescens</i>	+	Liao vd., 2002
	<i>Helicoverpa zea</i>	+	Liao vd., 2002; Lee vd., 2003
	<i>Danaus plexippus</i>	-	Lee vd., 2003
	<i>Manduca sexta</i>	+	Lee vd., 2003
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Gayen vd., 2012; 2015
	<i>S. incertulas</i>	+	Gayen vd., 2012; 2015
Vip3Aa1	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Estruch vd., 1996; Hernández-Martínez vd., 2013
	<i>Heliothis virescens</i>	+	Estruch vd., 1996
	<i>Helicoverpa zea</i>	+	Estruch vd., 1996; Fang vd., 2007
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	Estruch vd., 1996
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Estruch vd., 1996
	<i>Bombyx mori</i>	+	Fang vd., 2007
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Estruch vd., 1996; Fang vd., 2007; Sena vd., 2009; Hernández-Martínez vd., 2013

Tablo 2'nin devamı

	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
Vip3Aa7	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Song vd., 2008
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Song vd., 2008; Dong vd., 2012a, b
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Song vd., 2008
Vip3Aa9	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Selvapandiyan vd., 2001
	<i>Chilo partellus</i>	+	Selvapandiyan vd., 2001
	<i>Phthorimea operculella</i>	+	Selvapandiyan vd., 2001
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Selvapandiyan vd., 2001
	<i>Spodoptera litura</i>	+	Selvapandiyan vd., 2001
Vip3Aa10	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Doss vd., 2002
	<i>Bombyx mori</i>	-	Doss vd., 2002
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Doss vd., 2002
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Doss vd., 2002
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Doss vd., 2002
	<i>Spodoptera litura</i>	+	Doss vd., 2002
Vip3Aa11	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Ostrinia furnacalis</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Liu vd., 2007
Vip3Aa13	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Chen vd., 2003
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Chen vd., 2003
	<i>Spodoptera litura</i>	+	Chen vd., 2003
Vip3Aa14	<i>Earias vitella</i>	+	Bhalla vd., 2005
	<i>Helicoverpa armigera</i>	-	Bhalla vd., 2005; Saraswathy vd., 2008
	<i>Pieris brassicae</i>	-	Bhalla vd., 2005
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Bhalla vd., 2005
	<i>Spodoptera litura</i>	+	Bhalla vd., 2005; Saraswathy vd., 2008
	<i>Plutella xylostella</i>	-	Saraswathy vd., 2008
Vip3Aa16	<i>Prays oleae</i>	+	Abdelkefi-Mesrati vd., 2009
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a
	<i>Ephestia kuehniella</i>	+	Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Chakroun vd., 2012

Tablo 2'nin devamı

	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Chakroun vd., 2012
	<i>Agrotis segetum</i>	+	Ben Hamadou vd., 2013
	<i>Tuta absoluta</i>	+	Sellami vd., 2015
	<i>Ectomyelois ceratoniae</i>	+	Boukedi vd., 2015
Vip3Aa19	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Ostrinia furnacalis</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Plutella xylostella</i>	+	Liu vd., 2007; Gulzar vd., 2015
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Liu vd., 2007
	<i>Heliothis virescens</i>	+	Gulzar vd., 2015
	<i>Helicoverpa zea</i>	+	Welch vd., 2015
Vip3Aa29	<i>Culex quinquefasciatus</i>	-	Yu vd., 2012
	<i>Chilo suppressalis</i>	+	Yu vd., 2012
	<i>Chironomus tepperi</i>	-	Yu vd., 2012
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Yu vd., 2012
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Yu vd., 2012
Vip3Aa43	<i>Spodoptera albula</i>	+	Bergamasco vd., 2013
	<i>Spodoptera cosmioides</i>	+	Bergamasco vd., 2013
	<i>Spodoptera eridania</i>	+	Bergamasco vd., 2013
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Bergamasco vd., 2013
Vip3Aa45	<i>Chrysodeixis chalcites</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Palma vd., 2013
Vip3Aa50	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	+	Figueiredo vd., 2013
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Figueiredo vd., 2013
Vip3Aa58	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Baranek vd., 2015
	<i>Cydia pomonella</i>	+	Baranek vd., 2015
	<i>Dendrolimus pini</i>	+	Baranek vd., 2015
Vip3Aa59	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Baranek vd., 2015
	<i>Cydia pomonella</i>	+	Baranek vd., 2015
	<i>Dendrolimus pini</i>	+	Baranek vd., 2015

Tablo 3. Vip3Aa alt ailesi dışındaki Vip3A proteinlerinin aktivite ve toksisite spektrumu (Chakroun, 2016).

Protein	Tür	Aktivite	Referans
Vip3Ab1	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
Vip3Ac1	<i>Anopheles gambiae</i>	-	Fang vd., 2007
	<i>Bombyx mori</i>	+	Fang vd., 2007
	<i>Helicoverpa zea</i>	+	Fang vd., 2007
	<i>Diabrotica virgifera</i>	-	Fang vd., 2007
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	Fang vd., 2007
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Fang vd., 2007
Vip3Ad2	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Hernández Martínez vd., 2013
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Hernández Martínez vd., 2013
Vip3Ae1	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Hernández Martínez vd., 2013
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Hernández Martínez vd., 2013
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Caccia vd., 2014
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Caccia vd., 2014
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
Vip3Af1	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Sena vd., 2009; Hernández Martínez vd., 2013
	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Hernández Martínez vd., 2013
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Ruiz de Escudero vd., 2014
Vip3Ag4	<i>Chrysodeixis chalcites</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Palma vd., 2013
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Palma vd., 2013

Tablo 4. Vip3B ve Vip3C protein ailelerinin aktivite ve toksisite spektrumu (Chakroun, 2016).

Protein	Tür	Aktivite	Referans
Vip3Ba1	<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	Rang vd., 2005
	<i>Plutella xylostella</i>	-	Rang vd., 2005
Vip3Bb2	<i>Aphis gossypii</i>	-	Beard vd., 2008
	<i>Chironomus tepperi</i>	-	Beard vd., 2008
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Beard vd., 2008
	<i>Helicoverpa punctigera</i>	+	Beard vd., 2008
	<i>Tribolium castaneum</i>	-	Beard vd., 2008
Vip3Ca3	<i>Agrotis ipsilon</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Chrysodeixis chalcites</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Helicoverpa armigera</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Lobesia botrana</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Mamestra brassicae</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Spodoptera exigua</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+	Palma vd., 2012
	<i>Trichoplusia ni</i>	+	Palma vd., 2012

1.3.2.2.2. Vip3 Proteinlerinin Diğer İnsektisidal Proteinlerle Etkileşimleri

Vip3Aa ve Cyt2Aa proteinlerinin *E. coli*'de birlikte ifade edildikten sonra *Chilo suppressalis* ve *S. exigua*'ya karşı bu proteinler arasında sinerjizm gözlenmiştir. Buna karşılık, bu protein kombinasyonu *C. quinquefasciatus* üzerinde biraz antagonizme neden olmuştur (Yu vd., 2012). Bergamasco ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada, üç *Spodoptera* türünün (*S. frugiperda*, *S. albula* ve *S. cosmioides*) Vip3A ve Cry1Ia arasındaki sinerjizmi ve *Spodoptera eridania*'daki hafif antagonizmi bildirmişlerdir.

Vip3A, Cry1A ve Cry1Ca proteinleri arasındaki antagonizm *H. virescens*'de tanımlanmıştır (Lemes vd., 2014). Antagonizm Cry1Ca'nın ya Vip3Aa, Vip3Ae ya da

Vip3Af ile ve Vip3Af'nin ya Cry1Aa ya da Cry1Ac kombinasyonlarında bulunmuştur. Aynı çalışmada, Vip3Aa ve Cry1Ca, *S. frugiperda*'da antagonistik, *Diatraea saccharalis*'de sinerjik etki göstermiştir.

Sinerjizm ve antagonizmin altında yatan mekanizma hala bilinmemektedir. Vip3A ve Cry1C proteinleri arasındaki antagonizma için Lemes ve arkadaşları (2014), iki proteinin fiziksel olarak etkileşiminin, bağ epitoplarının zar reseptörüne erişmesini zayıflattıklarını öne sürmüşlerdir. Tersine, sinerjizm, daha önce Cry1Ac ve Cry1Aa için önerildiği üzere, zar ekleme veya gözenek oluşumunu daha iyi olan hetero-oligomer oluşumu ile ilişkili olabilir (Lee vd.,1996).

1.3.2.2.3. Genetik Olarak Tasarlanmış *vip3A* Genleri

Genetik mühendisliği, farklı proteinlerin parçalarını kodlayan ve yeni veya gelişmiş özelliklere sahip yeni genleri elde etmek için kimerik genlerin oluşturulmasına izin verir. Bir proteinin etki alanlarının bilgisi, kimerik proteinlerin tasarımında çok yardımcı olur (Chakroun, 2015).

Vip3A proteinlerinin üçüncül yapısı hakkındaki bilgi eksikliğine rağmen, iki kimera, *vip3Aa* ve *vip3Ac* genleri arasında dizinin takas edilmesi ile konağın özgüllüğünü artırmak amacıyla oluşturulmuştur (Fang vd., 2007). Vip3Aa ve Vip3Ac arasındaki kimeralar, bir proteinin N-terminal bölgesinin yaklaşık 600 aminoasidi ile diğer proteinin C-terminal bölgesinin yaklaşık 180 aminoasidi birleştirilerek oluşturulmuştur (Tablo 5). İki kimerik protein yeni toksisite özelliklerine sahiptir: Vip3AcAa (Vip3Ac'nin N-terminal bölgesi ile birlikte), test edilen tüm böceklere karşı iki orijinal proteinden daha toksik olduğu ve Vip3A'a toleranslı olan *O. nubilalis*'e karşı bile büyüme inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Fakat Vip3AaAc'nin, eşdeğerinden ve orijinal proteinlerden daha az toksik olduğu ve hatta *Bombyx mori*'ye karşı aktiviteyi tamamen kaybettiği belirlenmiştir (Fang vd., 2007) (Tablo 5). Li ve arkadaşları (2007), kimerik Vip3AcAa proteininin son iki amino asitinin değiştirilmesiyle *S. exigua*'ya karşı toksisitede 18 kat artış elde etmiştir.

vip ve *cry* genlerini birleştiren benzer çalışmalar yapılmıştır. *vip3Aa* geninin *cry1A* ile birleşmesi, Cry1Ac'nin toksikliğini muhafaza eden, ancak muhtemelen hatalı Vip3A katlanmasından dolayı Vip3Aa'yı kısmen kaybeden bir füzyon proteini oluşturmuştur (Saraswathy vd., 2008). Bir başka çalışmada, *vip3Aa* geni *cry9Ca*'nın N-ucu ile birleştirilmiş ve ortaya çıkan kimerik protein, muhtemelen Vip3Aa'nın Cry9Ca proteininin

çözünürlüğünü arttırması nedeniyle, bireysel proteinlere ve bunların karışımına göre daha toksik olarak sonuç vermiştir (Dong vd., 2012).

Vip3Aa'nın verimini geliştirmeye yönelik bir başka çalışmada, mutant bir *vip3Aa* geni (Sinyal peptidi silinmiş), Cry1C'nin promotörü ve C-terminalinin yarısı ile kaynaştırılmış ve inklüzyon cisimciklerinde yoğunlaştırılan rekombinant proteininin ekspresyonunda 9 kat artış sağlanmıştır. Ne yazık ki, bu protein, muhtemelen düşük çözünürlük veya proteinin yanlış katlanması nedeniyle, test edilen böceklere karşı orijinal Vip3Aa proteininden daha düşük insektisidal aktivite göstermiştir (Song vd., 2008) (Tablo 5).

Bir başka yaklaşım türü, farklı *cry* genlerini ifade eden *B. thuringiensis* suşlarında *vip3A* genlerinin tanıtılması ve ifadesi, insektisidal formülasyonlarda daha geniş etki spektrumu ile birlikte kullanılacak yeni *B. thuringiensis* suşlarının yaratılması olmuştur.

B. thuringiensis suşlarının ticari formülasyonları, az miktarda Vip proteini içermektedir. Çünkü bu proteinler, formülasyonun işlenmesi sırasında atılan büyüme ortamına salınırlar (Taborsky, 1992). Bu problem, *vip3A* geninin ifadesinin sporülasyona bağımlı promotörler ve farklı *cry* genlerinden spesifik transkripsiyon dizileri kullanarak sporülasyon aşamasına yönlendirmek suretiyle önlenabilir (Arora vd., 2003; Zhu vd., 2005; Thamthiankul Chankhamhaengdech vd., 2008; Sellami vd., 2011).

Bütün bu durumlarda tasarlanmış suşlar, gelişmiş Vip3A proteinlerinin üretilmesini ve test edilen böceklere karşı daha yüksek toksisite göstermiştir. *Pseudomonas fluorescens*'de *vip3Aa* geninin klonlanması ve ifadesi, Vip3A proteinine dayalı püskürtülebilir insektisitlerin üretilmesi amacı ile ya Cry proteinleri ile kombine edilmiş ya da edilmemiş olarak gerçekleştirilmiştir (Hernández-Rodríguez vd., 2013).

Tablo 5. Genetik olarak tasarlanmış Vip3A proteinleri ve böcek toksisitesi üzerine etkileri (Chakroun, 2016).

Protein	Modifikasyon türü	Pozisyonu	Modifikasyonun etkisi	Referans
Vip3AcAa	Domain değiş-tokuşu	Vip3Ac N-terminalinin (600 aa) ve Vip3Aa C-terminalinin (189 aa) birleşimi	<i>O. nubilalis</i> 'e karşı toksisite kazancı; <i>S. frugiperda</i> , <i>H. zea</i> ve <i>B. mori</i> 'ye karşı aktivitenin artırılması	Fang vd., 2007
Vip3AaAc	Domain değiş-tokuşu	Vip3Aa1 N-terminalinin (610 aa) ve Vip3Ac C-terminalinin (179 aa) birleşimi	<i>S. frugiperda</i> ve <i>H. zea</i> 'ya karşı aktivitenin azalması; <i>B. mori</i> 'ye karşı aktivitenin kaybı	Fang vd., 2007
Vip3Aa14	Protein füzyonu	Vip3Aa14 ve Cry1Ac'nin birleştirilmesi	<i>H. armigera</i> ve <i>P. xylostella</i> 'ya karşı Cry1Ac kadar etkilidir ancak <i>S. litura</i> 'ya karşı Vip3Aa'ya kıyasla aktivitenin azalması	Saraswathy vd., 2008
Vip3Aa7	Gen promotor değişimi ve protein füzyon	Kesilmiş Vip3Aa7 (N-terminalinde 39 aa silinmiş) ve Cry1C C-terminali ile Cry1C promotorunun birleşimi	<i>P. xylostella</i> , <i>H. armigera</i> ve <i>S. exigua</i> 'ya karşı aktivitenin azalması	Song vd., 2008
Vip3Aa7	Protein füzyonu	Vip3Aa7 ve Cry9Ca N-terminalinin birleşimi	<i>P. xylostella</i> 'ya karşı aktivitenin artırılması	Dong vd., 2012b

1.3.2.3. Vip3 Proteinlerinin Etki Şekli

Vip3 proteinlerinin etki şekli ile ilgili çalışmalar, Estruch ve arkadaşları tarafından 1996'da keşfedilmesinin hemen ardından başlamıştır. Vip3 proteinleri Cry proteinlerinden yapısal olarak her ne kadar farklı olsalar da, her iki toksin çeşidi de, görünüşte aynı olay dizisiyle toksik eylemlerini uygulamaktadırlar; orta bağırsak proteazlarıyla aktivasyon, peritrofik membrandan geçme, epitelyal orta bağırsak hücrelerinin apikal zarındaki spesifik proteinlere bağlanma ve gözenek oluşumu (Lee vd., 2003).

1.3.2.3.1. Davranışsal ve Histopatolojik Etkiler

Vip3A'nın yenilmesi sonrasında duyarlı böceklerde görülen davranışsal belirtiler, Cry zehirlenmesi sonrası gözlenen davranış belirtilerini andırmaktadır; beslenmenin

kesilmesi, bağırsakta kasılma hareketlerinin kaybı ve böceklerin genel olarak felce uğraması (Yu vd., 1997).

Vip3Aa proteini alımından sonra, duyarlı böceklerin bağırsak kesitlerinin analizi, orta bağırsakta bozuk, şişmiş ve/veya parçalanmış epitel hücreleri ve hücrel materyalin lümenine sızıntısı ile geniş hasar görülmüştür (Yu vd., 1997; Doss, 2002; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Boukedi vd., 2015; Sellami vd., 2015). Ön bağırsakta veya arka bağırsakta ya da hassas olmayan böceklerin orta bağırsağında hasar görülmemiştir (Yu vd., 1997).

1.3.2.3.2. Proteolitik İşlemler

Böcekteki orta bağırsak sıvısı kullanılarak tam uzunluktaki Vip3A'nın *in vitro* proteolizi, bu proteinlerin genelde yaklaşık olarak 62-66, 45, 33 ve 22 kDa gibi birkaç büyük proteolitik ürüne işlendiğini göstermiştir (Yu vd., 1997, Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Sellami vd., 2015). 22 kDa'luk parça, proteinin N-terminal kısmına (1 ila 198 arasındaki aminoasitler), 66 kDa'luk parça ise proteinin geri kalanına karşılık gelir (199'dan sonraki aminoasitler) ve 45 ile 33 kDa fragmentlerinin 66 kDa bölümünden türetildiği düşünülmektedir (Estruch ve Yu, 2001).

Yapılan çalışmalar ile proteinin minimal zehirli parçası da incelenmiştir. Bir çalışmada, proteolizden sonra insektisidal aktivitesini koruyan minimal fragmanın 33 kDa'luk fragment olduğu iddia edilmesine rağmen (Estruch ve Yu, 2001), sonraki çalışmalar 62-66 kDa'luk fragmentin Vip3A toksik çekirdeği olduğu yönündeydi (Lee vd., 2003; Lee vd., 2006; Li vd., 2007; Liu vd., 2011; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a; 2011b; Chakroun vd., 2012; Gayen vd., 2012; Hernández-Martínez vd., 2013; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Caccia vd., 2014; Sellami vd., 2015).

Vip3A proteinlerinin birincil yapısında tanımlanan iki büyük proteolitik işleme yeri vardır. İşleme bölgeleri, lizin kalıntılarında zenginleştirilmiş bir kaç aminoasit bölgeleridir. İlk bölge, Vip3Aa1'deki lizin K198'de bulunur ve iki parçayı saldığı düşünülmektedir: Protoksinin N-ucuna karşılık gelen 22 kDa'lık bir parça ve toksin aktif formu olduğu kabul edilen, 200. aminoasitten sonuna kadar uzanan 66 kDa'lık diğer bir parçadır (Chakroun, 2015).

İkinci proteolitik bölge 455 pozisyonunda bulunur ve 200 ila 455 aminoasit kadar uzanan yaklaşık 33 kDa'luk bir parça salmaktadır (Estruch ve Yu, 2001; Rang vd., 2005). Estruch ve Yu (2001), 33 kDa fragmentini Vip3A proteininin minimal toksik çekirdeği olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Cry proteinlerinin aksine Vip3A proteinlerinin proteaza dirençli bir çekirdeği yoktur. Vip3Aa veya Vip3Ae'nin farklı zamanlarda ve ticari serin-proteazlar veya böcek orta bağırsak sıvısı konsantrasyonlarında inkübe edilmesi, tüm protoksin işlenmeden daha önce parçalanmaya başlayan 62 kDa fragmanının dengesizliğini göstermiştir (Yu vd., 1997; Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Caccia vd., 2014; Sellami vd., 2015).

S. frugiperda orta bağırsak sıvısından peptidaz aktivitelerinin kısmi saflaştırılması, katyonik tripsin benzeri ve anyonik kimotripsin benzeri peptidazlar, Vip3A 62 kDa fragmanının oluşumunda rol oynadığını göstermişken katyonik kromozin benzeri peptidazların daha sonraki işlemlere katıldığını göstermiştir (Caccia vd., 2014). İlginç olarak, Vip3Aa protoksininin proteolitik işlenmesiyle üretilen 20 kDa fragmenti genellikle 62 kDa fragmentiyle birlikte saflaştırılır ve tam uzunluktaki proteinin aktivasyonundan sonra iki parçanın bir arada kalmasını sağlamaktadır (Chakroun ve Ferré, 2014).

Tam uzunluktaki protein ve tripsin ile aktive edilmiş Vip3A protein formunun kullanıldığı biyotestler sonucunda, genel olarak, *in vitro* proteolitik aktivasyonun böcek toksisitesi ve spesifitesi açısından büyük bir fark oluşturmadığı gösterilmiştir (Chakroun vd., 2012; Ruiz de Escudero vd., 2014). Vip3A proteini *in vitro* olarak duyarlı böceklere verildiğinde tamamen toksik olan 65 kDa'lık bir parçanın duyarlı olmayan böceklerin (*O. nubilalis*) orta bağırsak sıvısında da bulunduğu gözlenmiştir (Yu vd., 1997). Bununla birlikte, bazı durumlarda, tam uzunluktaki belirli bir Vip3A proteininin işlenme oranının, farklı böcek türlerine karşı toksisitesindeki farklılıkların temelini oluşturduğu ileri sürülmüştür (Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b; Chakroun vd., 2012; Caccia vd., 2014). Bazı araştırmalar, tam uzunluktaki protein yerine tripsinle aktive edilmiş protein kullanıldığında mortalitedeki farklılıkların kaybolduğunu göstermiştir (Chackroun vd., 2012, Hernández-Martínez vd., 2013).

1.3.2.3.3. Larval Orta Bağırsak Epitelyumuna Bağlanma

In vivo immüno-lokalizasyon çalışmaları, Vip3A'nın orta bağırsak epitel hücrelerinden gelen apikal mikrovillüslara bağlandığını göstermiştir [Fırça kenar membranı veziküllerine (BBMV) spesifik bağlanma] (Yu vd., 1997; Chakroun ve Ferré, 2014).

İlginç bir şekilde, Vip3Aa, duyarlı olmayan *O. nubilalis*'in BBMV'sine de spesifik olarak bağlandığını (Lee vd., 2003); bu, bağlanmanın gerekli olduğu, ancak toksisite üretmek için yeterli olmadığını göstermiştir. Nicel bağlanma parametreleri, ¹²⁵I-etiketli protein kullanılarak elde edilmiştir (Chakroun ve Ferré, 2014). ¹²⁵I-Vip3Aa'nın *S. frugiperda* BBMV'ye spesifik bağlanması, doymuş, çoğunlukla geri dönüşümsüz ve iki değerlikli katyonların varlığından farklı olarak etkilendiği bulunmuştur. Vip3A proteinlerinin Cry1A ve Cry2A proteinlerine kıyasla daha az afinite gösterdiği, ancak daha fazla bağlanma sahası olduğu bulunmuştur. İlginçtir, benzer rekabet, tripsin ile aktive edilmiş ¹²⁵I-Vip3Aa'nın hem 62 kDa hem de 20 kDa fragmentlerinin BBMV'ye bağlandığını ve her ikisinin de etiketlenmemiş Vip3Aa eklenmesiyle yarıştıklarını göstermiştir. Buna karşılık, Lui ve arkadaşları (2011), biyotin etiketli Vip3Aa kullanarak sadece 62 kDa'nın *H. armigera*'nın BBMV'sine bağlanabildiğini ve 20 kDa'nın sadece bağlanma reaksiyonunun süpernatantında olduğunu keşfetmiştir.

Rekabet bağlanma deneyleri Vip3Aa ile Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Fa, Cry2Ae ve Cry2Ab arasında, çeşitli böcek türlerinde ve *S. frugiperda*'daki Cry1Ab ve Cry1F arasında, Vip3Af ile ikisi arasında paylaşılan bağlanma mevkilerinin bulunmadığını göstermiştir (Lee vd., 2006; Sena vd., 2009; Liu vd., 2011; Gouffon vd., 2011; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013; Chakroun ve Ferré, 2014).

Tek istisna, *S. eridania* BBMV'deki Vip3Aa bağlama alanları için Cry1Ia proteininin kısmi rekabetini bildiren Bergamasco ve arkadaşları (2013) tarafından tarif edilmiş, ancak *S. frugiperda*, *S. albula* ve *S. cosmioides* BBMV'lerinde mevcut değildir. Bununla birlikte, Vip3Aa ve onun kovaryant (eşdeğişken) Vip3Ae, Vip3Af ve hatta aktif olmayan Vip3Ad, bağlanma parametreleri arasında önemli bir farklılık göstermeyen *S. frugiperda*'daki aynı bağlanma yerlerini paylaşmaktadır (Chakroun ve Ferré, 2014).

Vip3Aa'nın duyarlı böceklerin BBMV'siyle etkileşimi Cry1A proteinleri tarafından tanınanlardan farklı spesifik bağlanma moleküllerini içerir. Ligand blot analizleri, Vip3A'nın *Manduca sexta*'da 80 ve 110 kDa proteinlerine, Cry1Ab ise 120 ve 210 kDa

proteinlerine bağlandığını ortaya koymuştur (Lee vd., 2003). Aynı çalışma, Vip3A'nın, Cry proteinlerine bağlandığı bilinen her ikisi membran proteini olan *M. sexta*'dan saflaştırılmış APN'ye ve kaderin ektodomain RTB'ye bağlanmadığını göstermiştir (Lee vd., 2003).

Prays oleae ve *Agrotis segetum*'da Vip3Aa, 65 kDa proteine bağlanırken, Cry1Ac, *P. oleae*'de 210 kDa bandına ve *A. segetum*'da 120 kDa bandına bağlanmaktadır (Abdelkefi-Mesrati vd., 2009; Ben Hamadou-Charfi vd., 2013).

S. littoralis'te, Vip3Aa (Abdelkefi-Mesrati vd., 2011a), 55 ve 100 kDa'luk ve *Ephestia kuehniella*, *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* ve *S. eridania*'da 65 kDa'luk bir proteine (Abdelkefi-Mesrati vd., 2011b; Bergamasco vd., 2013) ve Cry1Ia'nın da dört *Spodoptera* türünde bağlı olduğu bir proteine bağlanmaktadır (Bergamasco vd., 2013).

Yapılan çok az sayıda çalışmada böcek orta bağırsağındaki Vip3A bağlama moleküllerinin kimliğini ele almıştır. Şu ana kadar iki tane Vip3Aa bağlanma molekülüne maya iki hibrid sistemini kullanarak tanımlanmıştır. İlki, *A. ipsilon*'dan 48 kDa'lık bir protein olup, tenascins olarak adlandırılan, hücre dışı glikoproteinlerin bir ailesiyle homolog olup, apoptotik süreçlerle ilişkili olabilir (Estruch ve Yu, 2001). İkincisi *S. litura*'nın S2 ribozomal proteinidir (Singh vd., 2010). Sf21 hücrelerinde etkileşen ortağa aracılık eden bir Vip3A toksisitesi olarak tanımlanmıştır. S2 geninin susturulması, hem Sf21 hücrelerinde hem de beşinci instar *S. litura* larvalarında Vip3A'nın toksikliğini azaltmıştır. Hem S2 hem de Vip3Aa, pull down deneylerinde birlikte çöktürülmüş ve Sf21 hücrelerinin yüzeyinde ve sitoplazmasında birlikte lokalize edilmiştir (Singh vd., 2010). Bu S2-Vip3A protein etkileşiminin, hücrelerin lizisini nasıl tetikleyebildiği açıklanamamıştır. *H. armigera*'da, Vip3Aa'ya bağlanan moleküllerin lipid yığınlarıyla hafifçe ilişkili olduğu bulunmuştur (Liu vd., 2011).

Orta bağırsak hücrelerinin, Vip3 proteinlerinden zehirlenmesine nasıl tepki verdiğini anlamaya yönelik bir çalışmada, subletal bir Vip3Aa dozu ile muamele edilen *S. exigua* larvalarının gen ifade profilleri, 29.000'den fazla geni içeren bir genom çapında mikrodizi kullanılarak elde edilmiştir (Bel vd., 2013). Yukarıda açıklanan iki Vip3A bağlama proteininin (S2 ve tenascin X-toksin benzeri protein) ifade seviyelerinde herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Cry proteinlerinin etki şekli ile ilgili genler de analiz edilmiş ve sadece ifade de küçük farklar bulunmuştur. Yazarlar, muhtemelen, transkripsiyonda önemli değişiklikler olmamasını, analiz edilen genlerin ya Vip3 etki modunda yer almadığından ya da Vip3A toksinlerine karşı savunma mekanizmalarının, etki modunda

yer alan üyelerin düzenlenişine dayanmamasından kaynaklandığı sonucuna varmışlardır (Chakroun, 2015).

1.3.2.3.4. Gözenek Oluşumu

Vip3 proteinlerinde herhangi bir gözenek oluşturan domain sekansının yokluğuna rağmen, tripsinize edilmiş veya orta bağırsakta aktifleştirilmiş proteinin gözenek oluşturma aktivitesi, *M. sexta*'nin disekte edilen orta bağırsaklarıyla voltaj sıkıştırma deneyleriyle (voltage clamping assays) ve aynı zamanda düzlemsel lipit çift tabakalarında, onları oluşturamayan tam uzunlukta Vip3A proteinine karşıt olarak kanıtlanmıştır (Lee vd., 2003). Bu iyon kanalları transmembran potansiyelini yok edebilir, voltajdan bağımsız ve kation seçicidirler (Lee vd., 2003). Aktive edilmiş Vip3A'nın gözenek oluşturma yeteneği, *H. armigera* BMV'yi kullanarak floresan söndürme ile de gösterilmiştir (Liu vd., 2011). Ayrıca, Vip3A iyon kanalları duyarlı böceklerle sınırlıdır ve *M. sexta*'daki Cry1Ab'den farklı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Lee vd., 2003).

1.3.2.4. Direnç ve Çapraz Direnç

Vip3 proteinlerine karşı direnç üzerine çok az vaka bildirilmiştir. *H. virescens* kolonisinin laboratuvar seçimi Vip-Unsel popülasyonuna kıyasla Vip3A'ya 2.040 kat dirence neden olmuştur (Pickett, 2009). Alan popülasyonlarında Vip3Aa dirençli allellerin varlığı, Avustralya'daki *Helicoverpa armigera* ve *H. punctigera*'da F2 taraması kullanılarak incelenmiştir (Mahon vd., 2012). Sonuçlar, her iki böcek türünde, normal olarak karşılaşılan mutasyon oranlarının üzerinde, nispeten yüksek bir frekanstaki (sırasıyla, 0.027 ve 0.008) doğal polimorfizmler gibi dirençli allellerin var olduğunu göstermiştir (Mahon vd., 2012). İlginçtir ki, her bir tür içinde, iki farklı F2 ailesinin direnci, aynı lokustaki alellerden kaynaklanmıştır ve direnç esasen resesifdir (muhtemelen tek bir gen tarafından verilir) ve Cry1Ac veya Cry2Ab'ye çapraz direnç sağlamamıştır (Mahon vd., 2012). *H. punctigera*'ya dirençli suş hakkında daha fazla yapılan araştırma ile, Vip3A ve Cry2Ab direnç lokusları arasında hiçbir bağlantı olmadığını doğrulanmıştır (Walsh vd., 2014).

Bt bitkilerinde Vip3 toksinlerinin artan kullanımı, hem zararlı kontrolü hem de direnç yönetimini iyileştirmek için, Cry ve Vip3A proteinleri arasındaki çapraz direnci

değerlendirmeye ilgi uyandırmıştır (Kurtz, 2010). Şu ana kadar, proteinlerin bu iki sınıfı arasında önemli bir çapraz direnç tespit edilmemiştir. Vip3Aa'nın hem Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1F ve Cry2Aa2'ye dirençli, duyarlı ve üç Cry dirençli *H. virescens* suşu YHD2, Cry1Ac, Cry1F'ye dirençli ve Cry2A'ya hafifçe çapraz dirençli ve CXC ve KCBhyb' e eşit derecede toksik olduğu bulunmuştur (Jackson vd., 2007).

H. zea'nın (AR) Cry1Ac'ye dirençli suşu Cry1Ab'ye çapraz direnç gösterirken Vip3A, Cry2Aa2 veya Cry2Ab2'ye çapraz direnç göstermemiştir (Anilkumar vd., 2008). Çin'deki Cry1Ac-pamuk ekim bölgelerinden iki *H. armigera* popülasyonu üzerine yapılan bir araştırmada, Vip3Aa ve Cry1Ac'ye verilen cevaplar arasında anlamlı bir ilişki belirlenememiş ve bu iki toksin arasında çapraz direncin çok az veya hiç olmadığını düşündürmüştür (An vd., 2010).

Aynı zamanda Vip3A'ya çapraz direnç, Cry1F dirençli iki *S. frugiperda* popülasyonunda çalışılmıştır. Biri Porto Riko'daki, diğeri güneydoğu ABD'deki Bt-mısır tarlalarından toplanmıştır. Her iki popülasyonunda Vip3Aa'ya karşı çok duyarlı olduğu belirlenmiş, bu da Vip3Aa ve Cry1F proteinleri arasında çapraz direnç olmadığını göstermiştir (Vélez vd., 2013; Huang vd., 2014). Farklı bir Vip3A proteini (Vip3Ac) kullanarak yapılan bir çalışma, duyarlı ve Cry1Ac'ye dirençli bir *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) suşu için aynı derecede toksik olduğunu göstermiştir (Fang et al., 2007). Bununla birlikte, bu durumda dirençli suşun, Vip3Aa'ya (direnç oranı 2.1) ve iki Vip3A kimerik proteine (direnç oranları 1.8 ve 3.2) karşı biraz daha az duyarlı olduğunu göstermiştir (Fang vd., 2007).

1.3.2.5. Vip3 Proteininin Bitkilerde İfadesi

vip3Aa geni, pamukta ve mısırdaki başarıyla kullanılmaya başlanmış ve sonra daha yüksek koruma ve böcek direncini geciktirmek için diğer *cry* genleri ile kombine edilmiştir (URL-4, 2017). VipCotTM ve Agrisure VipteraTM, sırasıyla 2008 ve 2009'da ABD'de tescil edilmiştir. Bunlardan birincisi, Vip3Aa20 proteini üreten mısır MIR162 iken (URL-5, 2017) diğeri Vip3Aa19 proteinini üreten pamuk COT102'dir (URL 6 ve 7, 2017).

Her iki olay da *cry1Ab* (VipCotTM Vip3Aa+mCry1Ab ve Agrisure VipteraTM Vip3Aa+Cry1Ab) ve daha sonra *cry1Fa* (VipCotTM Vip3Aa+Cry1Ac+Cry1Fa ve Agrisure VipteraTM Vip3Aa+Cry1Ab+Cry1Fa) ile piramidinleştirilerek Lepidoptera'ya

karşı daha geniş ve daha sağlam bir koruma sağlanmıştır (Kurtz vd., 2007; Adamczyk vd., 2008; Burkness, vd., 2010).

Ayrıca MIR162 mısıra aktarılan Vip3Aa20, bu iki böcek takımına karşı koruma sağlamak için Coleoptera (Cry3A ve Cry3.1Ab)'ya karşı aktif proteinler ifade eden diğer *cry* genleriyle birleştirilmiştir (Carrière vd., 2015).

Sadece Vip3Aa proteinini ifade eden VipCot'un saha performansı üzerine yapılan üç yıllık bir çalışma, bitkilerin sezonun başlarında *H. armigera*'ya karşı oldukça etkili olduğunu ve sezonun ilerlemesiyle etkinliğin azaldığını göstermiştir; ancak BollgardTM veya IngardTM pamuktaki Cry1Ac kadar şiddetli olmadığı belirlenmiştir (Llewellyn vd., 2007). 2015 yılında geliştirilmiş toksisiteye sahip ilk modifiye Vip3A, *H. armigera*, *A. ipsilon* ve *S. littoralis*'e karşı neredeyse tamamen koruma sağlayan tütün kullanımına girmiştir (Gayen vd., 2015).

1.4. Çalışmanın Amacı

Kimyasal insektisitlerin kullanımındaki artışlar, böcek popülasyonlarında kimyasallara karşı dirençliliğin gelişmesine neden olmuştur. Kimyasalların, çevreye ve insanlara verdiği zararların yanında bunlara karşı gelişen dirençlilik durumu, ilginin *Bacillus thuringiensis*'e dayalı preparat ve biyofarmülasyonlara kaymasını sağlamıştır. Biyolojik mücadele amacıyla yaygın olarak *B. thuringiensis* suşlarının sporülasyon aşamasında üretilen *cry* genleri kullanılmaktadır. Zararlıların *B. thuringiensis* toksinlerine karşı direnç geliştirmelerinin oldukça zor olduğu düşünülmüş, fakat ilerleyen yıllarda hem laboratuvar hem de doğal ortamdan elde edilen birçok böcek türünün *B. thuringiensis* toksinlerine karşı dirençlilik geliştirdiği gözlenmiştir. Bu sebeple tüm dünyada tarım ve ormancılıkta zararlı böceklere karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek, dirençlilik problemlerini aşabilen yeni bir mikrobiyal mücadele materyali elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için *Bacillus* izolatlarının süpernatantlarında yeni böcek öldürücü aktif bileşenlerin varlığının araştırılması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Bacillus* izolatlarının kültür süpernatantlarında vejetatif safhada üretilen, insektisidal etkisi yüksek ve Vejetatif İnsektisidal Protein (Vip) olarak adlandırılan proteinler bulunmuştur. Vip proteinlerinin Cry proteinleri ile dizi benzerliğinin bulunmaması ve böceklerin orta bağırsaklarında farklı bağlanma bölgelerine sahip olmasından dolayı önemli bir mücadele etmeni olarak

görülmektedir. Bu proteinler zararlıların kontrolü amacıyla Cry proteinleri ile birlikte de kullanılarak toksisite spektrumunu genişletmek ve aprak direnç riskini en aza indirmek için uygulanabilir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar ile daha önce izole ve karakterize edilmiş ve laboratuvarımızda mevcut olan lokal *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) suşlarında ilk kez *vip* genlerinin varlığının belirlenerek klonlanması ve dizi analizi yapılması, insektisidal aktivitesi yüksek olan *vip3A* geninin tam uzunlukta gen dizilimi yapılarak ifade edilmesi, saflaştırılması ve insektisidal etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu alışma kapsamında tespit edilen Vip proteinleri, tarım ve ormancılıkta zararlı böceklere karşı kullanılacak insektisidal aktivitesi yüksek, dirençlilik problemi aşabilen yeni bir mikrobiyal mücadele etmenleri olarak literatüre katkı sağlayabilecektir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Lokal İzolatlara Ait *vip* Genlerinin Taranması, Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

2.1.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatları ve Büyüme Şartları

Bu çalışmada kullanılan lokal *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) suşları (Tablo 6) ve kontrol suşu olarak kullanılan olan *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 suşu (Bacillus Genetic Stock Center) K.T.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvar kültür stoklarından temin edildi.

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

Tablo 6. Çalışmada kullanılan lokal *Bacillus thuringiensis* izolatları

Kod	Bakteri	Konak	Referans
BnBt:	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	<i>Balanicus nucum</i>	Sezen vd., 1999; Kati vd., 2007a
MnD:	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	<i>Malacosoma neustria</i>	Kati vd., 2005
Xd3:	<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>	<i>Xyleborus dispar</i>	Sezen vd., 2008
Mm2:	<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>	<i>Melolontha melolontha</i>	Sezen vd., 2007; Kati vd., 2007b

2.1.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

B. thuringiensis izolatlarından genomik DNA’nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yöntemle yapıldı. Çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) suşları, LB besiyerinde, 30 °C’de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen kültür iki kez oda sıcaklığında 13,000 g’de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellete 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilerek, pellet çözüldü. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslendi

ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için 50 µl % 10'luk SDS eklenerek, 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Sonra tüpe 3 M'lık 0,1 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dakika alt-üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Karışıma 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilip, tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13,000 g'de santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınarak, temiz bir tüpe bırakıldı. Bu tüpe tekrar 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 13,000 g'de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra, üzerlerindeki sıvı kısım alındı. Bu sıvı kısma 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim % 96'lık etanol ilave edildi ve -20 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13,000 g'de 15 dakika santrifüj edilip, üst kısımdaki sıvı uzaklaştırıldı. Pellete 500 µl % 70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı uzaklaştırılarak pellet açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 100 µl ddH₂O'da çözülüp, -20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.3. *vip* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

vip genlerinin PCR ile çoğaltılması için daha önce Hernández-Rodríguez ve arkadaşları (2009) tarafından *vip* gen ailelerinin korunmuş bölgelerinden dizayn edilmiş olan primerler kullanıldı (Tablo 7).

Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpte 1,25 ünite *Taq* DNA polimeraz (New England BioLabs), 5 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM ileri primeri, 1 µl 10 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 3 µl genomik DNA bırakılarak steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 95 °C'de 5 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 95 °C'de 1 dakika, 45 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakika ve son olarak da 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi (Hernández-Rodríguez vd., 2009). 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.

Tablo 7. *vip* genlerinin PCR ile çoğaltılması için kullanılacak olan primerler (Hernández-Rodríguez vd., 2009).

Gen	Primer	Sıra (5'-3')
<i>vip1</i>	<i>vip1-sc.fw</i>	5' TTATTAGATAAACAACAACAAGAATATCAATCTATTMGNTGGATHGG 3'
	<i>vip1-sc.rev</i>	5' GATCTATATCTCTAGCTGCTTTTTTCATAATCTSARTANGGRTC 3'
<i>vip2</i>	<i>vip2-sc.fw</i>	5' GATAAAGAAAAAGCAAAAAGAATGGGRNAARRA 3'
	<i>vip2-sc.rev</i>	5' CCACACCATCTATATACAGTAATATTTTCTGGDATNGG 3'
<i>vip3</i>	<i>vip3-sc.fw</i>	5' TGCCACTGGTATCAARGA 3'
	<i>vip3-sc.rev</i>	5' TCCTCCTGTATGATCTACATAATGCATTYTRITRIT 3'

2.1.4. *vip* Genlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *vip* genleri agaroz jelden kesilerek NucleoSpin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEM-T Easy Vector System (Promega)'i kullanılarak pGEM-T vektörüne klonlandı. Reaksiyon, 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer, 3 µl Insert DNA, 1 µl pGEM-T Easy Vector ve 1 µl T4 DNA Ligaz olacak şekilde oluşturuldu ve 16 °C'de en az 16 saat bekletildi.

2.1.5. Kompetent Hücre Hazırlanması

Daha önceden Nutrient Agar (NA) besiyerine ekilmiş *Escherichia coli* JM101 suşundan 3 ml Luria Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 16 saat büyümeye bırakıldı. Hücrelerin yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,1 olacak şekilde 30 ml LB besiyerine aşılandı. Hücreler, 37 °C'de en az 1 saat, 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 arasında olana kadar sallamalı inkübatörde bekletildi. İstenilen yoğunluk elde edildikten sonra süspansiyonun tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı. Soğutmalı santrifüjde 4 °C'de

4,500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürülüp, 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra tekrar 4 °C'de 4,500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürüldü. Hazırlanan kompetent hücre 4 °C'de en az 2 saat bekledikten sonra 2 gün süresince kullanıldı.

2.1.6. *vip* Gen Bölgesinin Kompetent *E. coli* JM101'e Aktarımı

Steril ependorfa 200 µl kompetent hücre ile 3-4 µl ligasyon ürününden koyuldu ve 30 dakika buzda bekletildi. 45 °C'de 2 dakika ısıyla muamele edildikten sonra 1 ml LB sıvı besiyeri ilave edilip, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 6,000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılıp, pellet dikkatlice çözdürüldü. Amfisilinli LB agar besiyerine 40 µl X-Gal (40 mg/ml), 40 µl IPTG (24 mg/ml) ve transform olmuş hücre yayma ekim yapıldı. 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra içerisine plazmit alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.1.7. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz (*EcoRI*) ile Muamelesi

Transformasyon sonucunda petri üzerinde oluşan beyaz ve mavi renkteki kolonilerden beyaz koloniler seçilerek, içerdikleri plazmit DNA'larını izole etmek için Amfisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37 °C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürlerinden 1,5 µl ependorfa alınıp 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant ependorfa 50 µl kalacak şekilde uzaklaştırılıp, pellet çözününceye kadar vortekslendi. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 0,1 N NaOH; % 0,5 SDS) ilave edildi. 4-5 kez alt üst edilen tüpe 150 µl 3M sodyum asetat pH 5,2 koyuldu. Tekrar alt üst edilen tüp 10-15 dakika buzda bekletildi. Ardından 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada süpernatant boş tüpe alınarak üzerine 900 µl % 96'lık etanol ilave edilip, 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra % 70'lik etanol ilave edildi ve 14,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Etanolün iyice uçması için açık havada bekletildi. Son

olarak pellet 30 µl TE tamponunda çözüldü ve yürütme işleminde görüntünün daha net görünmesini sağlamak için 3 µl RNaz ilave edildi. Elde edilen plazmitlerin 5 µl'si 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; Kodak) ile görüntüledi.

İzole edilen plazmit DNA'larının *vip* gen bölgesini içerip içermediğini tespit etmek için plazmit DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 1 µg DNA, 0,5 µl *EcoRI* (Promega), 2 µl enzime ait 10x reaksiyon tamponu ve son hacim 20 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 2-5 µl yürütme boyası ilave edilip, 65 °C'de 10 dakika enzimin inaktive olması için bekletildi. Ardından % 1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

2.1.8. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar 5 ml Amfisilinli LB sıvı besiyerine ekim yapılarak, 37 °C'de 200 rpm'de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra elde edilen kültürler 14,000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmit izolasyon kiti (Fermantas-GeneJET Plasmid Miniprep Kit) kullanılarak izole edildi. Plazmit DNA konsantrasyonları OD₂₆₀'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 20 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlanıp, tüpler etiketlendikten sonra Macrogen firmasına (Hollanda) DNA bazlarının analiz edilmesi için gönderildi. Gelen sekans sonuçları Genbank verileri ile BLAST yapılarak biyoinformatik olarak değerlendirilip sonuca bakıldı.

2.2. Vip3 Proteinlerinin Eldesi ve Kısmen Saflaştırılması

2.2.1. *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) İzolatlarının Büyüme Eğrisinin ve Vejetatif Safhasının Belirlenmesi

Bt izolatlarının bakteriyal büyüme evresinin ve vejetatif safhasının belirlenmesi amacı ile Teriffic (% 12 tripton; % 2,4 maya ekstraktı; % 0,04 gliserol; 0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄) sıvı besiyerinde bir gecelik kültürden 600 nm'de OD 0,1 olacak şekilde yeniden aşılama yapıldı ve 30 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona tabi tutuldu. 36

saat boyunca belirli zaman aralıklarında alınan örnekler ile OD₆₀₀ nm'de ölçümler alındı ve veriler grafik üzerinde çizilerek vejetatif safha belirlendi.

2.2.2. Kültür Süpernatantlarından Vip3 Proteinlerinin İzolasyonu

24 saat boyunca büyütülen bakteri kültürleri 4 °C'de 12,000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve Vip3 proteinlerini içeren süpernatantlar alındı (Sattar vd., 2008).

2.2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄] çöktürmesi, kabaca çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak proteinin çözünürlüğünün değişmesi ve bunun sonucunda denatüre olmadan çökmesine dayanan bir çöktürme yöntemidir. Bu metot hem etkili bir saflaştırma hem de örneği konsantre etme metodudur.

Bu çalışmada öncelikle bakteri süpernatantına % 60 doygunlukta olacak şekilde katı amonyum sülfat eklendi (Sattar vd., 2008). Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmak suretiyle 4 °C'de yavaşça süpernatant üzerine hesaplanan amonyum sülfat miktarı eklendi. Amonyum sülfatın tamamının eklenmesinin ardından manyetik karıştırıcıda 4 °C'de 1 saat boyunca bekletildi. Çöktürme işleminin ardından 10,000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası, dibe çöken pelletler 1 ml 100 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponu kullanılarak çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda özellikle tuzun ve küçük moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla 20 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponuna karşı gece boyu diyaliz işlemine tabi tutuldu. Diyalizin ardından örnekler en yüksek hızda 10 dakika santrifüj yapılarak bozulan proteinlerin atılması sağlandı.

2.2.2.2. İyon Değişimi Kromatografisi

İyon değişimi kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan Q-Sepharose (Anyon değiştirici) kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM pH 8 Tris-HCl tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompasında alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir

şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM pH 8 Tris-HCl tamponu ile dengeye getirildi. Özüt kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen fraksiyonlar % 12'lik SDS-PAGE'de yürütüldü. Protein özütü içerdiği belirlenen tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. SDS-PAGE'lerde yapılan yürütme işlemleri tamamlandıktan sonra jeller hızlı gümüş boyama tekniği ile boyandı (Temizkan, 2004). Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.2.2.3. Hızlı Gümüş Boyama

Gümüş, proteinlerdeki sülfidril ve karboksil gruplarına bağlanarak boyama yapar. Diğer yöntemlerle boyanamayan bazı proteinleri de boyayabilen duyarlı bir tekniktir. Bu boyama tekniği az miktardaki örneklerle ve kısa sürede çalışmaya olanak verir; ancak küçük proteinlere duyarlılığı azdır.

Tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlandı.

A) Formaldehit fiksatif çözeltisi

Metanol 400 ml
 % 37 Formaldehit 0,5 ml
 H₂O 1 litreye tamamlanır.

B) 0,2 g/l Sodyum tiyosülfat

Na₂S₂O₃ 0,2 g
 H₂O 1 litreye tamamlanır.

C) % 0,1 Gümüş Nitrat

Işığa duyarlı olduğu için koyu renk şişede, oda sıcaklığında saklanır.
 AgNO₃ 1 g
 H₂O 1 litreye tamamlanır.

D) Tiyosülfatlı görüntü oluşturma (developing) çözeltisi

Na₂CO₃ 30 g

B çözelti 20 ml

H₂O 1 litreye tamamlanır.

*Kullanılacağı zaman her 100 ml'sine 50 µl % 37'lik formaldehit eklenir.

E) 2,3 M Sitrik asit

Sitrik asit 22,1 g

H₂O 50 ml'ye tamamlanır.

Jel alkole ve aside dayanıklı plastik veya bir cam kaptan, 200 ml formaldehit fiksatif çözeltisi (A) içinde 20 dakika çalkalanır. Fiksatif dökülerek iki kez 10'ar dakika saf su ile hafif çalkalanarak yıkanır. Son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra 200 ml B çözeltisinde 1-2 dakika çalkalanır. B çözeltisi dökülerek iki kez 40'ar saniye saf su ile yıkanır. Son yıkamadan sonra 200 ml C çözeltisinde, 20 dakika düşük hızda çalkalanarak bekletilir. C çözeltisi uzaklaştırılır ve jel saf su ile yıkanır. 200 ml taze hazırlanmış D çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana dek (yaklaşık 3-5 dakika) hafif çalkalanır. Bantların görünür hale gelmesi bir sonraki basamakta da devam edeceğinden bu çözeltide fazla bekletilmemelidir. Jelin boyandığı kaba 10 ml E çözeltisi eklenerek pH nötrleştirilir ve reaksiyon durdurulur.

Bu sırada pH'ın nötr olup olmadığı pH kağıdı ile kontrol edilmelidir. Yüksek pH reaksiyonun devam etmesine, düşük pH ise jelin parçalanmasına yol açar. Bant oluşumu tamamlandıktan sonra (genellikle 8 saat) kaptaki çözelti dökülür ve jel saf su ile iyice yıkanır. Bant oluşumu yeterli olduğunda jelin fotoğrafı çekilir.

2.2.2.4. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 12,5, 25, 50, 75, 100, 125 µg BSA içeren çözeltiler ddH₂O ile 200 µl'ye tamamlandı. Ardından üzerine 200'şer µl hazır boya çözeltisinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gözlü mikropate üzerine aktarıldı ve UV-visible Spektroskopi System cihazı (Bio-rad) kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

2.3. *vip3A* Geninin Belirlenmesi, Klonlanması ve İfade Edilmesi

2.3.1. Primer Sentezi

2,37 kb'lik tam uzunlukta bir *vip3A* gen dizinine (GenBank erişim numarası AY743436.1) dayanılarak, bir primer çifti (*vip3exF* ve *vip3exR*) tasarlandı. Bu primerler *vip3A* geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan ve ayrıca pGEX-2T ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği özel ekspresyon primerleri (*EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içerecek şekilde) olarak dizayn edildi (Tablo 8).

Tablo 8. *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri içeren primerler

Primer	Sıra (5'-3')
<i>vip3exF</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGC 3' <i>BamHI</i>
<i>vip3exR</i>	5' GAATTCTTACTTAATAGAGACATCGTAAAAATG 3' <i>EcoRI</i>

2.3.2. *vip3A* Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

Tam uzunlukta *vip3A* genlerini (~2,3 kb) belirlemek için dizayn edilen primerler kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı. Reaksiyonlar 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 3 µl genomik DNA, 1,5 µl 10 mM ileri primeri, 1,5 µl 10 mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP, 10 µl 5 x Phusion HF tamponu ve 1 ünite Phusion DNA polimeraz (NEB) 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, 45-55 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika 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.

2.3.3. *vip3A* Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne Klonlanmaları

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *vip3A* 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. Bu nedenle doğrudan klonlama yapabilmek için pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) vektörü kullanıldı. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pJET1.2/blunt vektöre 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg pJET1.2/blunt Vektör) klonlandı. Reaksiyonlar her bir gen için 1 µl pJET1.2/blunt vektörü, 7,5 µl 2 x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek steril ddH₂O ile 15 µl hacme tamamlanarak gerçekleştirildi. Karışım 4 °C'de 3-4 saat inkübasyona bırakıldı.

2.3.4. *vip3A* Genlerinin Kompotent *E.coli* DH10β'ya Aktarımı

Daha önceden petriye ekilmiş *Escherichia coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp, 3 ml Luria Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 16 saat büyümeye bırakıldı. Hücrelerin yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,1 olacak şekilde 30 ml LB besiyerine aşılandı. Hücreler, 37 °C'de en az 1 saat, 600 nm dalga boyunda 0,45-0,55 arasında olana kadar sallamalı inkübatörde bekletildi. İstenilen yoğunluk elde edildikten sonra süspansiyonun tamamı steril falkon tüpe boşaltıldı. Soğutmalı santrifüjde 4 °C'de 4,500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürülüp, 30 dakika buzda bekletildi. Daha sonra tekrar 4 °C'de 4,500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 2 ml 100 mM'lık soğuk CaCl₂ ile çözdürüldü. Hazırlanan kompotent hücre 4 °C'de en az 2 saat bekledikten sonra 2 gün süresince kullanıldı.

Hazırlanan kompotent *E. coli* DH10β hücrelerinden alınarak steril ependorfa 200 µl koyularak buza yerleştirildi. Üzerine 3-4 µl ligasyon ürününden koyuldu ve 30 dakika buzda bekletildi. 45 °C'de 2 dakika ısıyla muamele edildikten sonra 1 ml LB sıvı besiyeri ilave edilip, 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 6,000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılıp, pellet dikkatlice çözdürüldü. Amfisilinli LB agar besiyerine transform olmuş hücre yayma ekim

yapıldı. 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra içerisine plazmit alan hücrelerin koloni oluşturmamasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.3.5. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi

Transformasyon sonrası petrielerde gözlenen beyaz kolonilerden rastgele klonlar seçilerek içerdikleri plazmit DNA’larını izole etmek için 50 µg/ml amfisilin 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 g’de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 µl 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 µl 3 M sodyum asetat (pH 5,2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14,000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl % 100’lük etanol ilave edilerek 14,000 g’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti % 70’lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH₂O’da çözüldü. İzole edilen plazmit DNA’ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA’ları *Bg*III restriksiyon enzimi ile muamele edildi. *vip3A* için 10 µl DNA, 0,5 µl *Bg*III, 3 µl enzime ait 10X reaksiyon tamponu ve 16,5 µl H₂O olacak şekilde 30 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.

2.3.6. Klonların İçerdiği *vip3A* Geninin Dizi Analizi

Elde edilen klonlardan seçilen 3 tanesi 5 ml amfisilinli LB besiyerine ekildi ve 37 °C’de 200 rpm’de 14-16 saat inkübe edildi. Büyüyen kültürler, 14,000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi ve “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak plazmit DNA’ları izole edildi. Plazmit DNA konsantrasyonları OD₂₆₀’da belirlendi. Tüm DNA’lardan 20 µl’lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. İçerisinde DNA örnekleri bulunan mikrosantrifüj tüplerinin üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek sekans analizleri için MacroGen Firmasına (Hollanda) gönderildi.

2.3.7. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen *vip3A* genlerinin baz ve aminoasit dizilimi gen bankasında bulunan diğer *vip3A* genleri ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

2.3.8. Belirlenen Vip3A Proteinlerinin Literatürdeki Diğer Vip3A Proteinleriyle Karşılaştırılması ve MEGA Programı ile Ağaç Çizimi

Sekans sonucunda genlerin nükleotid ve aminoasit dizilimi belirlenerek gen bankasındaki diğer Vip3 proteini ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı ile karşılaştırıldı ve benzerlikler ortaya konuldu. Sonra MEGA 4 (Moleküler Evrimsel Genetik Analiz) programıyla literatürdeki Vip3 proteinleri arasında Bootstrap Filogeni testi Neighbour-joining analizi yapılarak literatürdeki protein dizilerinin birbirine yakınlık dereceleri belirlendi.

2.3.9. *vip3A* Genlerinin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Klonlanmaları

2.3.9.1. pGEX-2T Ekspresyon Vektörünün *EcoRI* ve *BamHI* Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

pGEX-2T ekspresyon vektörleri klonlanacak genlerin enzim kesim bölgelerine uygun restriksiyon enzimleri (*EcoRI* ve *BamHI*) ile kesildi. Reaksiyonlar, 5 µl plazmit DNA'sı, 1,5 µl 10X Tango Buffer (Promega), 1,5 µl 10X NE Buffer 3.1, 1 µl *EcoRI* (NEB), 1 µl *BamHI* (NEB) ve 20 µl steril ddH₂O bir araya getirilerek son hacim 30 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübe edilen ürünler % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazlarıyla lineer hale getirilmiş olan 4.948 bp büyüklüğündeki pGEX-2T vektörleri DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi.

2.3.9.2. *vip3A* Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılmaları

vip3A genini taşıyan pJET1.2/blunt vektörü içeren *E. coli* DH10 β bakterilerine ait birer koloniden 50 μ g/ml amfisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 200 rpm'de gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültürler, 14,000 rpm'de 3 dakika çöktürüldükten sonra plazmit DNA izolasyon kiti (Promega, USA) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmit DNA'dan 10 μ l alınarak, 1,5 μ l 10X Tango Buffer (Promega), 1,5 μ l 10X NE Buffer 3.1, 1'er μ l *Eco*RI (NEB) ve *Bam*HI (NEB) restriksiyon enzimleri bir araya getirilerek toplam 30 μ l son hacimde reaksiyon hazırlandı ve bu reaksiyon 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim ürünleri DNA standardı olarak 1 kb DNA Ladder (Vivantis) ile birlikte % 1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pJET1.2/blunt vektöründen *Eco*RI ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılmış *vip3A* genleri, agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak temizlendi.

2.3.9.3. *vip3A* Genlerinin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Aktarımı

Jelden temizlenen *vip3A* genleri, pGEX-2T vektörüne 1 vektör ve 3 DNA olacak şekilde birbirlerine yapıştırıldılar. Buna göre pGEX-2T vektörüne klonlanacak her bir gen için reaksiyonlar; 2 μ l 10X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1 μ l T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 3,5 μ l pGEX-2T vektörü, 2,5 μ l insert DNA, 1 μ l 10 mM ATP ve 10 μ l ddH₂O olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyonlar 4 °C'de gece boyu bekletildi.

2.3.10. pGEX-2T Vektörüne Klonlanan *vip3A* Genlerinin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmitler *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmadan önce *E. coli* DH10 β hücrelerine aktarıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılarak genin varlığı doğrulandı. Daha sonra kullanılacak olan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine ait bir koloni 3 ml LB besiyerine aşılandı ve elde edilen kültür 37 °C'de 200 rpm'de gece boyunca inkübe edildi. Bu kültürden, CaCl₂'lü metoda göre kompetent hale getirilmiş *E. coli* BL21 (DE3) hücreleri elde edildi. Kompetent hücrelere DNA aktarımı için rekombinant plazmit DNA'sından 3 μ l alındı ve 200 μ l hücre eklendi. Karışım 30 dakika buz içerisinde

bekletildikten sonra 2 dakika 45 °C’de bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 1 ml LB besiyeri olan cam tüpe bırakıldı ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda ependorf tüpe alınan kültür 6,000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet halindeki hücrelerin üzerinde 100 µl besiyeri kalacak şekilde fazla besiyeri döküldü. Daha sonra *E. coli* BL21(DE3)’e aktarılan rekombinat pGEX-2T vektörleri 50 µg/ml amfisilin içeren LB agar petrilere yayıldı ve gece boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Aynı yöntemle pGEX-2T vektörlerinin kendisi de *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarıldı.

2.3.11. Vip3A Proteinleri, Ekspresyonu ve İzolasyonu

İlgili proteini ifade etmek için *vip3A* genlerini ihtiva eden rekombinant pGEX-2T vektörleri, *E. coli* BL21 (DE3) konak hücresine aktarıldı. pGEX-2T vektörüne aktarımı ile oluşan kolonilerden 1’er tanesi de 50 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB besiyerine kürdan yardımıyla inoküle edildi. Tüpler 200 rpm’de 37 °C’de bir gece boyunca inkübe edildi. Elde edilen gece kültürleri, 100 ml amfisilinli besiyerlerine eklendi. OD₆₀₀=0,5-1 olduğunda gen ifadesini indüklemek için 100 µl IPTG (Stok konsantrasyonu 240 mg/ml) besiyerine ilave edilerek 37 °C’de büyümeye bırakıldı. Yaklaşık 4 saat sonra kültür alınarak 50 ml’lik propilen (Nalgene, Sigma-Aldrich) tüplere aktarıldı. 4 °C’de 5,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletler 1X PBS pH 7,2’de çözüldü. Daha sonra hücreler 3 (1+1+1) dakika boyunca sonikatörde parçalandı. 100 µl PBS içinde TritonX-100 eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika alt üst edilerek inkübe edildi. Son olarak, 4 °C’de 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrı bir yere alındı ve -80 °C’de muhafaza edildi. *E. coli* BL21(DE3)’e aktarılan pGEX-2T ve *E. coli* BL21(DE3)’in kendisinden de aynı yöntemle protein izolasyonu gerçekleştirildi.

2.3.12. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford’un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler ddH₂O ile 250 µl’ye tamamlandı. Ardından üzerine 250’şer µl hazır boya çözeltilerinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve

örnekler 96 gözlü mikropate üzerine aktarıldı ve UV-visible Spektroskopy System cihazı (Bio-rad) kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

2.3.13. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein ekspresyonunun gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile her bir örnekten 80 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerine muamele tamponu (60 mM Tris-HCl pH 6,8, % 25 Gliserol, % 2 SDS, % 5 β-merkaptoetanol, % 0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra % 12'lik SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 80 V akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi. SDS-PAGE'lerde yapılan yürütme işlemleri tamamlandıktan sonra jeller hızlı gümüş boyama tekniği ile boyandı. Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Aynı zamanda aynı örnekler ile yapılan SDS-PAGE'ler western blotlama yapılarak görüntülendi ve tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.3.14. Western Blot Hibridizasyonu

pGEX-2T vektörüne klonlanan BnBt ve MnD izolatlarına ait *vip3A* genlerinin *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ifade edildiklerini teyit etmek için western blot hibridizasyonu yapıldı. Bunun için pGEX-2T vektöründe GST kuyruğu ile füzyon oluşturacak şekilde ifade edilen proteinleri belirlemek için bu kuyruğa özgü antikorlar kullanıldı.

Yarı-kuru elektroforetik cihaz (BioRad) kullanılarak poliakrilamid jeldeki proteinler immobilon membrana aktarıldı. Bunun için immobilon-P (PVDF) membranı ve Whatman kâğıtları poliakrilamid jel büyüklüğünde kesildi. Öncelikle PVDF membran metanol içerisinde 1 dakika aktive etmek amacıyla bekletildi. Daha sonra transfer tamponunda (48 mM Tris, 39 mM Glisin, % 0,0375 w/v SDS) ıslatıldıktan sonra cihaza 3 Whatman kâğıdı, 1 immobilon-P (PVDF) membranı, poliakrilamid jel ve 3 Whatman kâğıdı olacak şekilde sırasıyla yerleştirildi. Cihaz 40 mA'de 1 saat çalıştırıldı. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran bloklama solüsyonuyla (50 ml 1X TBS, 2,5 g süt tozu, 25 µl Tween 20) bir saat oda sıcaklığında düşük hızla sallayarak bloklamaya bırakılmıştır. Bloklamanın ardından membran 3 kere 10'ar dakika 1X TBS içinde yıkandı. Daha sonra gece boyunca pGEX-2T için Anti-GST Antibody (GE Healthcare, 1:1000 sulandırma) içeren yıkama

solüsyonu (1X TBS'de hazırlanmış % 0,5'lik süt tozu ve % 0,05 Tween 20) içinde +4 °C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Membran tekrar 3 kere 10'ar dakika 1X TBS içinde yıkandı. Ardından 1 saat Anti-Goat IgG Alkaline Phosphatase antikoru (Merck Millipore, 1:5000 sulandırma) içeren yıkama solüsyonu içinde +4 °C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edilmesi sağlandı. Membran 3 kere 10'ar dakika 1X TBS içinde yıkandıktan sonra 2 kere 10'ar dakika AP tamponunda (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂+6H₂O) yıkandı. Son olarak 100 µl NBT (nitroblue tetrazolium) ve BCIP (bromochloroindolyl fosfat) (NBT/BCIP stok solusyonu, Roche, 11681451001) içeren 10 ml AP tampon içinde boyandı. Reaksiyon, protein bantlarının belirlenmesinin ardından membranın bolca dH₂O ile yıkanması ile durduruldu. Membran kurutuldu ve taranarak bilgisayara aktarıldı.

2.3.15. Üretilen Proteinlerin Saflaştırılması

pGEX-2T vektöründen gelen GST kuyruk ile birlikte ifade edilen proteinleri saflaştırmak için Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) kullanıldı. 150 µl glutathione sepharose 4B (rezin) iyice çalkalandıktan sonra bio-spin kromatografi kolonuna (BioRad) konuldu. Rezin ihtiva ettiği EtOH akıtıldıktan sonra 7 ml pH 7,4 PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kalan yaklaşık 120 µl rezin 120 µl PBS içinde çözüldü. Böylece 240 µl olan rezinin üstüne karıştırılan protein lizatları ilave edildi. Kromatografi kolonlarının kapakları kapatılarak +4 °C'de 30 dakika rezin ve protein örnekleri yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Kolondan akan kısım kontrol için bir tüpte toplandı. Daha sonra kolonlar 15 ml PBS ile yıkandı. Yıkamalarda kolon her seferinde PBS ile çalkalandı ve daha sonra PBS akıtıldı. Kolona en son 100 µl toplama tamponu (1 ml son hacim içinde 3,0733 mg glutathione reduced (Sigma, G4251) ve 50 µl 1M Tris HCl pH8) ilave edildi. 5-10 dakika inkübe edildikten sonra kolondan akıtıldı. Proteinlerin miktarları belirlendi ve örnekler % 12'lik SDS-PAGE'de yürütüldü ve GST antikoru ile western blot hibridizasyon analizine tabi tutuldu. Western sonucunda bantların oluştuğu membranlar kurutuldu ve taranarak bilgisayara aktarıldı. Protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre ölçümler yapıldı.

2.4. Elde Edilen Vip3 Proteinlerinin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

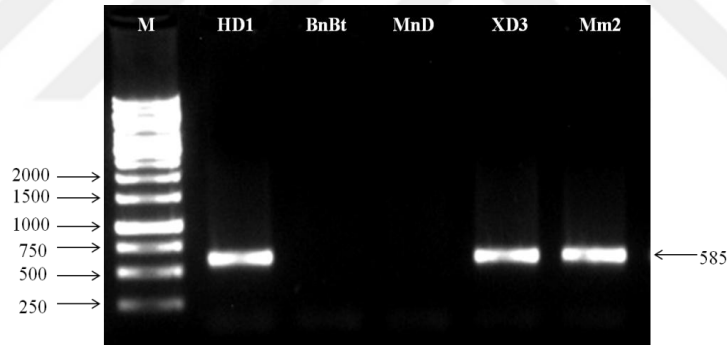
Bacillus thuringiensis kurstaki (MnD, BnBt) izolatlarının süpernatantlarından iyon değişimi kromatografisi yöntemiyle kısmi olarak saflaştırılan Vip3 proteinlerinin aktivitelerini test etmek için Lepidoptera takımına ait *Spodoptera littoralis* larvaları üzerinde biyotest çalışması yapıldı. Miktarları belirlenen Vip3 protein gruplarından 25 µg/ml konsantrasyonunda örnekler hazırlandı. Denemelerde negatif kontrol olarak su ve NaCl kullanıldı. *B. thuringiensis* MnD ve *B. thuringiensis* BnBt bakterilerine ait Vip3 proteinlerini içeren örnekler *S. littoralis* için marul yaprağı üzerine 10 µl numune bulaştırıldı. Uygulamadan önce 4 saat aç bırakılmış larvalar besinlerin üzerine bırakıldı. Her bir bakteriye ait Vip3 proteini için 30 adet larva test kaplarına yerleştirildi ve biyotestler 3 tekrarlı yapıldı. Biyotestler 25 °C'de gerçekleştirildi. Meydana gelen ölümler kaydedildi.

3. BULGULAR

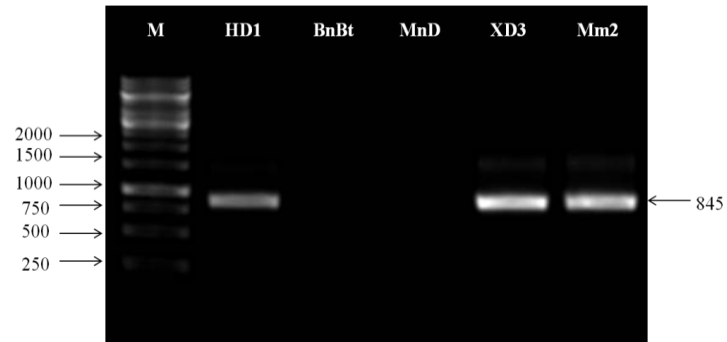
3.1. Lokal İzolatlara Ait *vip* Genlerinin Taranması, Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

3.1.1. *vip* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Yöntemiyle Belirlenmesi

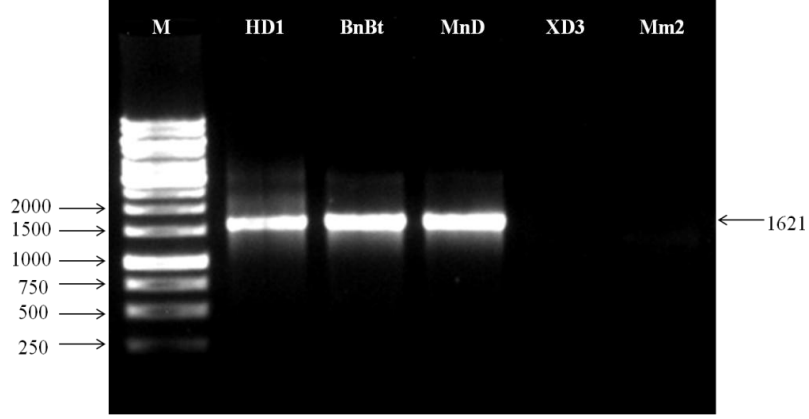
vip genleri, dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde elektroforez yapıldı. Sonuçta *vip1* geninin 585 bp, *vip2* geninin 845 bp, *vip3* geninin ise 1621 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu belirlendi (Şekil 5, 6, 7). Kontrol olarak kullanılan HD-1 izolatında da *vip1*, *vip2* ve *vip3* genlerinin varlığı gözlemlendi. Lokal izolatlardan *Bacillus thuringiensis kurstaki* MnD ve BnBt suşlarında *vip3* geni tespit edilirken *B. thuringiensis tenebrionis* Xd3 ve Mm2 suşlarında ise *vip1* ve *vip2* genlerinin varlığı belirlendi.



Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış *vip1* genlerinin agaroz jel görüntüsü M: 1 kb DNA Markır



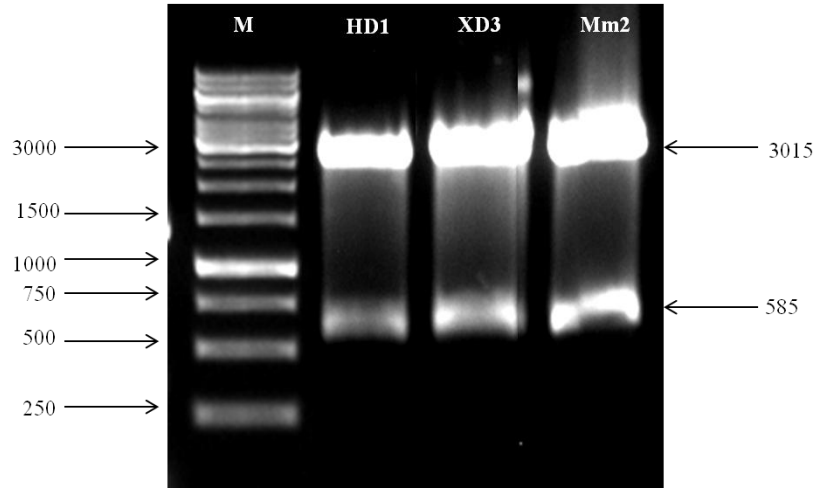
Şekil 6. PCR ile çoğaltılmış *vip2* genlerinin agaroz jel görüntüsü M: 1 kb DNA Markır



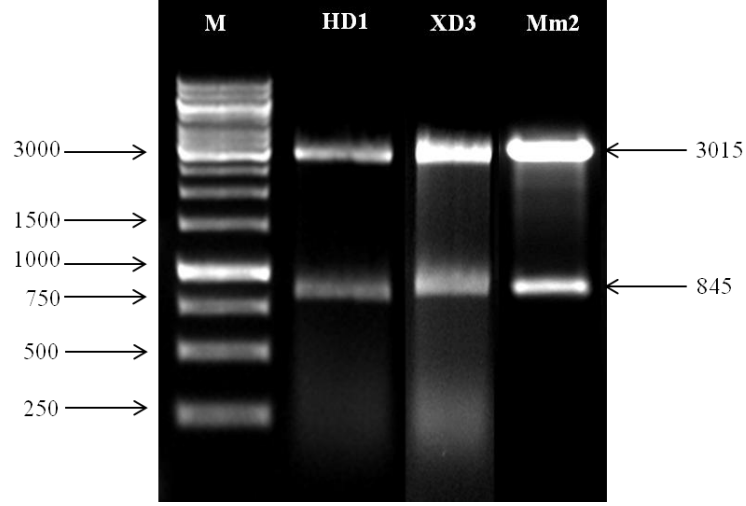
Şekil 7. PCR ile çoğaltılmış *vip3* genlerinin agaroz jel görüntüsü M: 1 kb DNA Markır

3.1.2. *vip* Genlerinin Klonlanması ve Baz Sıralarının Belirlenmesi

vip genleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEM-T Easy klonlama vektörüne aktarıldı. *vip* genlerinin pGEM-T Easy vektör içerisine klonlandığını belirlemek amacıyla vektör *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile muamele edildi. Şekil 8 ve şekil 9’da kesimi yapılan *vip1* geninin 585 bp ve *vip2* geninin 845 bp büyüklüğünde olduğu, lineer hale gelen klonlama vektörünün ise 3015 bp büyüklüğünde olduğu belirlendi.



Şekil 8. *vip1* genlerini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün *EcoRI* ile kesimi M: 1 kb DNA Markır



Şekil 9. *vip2* genlerini içeren pGEM-T Easy klonlama vektörünün *EcoRI* ile kesimi M: 1 kb DNA Markır

Klonlama vektörü içerisinde varlığı tespit edilen *vip1* ve *vip2* genlerinin nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. 1621 bp büyüklüğündeki *vip3* geninin pGEM-T Easy vektörüne klonlama çalışmaları yapıldı fakat sadece kontrol suş HD-1'e ait *vip3* geninin klonlanması yapılabildi. BnBt ve MnD izolatlarında PCR ile belirlenen *vip3* genine ait olan bantlar jelden temizlenerek sekansa gönderildi.

3.1.3. *vip* Genlerinin Nükleotid Sıralarının Literatür ile Karşılaştırılması

Elde edilen nükleotid sıraları NCBI web adresindeki BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut *vip* gen sıralarıyla karşılaştırıldı (Şekil 10, 11, 12, 13, 14, 15).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Brevibacillus laterosporus gene for Isp1b protein	359	359	99%	5e-95	78%	AJ872073.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis isolate DGA9 vip1 protein (vip1) gene, partial cds	294	294	99%	2e-75	76%	JN008908.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis vip operon, complete sequence	294	294	99%	2e-75	76%	EF442245.1

Şekil 10. Mm2 izolatına ait *vip1* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip1* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected:0							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis serovar morrisoni strain BGSC 4AA1 plasmid pBMB51, complete sequence	1511	1511	99%	0.0	99%	CP010582.1
<input type="checkbox"/>	Brevibacillus laterosporus gene for Isp2b protein	699	699	99%	0.0	82%	AJ872074.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain S1/4 plasmid vip2S-vip1S operon, complete sequence	682	682	99%	0.0	81%	KU726868.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis serovar tolworthi strain Na205-3 vegetative insecticidal protein (vip2Bb3) gene	682	682	99%	0.0	81%	KJ868170.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-328, complete sequence	682	682	99%	0.0	81%	CP004137.1

Şekil 11. Mm2 izolatına ait *vip2* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip2* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Sequences producing significant alignments:							
Select: All None Selected:0							
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis isolate DGA9 vip1 protein (vip1) gene, partial cds	268	268	93%	9e-68	76%	JN008908.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis vip operon, complete sequence	268	268	93%	9e-68	76%	EF442245.1

Şekil 12. Xd3 izolatına ait *vip1* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip1* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus gene for lsp2b protein	877	877	100%	0.0	83%	AJ872074.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar tolworthi strain Na205-3 vegetative insecticidal protein (vip2Bb3) gene, complete cds	868	868	100%	0.0	83%	KJ868170.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis vip operon, complete sequence	569	569	99%	4e-158	75%	EF442245.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain 376 vegetative insecticidal protein (vip2) gene, complete cds	567	567	99%	1e-157	75%	HM439097.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis Vip2Ac (vip2Ac) and Vip1Ac (vip1Ac) genes, complete cds	553	553	99%	3e-153	75%	AY245547.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HBF-18 Vip2 (vip2) gene, partial cds	549	549	99%	4e-152	75%	JQ855506.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HD525(140) vegetative insecticidal protein gene, complete cds	547	547	99%	1e-151	75%	EU940372.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain 84 vegetative insecticidal protein (vip2) gene, complete cds	544	544	99%	2e-150	75%	HM439099.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HD8 vegetative insecticidal protein (vip2A) gene, complete cds	535	535	99%	8e-148	75%	EU909204.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain DGA 20 Vip2 (vip2) gene, complete cds	444	444	99%	1e-120	71%	JN035904.1

Şekil 13. Xd3 izolatına ait *vip2* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip2* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis vip3A gene for vegetative insecticidal protein	560	770	35%	3e-155	96%	AJ971413.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HTS-S-4 Vip3Aa (vip3Aa) gene, complete cds	555	759	35%	1e-153	95%	KF560474.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Is2 vegetative insecticidal protein (vip3) gene, vip3-Aa allele, partial cds	555	759	35%	1e-153	95%	KT792883.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BTEG1 vegetative insecticidal protein VIP3a (vip3a) gene, partial cds	555	764	35%	1e-153	95%	KT985383.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FJAT14 vegetative insecticidal protein 3Aa gene, complete cds	555	764	35%	1e-153	95%	KR340473.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain NBIC-380 Vip3A-380 (vip3Aa) gene, partial cds	555	764	35%	1e-153	95%	KT307982.1

Şekil 14. BnBt izolatına ait *vip3* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip3* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain HTS-S-4 Vip3Aa (vip3Aa) gene, complete cds	610	838	32%	3e-170	99%	KF560474.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain Is2 vegetative insecticidal protein (vip3) gene, vip3-Aa allele, partial cds	610	838	32%	3e-170	99%	KT792883.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain BTEG1 vegetative insecticidal protein VIP3a (vip3a) gene, partial cds	610	844	32%	3e-170	99%	KT985383.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain FJAT14 vegetative insecticidal protein 3Aa gene, complete cds	610	844	32%	3e-170	99%	KR340473.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain NBIC-380 Vip3A-380 (vip3Aa) gene, partial cds	610	844	32%	3e-170	99%	KT307982.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain I131 vegetative insecticidal protein Vip3A (vip3A) gene, complete cds	610	838	32%	3e-170	99%	JQ946639.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain QBL-27 Vip3Aa gene, complete cds	610	844	32%	3e-170	99%	KF938679.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD1 vegetative insecticidal protein (vip3Aa) gene, complete cds	610	844	32%	3e-170	99%	HQ594534.1

Şekil 15. MnD izolatına ait *vip3* geninin nükleotid sıralarının literatürdeki *vip3* gen sıralarıyla karşılaştırılması

DNA dizin analizi sonucunda yapılan değerlendirmelere göre; *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarının *vip1* ve *vip2* genlerini, *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarının ise *vip3* genini ve kontrol suş olarak kullanılan HD-1 suşunun üç *vip* genini de içerdiği tespit edildi (Tablo 9).

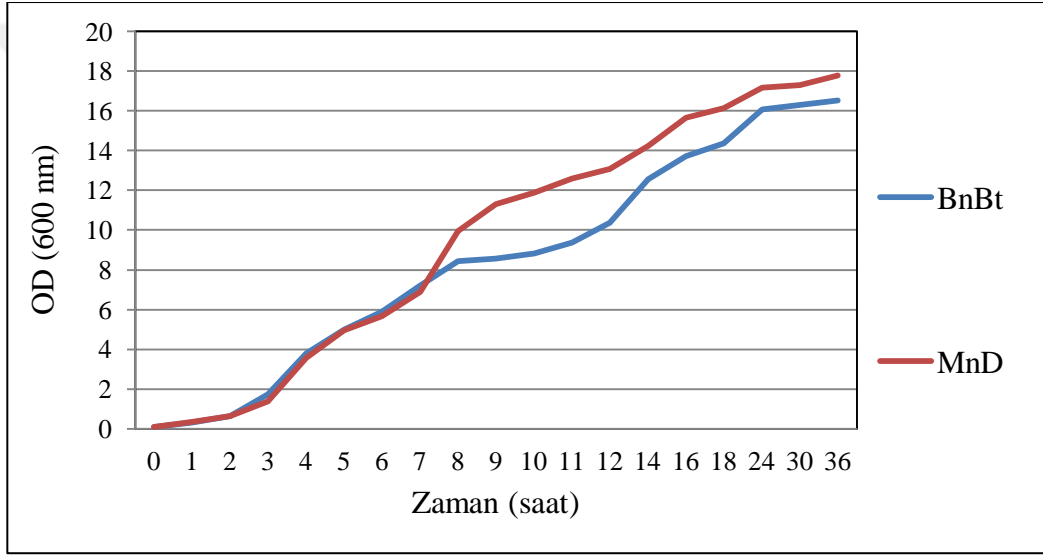
Tablo 9. Lokal izolatlarda tespit edilen *vip* genleri

Kod	Bakteri	<i>vip1</i>	<i>vip2</i>	<i>vip3</i>
HD1	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	+	+	+
BnBt	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	-	-	+
MnD	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	-	-	+
XD3	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	+	+	-
Mm2	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	+	+	-

3.2. Vip3 Proteinlerinin Eldesi ve Kısmen Saflaştırılması

3.2.1. *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) İzolatlarının Büyüme Eğrisinin ve Vejetatif Safhasının Belirlenmesi

B. thuringiensis kurstaki MnD ve BnBt izolatlarında tespit edilen Vip3 proteinlerinin, kültür süpernatantından elde edilebilmesi için öncelikle izolatların vejetatif safhasının saptanması amacıyla büyüme eğrisi belirlendi. Belirli zaman aralıkları ile OD₆₀₀'de yapılan ölçümler sonucunda, vejetatif safhanın maksimum olduğu zaman diliminin 24. saat olduğu belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. *Bacillus thuringiensis kurstaki* BnBt ve MnD izolatlarının büyüme eğrisi

3.2.2. Kültür Süpernatantlarından Vip3 Proteinlerinin İzolasyonu

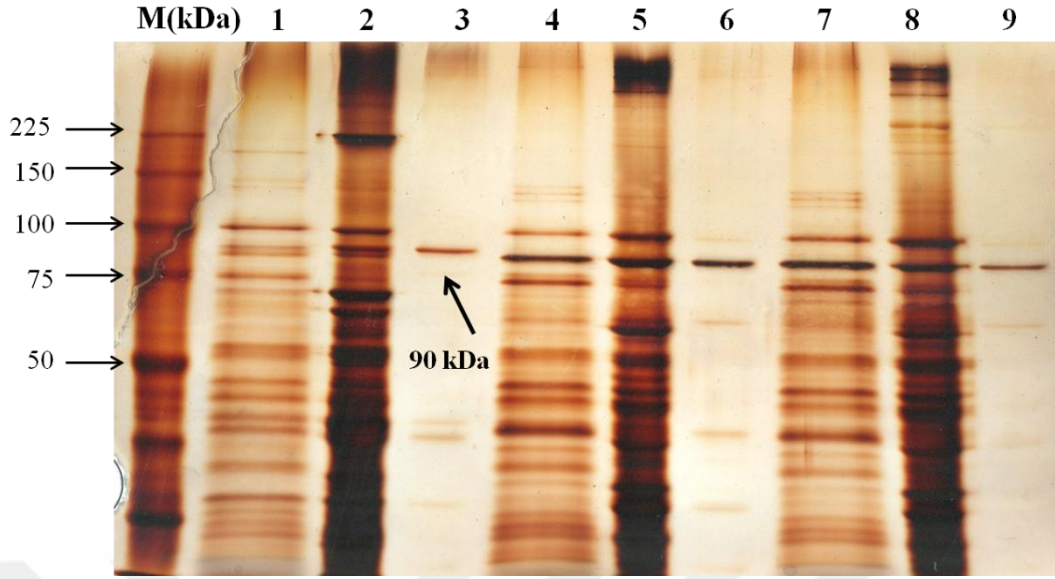
Vejetatif safhası belirlenen BnBt ve MnD izolatları Terrific (% 12 tripton; % 2,4 maya ekstraktı; % 0,04 gliserol; 0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄) sıvı besiyerinde 24 saat boyunca büyütüldü ve elde edilen kültürler santrifüjledikten sonra süpernatantlar saflaştırma işleminde kullanılmak üzere alındı.

3.2.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Vip3 proteinlerinin saflaştırılması için ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Sattar ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki amonyum sülfat ile çöktürülen örnekler lepidoptera zararlılarına karşı uygulanmış ve biyotestlerin sonucuna göre % 60'lık fraksiyonun en yüksek etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre BnBt ve MnD izolatlarına ait süpernatantlar % 60'lık konsantrasyonunda amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutuldu. Çöktürme sonrasında örnekler sanrifüjlenerek pelletler 100 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponunda çözüldü. Çöktürme işlemini takiben ortamdaki tuzun uzaklaştırılması amacıyla elde edilen örnekler ile gece boyu diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyalizin ardından bozunan proteinlerin atılması için örnekler santrifüj edildi.

3.2.2.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi ve SDS-PAGE Analizi

Vip3 proteinlerinin saflaştırılması için, elde edilen hücre özütü iyon değişimi kolon kromatografisinden geçirildikten sonra, elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE'de yürütüldü. Protein özütü içerdiği belirlenen fraksiyonlar diyaliz işlemine tabi tutularak fazla tuzdan arındırıldı. Proteinler, % 12'lik SDS-PAGE kullanılarak 80 V'lik akım altında yürütüldü. Vip3 proteinlerinin moleküler ağırlığı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile ilgili proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde birlikte yürütülmesi ile belirlendi. SDS-PAGE analizi sonucunda iyon değişim kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılan Vip3 proteinleri için ~ 90 kDa'luk bir bant tespit edildi (Şekil 17).

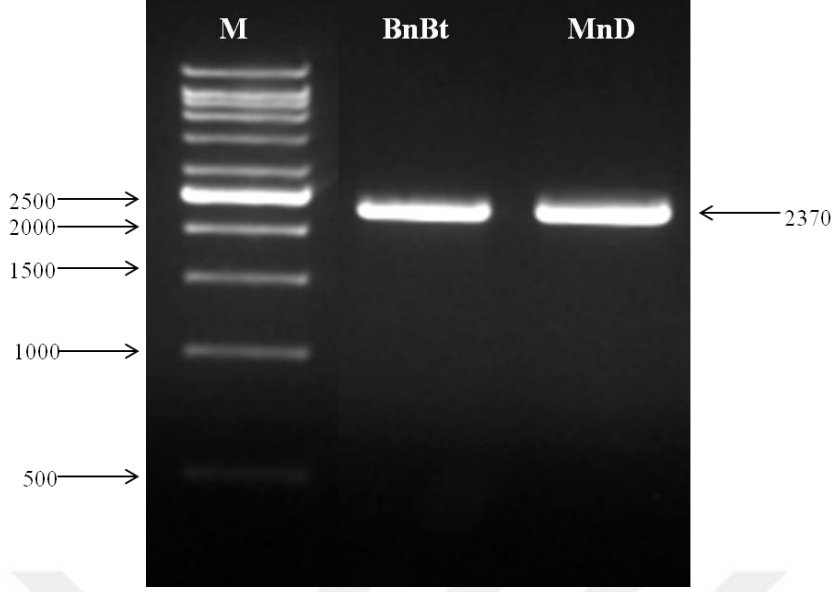


Şekil 17. *Bacillus thuringiensis* izolatlarından kısmen saflaştırılmış Vip3 proteinlerinin SDS-PAGE analizi 1,4,7- HD-1, BnBt ve MnD suşlarının kaba ekstraktı. 2,5,8- HD-1, BnBt ve MnD süpernatantlarının %60'lık amonyum sülfat çöktürülmesi. 3,6,9- İyon değişimi kolon kromatografisi.

3.3. *vip3A* Geninin Belirlenmesi, Klonlanması ve İfade Edilmesi

3.3.1. *vip3A* Genlerinin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

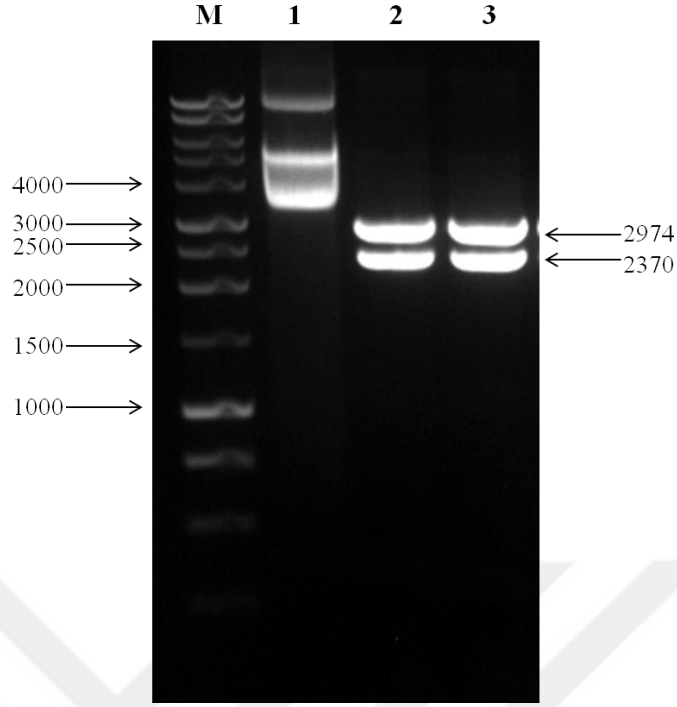
Bacillus thuringiensis kurstaki BnBt ve MnD bakterilerinde, dizayn edilen primerler yardımıyla tam uzunluktaki *vip3A* geni belirlendi. PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde elektroforez tabii tutuldu ve 1 kb'lik DNA marker (Vivantis) ile karşılaştırıldığında 2.370 bp büyüklüğündeki *vip3A* belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18. PCR ile çoğaltılmış *vip3A* genlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 1 kb DNA Markır (Vivantis)

3.3.2. *vip3A* Genlerinin pJET1.2/blunt Klonlama Vektörüne Klonlanmaları, Baz dizilimlerinin Belirlenmesi ve Filogenetik Analizi

Bacillus thuringiensis kurstaki BnBt ve MnD bakterilerine ait *vip3A* genleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarıldı. *vip3A* geninin pJET1.2/blunt vektörü içerisine klonlandığını belirlemek amacıyla *Bgl*III restriksiyon endonükleaz ile muamele edildi. Kesimi yapılan *vip3A* geninin 2.370 bp büyüklüğünde olduğu, lineer hale gelen klonlama vektörünün ise 2.974 bp büyüklüğünde olduğu belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. *vip3A* genlerini içeren pJET1.2/blunt vektörünün *Bgl*III ile kesimi M: 1 kb DNA Markır 1) Kesilmemiş plazmit. 2) BnBt izolatındaki *vip3A*'yı içeren pJET1.2/blunt vektörünün *Bgl*III ile kesimi. 3) MnD izolatındaki *vip3A*'yı içeren pJET1.2/blunt vektörünün *Bgl*III ile kesimi.

Klonlama vektörüne klonlanan ve varlığı tespit edilen *vip3A* genlerinin dizin analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genin her iki tarafından gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre toplam BnBt izolatına ait *vip3A* için 2.110 bp, MnD izolatına ait *vip3A* için 2.063 bp uzunluğunda bir sıra elde edildi. Genin tamamı 2.370 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgelerin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*vip3araPr*; 5'- GAGTAAACATCCTCCCTACAC-3') dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için tekrar dizin analizine gönderildi. Ara bölgenin de sırası belirlendikten DNA dizin analizi tam olarak gerçekleştirildi (Şekil 20). DNA dizin analizi gerçekleştirilen genin aminoasit sırası da belirlendi (Şekil 21).

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

Şekil 20. BnBt ve MnD izolatlarına ait *vip3A* geninin DNA sırası (2370 bp)

```

MNKNNTKLSTRALPSFİDYFNGİYG FATGİK DİNMİFKTDTGGDLTLDEİLKNQ
QLLNDİSGKLDGVNGSLNDLİAQGNLNTLSKEİLKİANEQNQVLNDVNNKLDA
İNTMLRVYLPKİTSMLSDVMKQNYALSLQİEYLSKQLQEİSDKLDİİNVNVLİNST
LTEİTPAYQRİKİYVNEKFEELTFATETSSKVKKDGSPADİDELTELTELAKSVTK
NDVDGFEFYLNTHDVMVGNNLFGRSALKTASELİTKENVKTSGSEVGNVYNF
LİVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLADİDYTSİMNEHLNKEKEEFRVNİLPTLSNTF
SNPNYAKVKGSDDEAKMİVEAKPGHALİGFEİSNDSİTVLKVYEAKLKQNYQVD
KDSLSEVİYGDMDKLLCPDQSEQİYYTNNİVPNEYVİTKİDFTKKMKTLRYEVT
ANFYDSSTGEİDLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMPPLGVİSETFLTPİNGFGL
QADENSRLİTLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLİVPPSGFİSNİVENGSİEEDNLEP
WKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGİSQFİGDKLKPKEVİQYTVKG
KPSİHLKDENTGYİHYEDTNNNLEDYQTİNKRF TTGTDLKGVYLİLSQNGDEA
WGDNFİİLEİSPSEKLLSPELİNTNNWTSTGSTNİSGNTLTLYQGGRGİLKQNLQL
DSFSTYRVYFSVSGDANVRİRNSREVLFEKRYMSGAKDVSEMFTTKFEKDNFYİ
ELSQGNLYGGPİVHFYDVSİK*

```

Şekil 21. BnBt ve MnD izolatlarına ait *vip3A* geninin aminoasit sırası (790 aa)

Elde edilen protein sırasının NCBI web adresindeki BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut *vip3A* genleri ile karşılaştırması yapıldı (Şekil 22).

Sequences producing significant alignments:

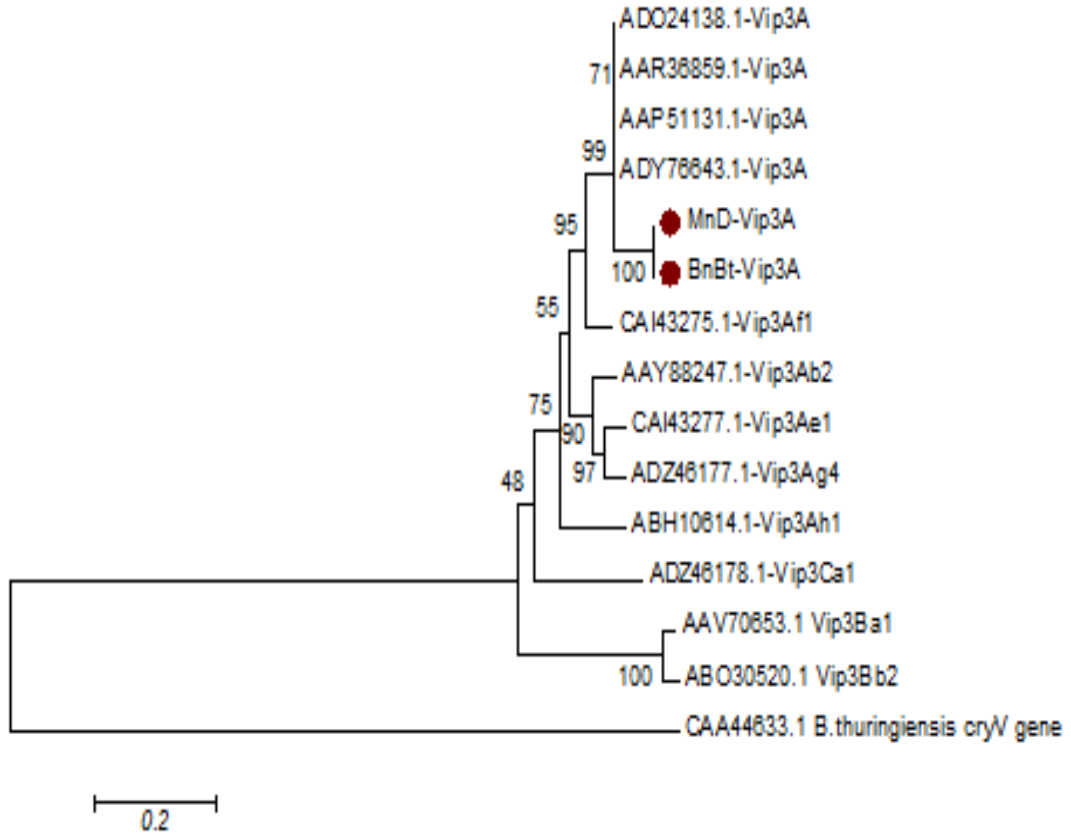
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed2, complete sequence	4381	4381	99%	0.0	100%	CP009999.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD1 vegetative insecticidal protein (vip3Aa) gene, complete cds	4381	4381	99%	0.0	100%	HQ594534.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein Vip3A gene, complete cds	4377	4377	99%	0.0	100%	AY295778.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain C9 vegetative insecticidal protein (vip3A) gene, complete cds	4375	4375	99%	0.0	100%	AY489126.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BTEG1 vegetative insecticidal protein VIP3a (vip3a) gene, partial cds	4372	4372	99%	0.0	100%	KT985383.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HTS-S-38 Vip3Aa gene, complete cds	4372	4372	99%	0.0	99%	KF938680.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain QBL-27 Vip3Aa gene, complete cds	4372	4372	99%	0.0	99%	KF938679.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Za4.3 vegetative insecticidal protein Vip3Aa45 gene, complete cds	4372	4372	99%	0.0	99%	JF710269.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis strain IS5056 Vip3A (vip3A) gene, complete cds	4372	4372	99%	0.0	99%	HM536939.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar entomocidus strain HD-110 vegetative insecticidal protein (vip3Aa) gene, complete cds	4372	4372	99%	0.0	99%	HM132041.1

Şekil 22. BnBt ve MnD izolatlarına ait *vip3A* geninin literatürdeki diğer *vip3A* gen sıralarıyla karşılaştırılması

Aminoasit dizisi belirlenen Vip3A proteininin literatürde bulunan diğer Vip3A proteinleriyle akrabalık derecelerini belirleyebilmek için MEGA 5 programında bulunan Neighbour Joining analizi kullanıldı. Ağacı oluşturmak için kullanılan diğer diziler NCBI veri tabanından elde edilmiştir (Şekil 23).

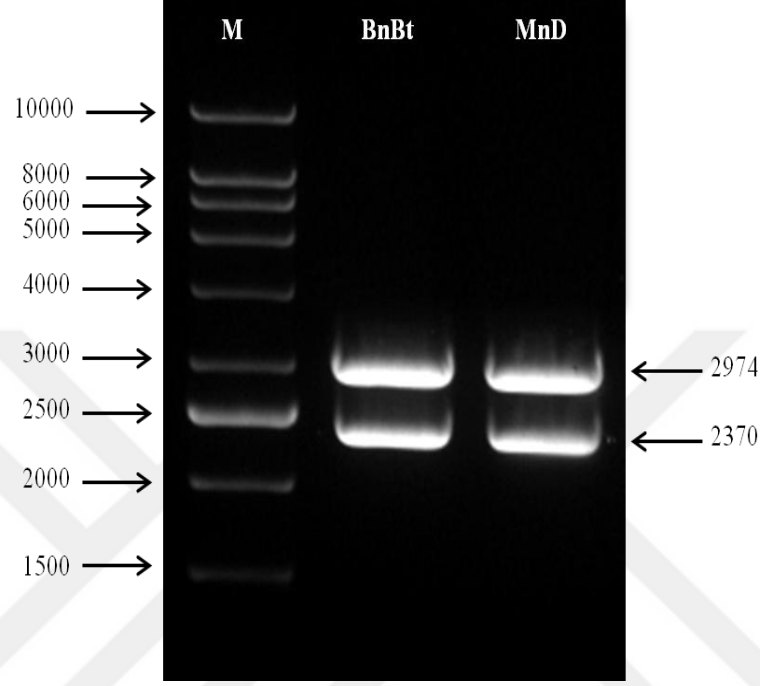


Şekil 23. Vip3A proteininin Neighbor-Joining analizi ile filogenetik ağacı (Bootstrap metodu ile 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirildi)

3.3.3. *vip3A* Geninin pGEX-2T Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

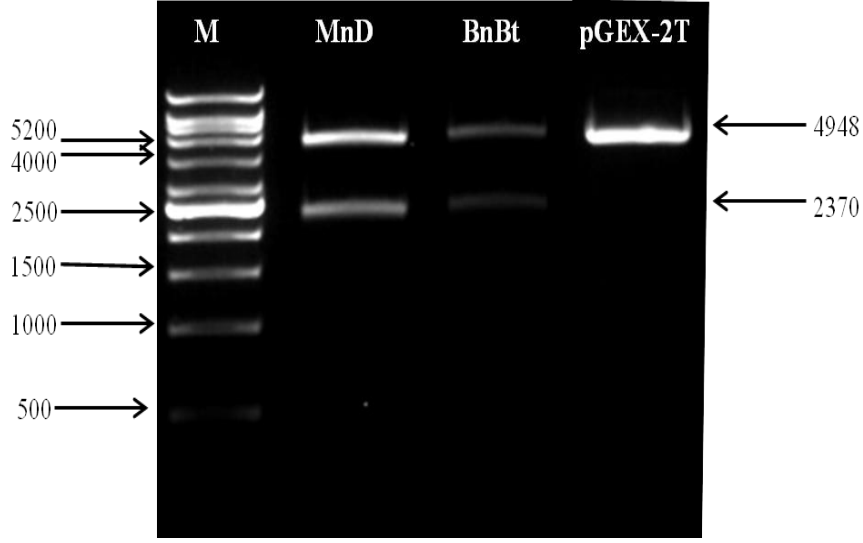
Sekansı belirlenen klonlardan seçilen tek koloniden kit ile plazmid DNA izolasyonu yapıldı. pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış *vip3A* geni, ekspresyon vektörlerine klonlamak için *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 24). Aynı zamanda pGEX-2T ekspresyon vektörü de aynı restriksiyon enzimler ile kesildi. Klonlama vektörü olan pJET1.2/blunt vektör içinde olan *vip3A* geni *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleriyle kesildiğinde 2.974 bp büyüklüğünde lineer olarak pJET1.2/blunt vektör ve 2.370 bp büyüklüğünde küt uçlu *vip3A* geni meydana geldi. Aynı

enzim kesim bölgesine sahip olan pGEX-2T ekspresyon vektörünün büyüklüğü de 4.948 bp olarak belirlendi. *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve *vip3A* geni birbirine yapıştırıldı.



Şekil 24. *vip3A* genlerini içeren pJET1.2/blunt vektörünün *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleriyle kesimi M: 1 kb DNA Markır (Promega, Vivantis)

vip3A genleri ile yapıştırılan pGEX-2T plazmitleri *E. coli* DH10 β konak hücresine aktarıldı. Transformasyon sonunda meydana gelen kolonilerden plazmit DNA'lar izole edildi. Bu plazmitlerin *vip3A* genini içerip içermediğini doğrulayabilmek için *Bam*HI ve *Eco*RI enzimleri ile kesim yapıldı (Şekil 25). Kesimi yapılan pGEX-2T ekspresyon vektörünün 4.948 bp büyüklüğünde olduğu gözlemlendi. Ayrıca yapılan kesim ile vektör içerisinde 2.370 bp büyüklüğünde *vip3A* genleri taşındığı belirlendi. *vip3A* genini içeren plazmitler seçildi ve daha sonra protein ekspresyon çalışmalarında kullanıldı.



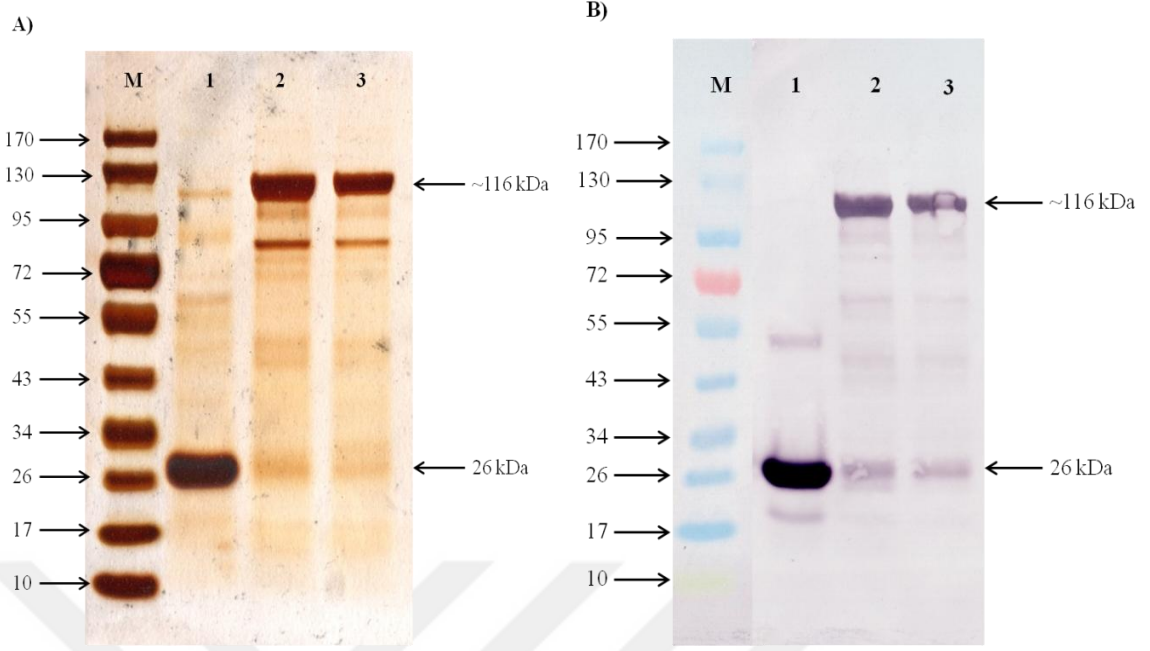
Şekil 25. pGEX-2T vektörünün ve *vip3A* genini içeren pGEX-2T vektörünün *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon enzimleriyle kesimi

3.3.4. Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

Baz dizilimi belirlenen *vip3A* genleri pGEX-2T ekspresyon vektörüne GST kuyruğu içerecek şekilde klonlandı. pGEX-2T vektörü, çoklu klonlama bölgesinin önünde (MCS) güçlü bir promotor ve glutation S transferaz (GST) geni içermektedir. MCS'ye klonlanan genler GST ile füzyon olacak şekilde ifade edilir.

Protein ekspresyonu için *vip3A* genlerinin klonlandığı pGEX-2T vektörleri, *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Ayrıca, kontrol amacıyla *vip3A* genini içermeyen pGEX-2T vektörü de aynı hücrelere aktarıldı. *vip3A* geninin klonlandığı pGEX-2T vektörünün transform edildiği *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden, sadece pGEX-2T'nin transfer edildiği *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden ve içerisinde plazmit bulunmayan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinden proteinler ifade edildi. İfade edilen ve GST kuyruğu içeren proteinler saflaştırıldı. Saflaştırma işleminden sonra proteinler SDS-PAGE'te yürütüldü.

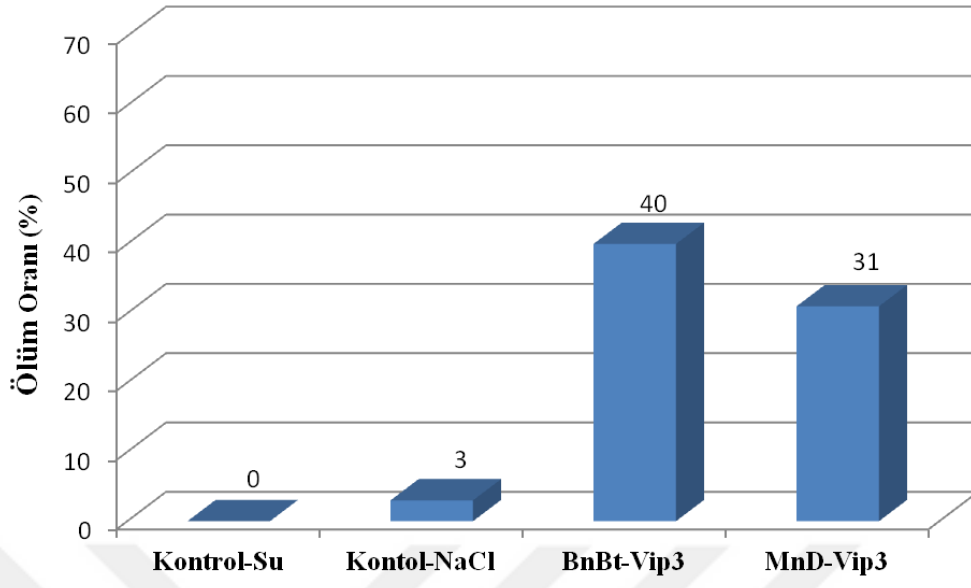
SDS-PAGE analizi sonucunda, *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ifade edilmiş ve saflaştırılmış GST kuyruk ile birlikte ifade edilen Vip3A proteini için ~116 kDa'luk bantlar belirlendi. Saflaştırılmış GST kuyruğu ile tek başına 26 kDa'luk bant elde edildi (Şekil 26).



Şekil 26. pGEX-2T vektörüne klonlanıp kısmen saflaştırılan rekombinant Vip3A proteininin SDS-PAGE analizi, M: Protein marker (10-170 kDa, Fermentas) A) Hızlı gümüş boyama sonrası elde edilen SDS-PAGE görüntüsü. B) Western Blot analizi sonrası elde edilen SDS-PAGE görüntüsü. 1- Saflaştırılmış GST kuyruğu (26 kDa). 2- BnBt izolatından saflaştırılan GST ile füzyon oluşturmuş Vip3A proteini (GST+Vip3A: ~116 kDa). 3- MnD izolatından saflaştırılan GST ile füzyon oluşturmuş Vip3A proteini (GST+Vip3A: ~116 kDa).

3.4. Elde Edilen Vip3 Proteinlerinin *Spodoptera littoralis* Larvaları Üzerindeki İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

Bacillus thuringiensis kurstaki BnBt ve MnD izolatlarına ait Vip3 proteinlerinin aktivitelerini test etmek için Lepidoptera takımına ait *Spodoptera littoralis* larvaları bu çalışmada biyotest organizması olarak kullanıldı. Vip3 proteinlerinden 25 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan örnekler *S. littoralis* larvalarına besin yoluyla verildi. BnBt izolatına ait Vip3 proteini verilen larvalarda % 40'lık, MnD izolatına ait Vip3 proteini verilen larvalarda % 31'lik ölüm oranı gözlemlendi. Negatif kontrol olarak verilen su ve NaCl'nin besin yoluyla verilmesinde ise larvalarda sırasıyla % 0 ve % 3 oranında ölüm meydana geldi (Şekil 27). Meydana gelen ölümlerin % 90'ı protein alımından 24 saat sonrasında gözlemlenmiştir. Daha sonraki günlerde ise besin alımının yavaşladığı görülmüştür.



Şekil 27. Vip3 proteinin *Spodoptera littoralis* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

4. TARTIŞMA

Günümüzde zararlı böceklerle mücadelede çok yoğun şekilde kullanılan kimyasalların doğaya ve insanlara vermiş olduğu zarar hepimiz tarafından çok iyi bilinmektedir. Bu anlamda kimyasal mücadeleye en iyi alternatif çevre dostu bitki koruma ürünleriyle yapılacak mikrobiyal mücadeledir. Mikrobiyal mücadele kapsamında farklı böcek türleri üzerinde yüksek oranda insektisidal etkiye sahip ve çevre için güvenli olan bazı entomopatojen bakteriler tarım zararlılarının kontrolünde kimyasal pestisitlere karşı önemli bir alternatiftir.

Zararlı böceklerin kontrolü için entomopatojenik bakteriler arasında en fazla tercih edileni *B. thuringiensis*'dir. Bunun en önemli nedenlerinden biri insektisidal etkisi yüksek olan proteinleri üretme yetenekleridir. Bugüne kadar en yaygın olarak kullanılan insektisidal proteinler, *B. thuringiensis*'den elde edilen Cry proteinleridir. Bu proteinler sporlanma sırasında parasporal kristallerde birikir ve hücre duvarı parçalandıktan sonra kültür ortamına salınır. *B. thuringiensis*'in kristallerine ve sporlarına dayalı formülasyonlar, lepidopteran böceklerin geniş bir kısmını, bazı coleoptera, karasinekler ve sivrisinek türlerini kontrol etmek amacıyla başarıyla kullanılmaktadır (Sanchis, 2011; Sanahuja vd., 2011, Chakroun, 2015).

Cry proteinlerinin zirai mücadeledeki geniş başarısına rağmen, artan böcek direnci ve dar insektisidal spektrumları *Bt* teknolojisinin uzun vadeli sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir (McGaughey, 1985; Schnepf, vd., 1998; Shingote vd., 2013). Bu problemin üstesinden gelebilmek için, bilinen Cry proteinlerinden farklı özelliklere sahip yeni insektisidal proteinler belirlemek ve karakterize etmek amacıyla çok çeşitli habitatlardan yeni *B. thuringiensis* izolatlarının araştırılması ile ilgili çalışmaların arttığı görülmüştür. *B. thuringiensis*'in vejetatif büyüme safhası sırasında, bazı suşların vejetatif insektisidal proteinler (Vip) olarak adlandırılan, ortama salgılanan proteinler ürettiği ve bir takım böceklere karşı insektisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Estruch vd.,1996; Schnepf vd., 1998; Donovan vd., 2001; Milne vd., 2008).

Bu tez çalışması, daha önce izole ve karakterize edilmiş, laboratuvarımızda mevcut olan bazı lokal *Bacillus thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) suşlarında *vip* (*vip1*, *vip2* ve *vip3*) genlerinin varlığının ilk kez araştırılması, lepidopterler üzerinde etkili olan Vip3A proteinlerinin süpernatanttan iyon değişim kromatografisi ile elde edilerek *Spodoptera littoralis* zararlısına karşı uygulanması ve

vip3A genlerinin *E. coli* BL21(DE3)'ye klonlanıp ifade edilmesi bakımından özgün değer taşımaktadır.

Lokal *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarında ve kontrol suş HD-1'de *vip* genlerinin (*vip1*, *vip2* ve *vip3*) varlığının belirlenmesi için ilk olarak PCR çalışmaları yapıldı. Bu amaç doğrultusunda, Hernández-Rodríguez ve arkadaşları (2009) tarafından *vip* gen ailelerinin korunmuş bölgelerinden dizayn edilmiş olan primerler kullanılarak *vip1* (585 bp), *vip2* (845 bp) ve *vip3* (1621 bp) gen bölgeleri kısmi olarak çoğaltıldı. PCR sonunda elde edilen bantlar agaroz jelden kesilip temizlenerek pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Klonların doğrulanması amacıyla elde edilen plazmitler DNA dizin analizine gönderilerek gelen sonuçlar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda elde edilen verilere göre; *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarının *vip1* ve *vip2* genlerini, *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarının ise *vip3* genini ve kontrol suş olarak kullanılan HD-1 suşunun üç *vip* genini de içerdiği tespit edildi.

Hernández-Rodríguez ve arkadaşları (2009), 507 suştan oluşan *B. thuringiensis* koleksiyonunda bilinen *vip* genlerini belirlemek ve potansiyel olarak yeni *vip* genlerini tespit etmek amacıyla bir çalışma yaptılar. İlk olarak 507 *Bt* suşunda PCR taraması gerçekleştirildi. *vip* genlerinin taranması, *vip* gen ailelerindeki uygun bölgelerden dizayn edilmiş primerler ile yapıldı. Yapılan tarama ile 507 suştan 54 suşta (% 10,7) *vip1* genini, 46 suşta (% 9,1) *vip2* genini ve 248 suşta (% 48,9) ise *vip3* genini tespit ettiler. Daha sonra aynı ailedeki farklı *vip* genlerin tanımlanması için Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullandılar. Yapılan bu çalışma ile iki yeni *vip* genini keşfettiler. Bu çalışmada gerçekleştirilen strateji ile, bilinen *vip* genlerinin sınıflandırılmasına ve yeni *vip* genlerinin tanımlanmasına öncülük edebileceğini ileri sürdüler.

Cry proteinlerine karşı dirençlilik tespit edilen Lepidoptera grubuna ait zararlılara karşı Vip3 proteinlerinin son derece etkili olduğu günümüze kadar yapılan çalışmalarla belirtilmiştir: *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda* (Estruch vd., 1996; Figueiredo vd., 2013), *Helicoverpa zea*, *Chilo partellus*, *Phthorimaea operculella*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta* (Lee vd., 2003), *Ephestia kuehniella* (Abdelkefi-Mesrati vd., 2005), *Spodoptera litura* (Bhalla vd., 2005), *Trichoplusia ni* (Fang vd., 2007), *Chrysodeixis chalcites*, *Lobesia botrana*, *Mamestra brassicae*, *Spodoptera littoralis*, *Plutella xylostella* (Palma vd., 2013), *Ectomyelois ceratoniae* (Ruiz de Escudero vd., 2014; Boukedi vd.,

2015). Bu çalışmada da Lepidoptera takımından *S. littoralis*'e karşı insektisidal etkisini araştırmak üzere *vip3* geninin bulunduğu belirlenen lokal izolatlardan Vip3 proteinlerinin elde edilmesi için çalışmalar yapıldı.

B. thuringiensis kurstaki BnBt ve MnD izolatlarında tespit ettiğimiz Vip3 proteinlerinin kültür süpernatantından elde edilebilmesi için öncelikle bu izolatların vejetatif safhasını belirlemek amacıyla büyüme eğrisi grafiği çizildi. Belirli zaman aralıkları ile OD₆₀₀'de yapılan ölçümler sonucunda, vejetatif safhanın maksimum olduğu zaman diliminin 24. saat olduğu belirlendi. Bu deneyin sonucu, Estruch ve arkadaşları (1996) ile Sattar ve arkadaşları (2008) tarafından farklı *Bt* suşları için gösterilen büyüme modeline çok benzer olduğu görüldü. Vip3 proteinlerini içeren izolatlar, Teriffic broth besiyerinde 24 saat büyütülmeye bırakılarak kültürler elde edildi. Sattar ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada % 0-80 arasında yapılan farklı doygunluktaki amonyum sülfat çöktürmeleri sonucunda lepidopteran zararlılarına karşı en yüksek aktivite % 60'lık fraksiyonunda gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma baz alınarak bu tez kapsamında da kültürler santrifüj edildikten sonra ilgili proteinleri içeren süpernatantlar % 60 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutuldu. Santrifüj ile çöktürülen proteinler uygun tamponda çözüldü ve tuzdan arındırılması için gece boyu diyalize bırakıldı. Proteinlerin kısmen saflaştırılmasını gerçekleştirmek için Q-Sepharose (Anyon değiştirici) içeren kolon ile tek aşamalı iyon değişimi kromatografisi yapılarak fraksiyonlar elde edildi. Fraksiyonlar, % 12'lik SDS-PAGE'de yürütülerek Vip3 proteinlerini içeren fraksiyonlar belirlendi. Daha sonra bu fraksiyonlar birleştirildi ve SDS-PAGE analizi ile ~90 kDa'luk proteinin varlığı gözlemlendi. Daha önce yapılan birçok çalışmada da bildirilen Vip3 proteinleri ile benzer büyüklükte olduğu görüldü (Estruch vd., 1996; Selvapandiyan vd., 2001; Doss vd., 2002; Cai vd., 2003; Bhalla vd., 2005; Mesrati vd., 2005, Sattar vd., 2008).

BnBt ve MnD izolatlarından kısmen saflaştırılan Vip3 proteinlerinin miktarları Bradford metoduyla belirlendi. *Spodoptera littoralis* ikinci dönem larvalarına 25 µg/ml konsantrasyonunda proteinler verilerek insektisidal aktiviteleri gözlemlendi. 10 gün boyunca kaydedilen ölümler sonucunda BnBt izolatından elde edilen Vip3 proteininin % 40, MnD izolatından elde edilen Vip3 proteininin ise % 31 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu bulundu. Sattar ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada Vip3 proteininin tek bant olarak elde edilebilmesi için iki aşamalı iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Aynı çalışmada; farklı *Bt* izolatlarının süpernatantlarından elde edilen ham protein ekstraktları ve iyon değişimi kromatografisi ile kısmen saflaştırılan Vip3 proteinleri ile

Agrotis ipsilon, *Helicoverpa armigera* ve *Spodoptera littoralis* zararlılarına karşı biyotest uygulanmıştır. Yumurtadan yeni çıkan larvalara 25 µg/ml ham protein ekstraktı verilerek yapılan çalışmalar ile 7 gün boyunca ölümler izlenmiş ve % 11 - % 95 arasında farklı ölüm oranları kaydedilmiştir. En fazla toksisite gözlenen *Bt* izolatu seçilerek iki aşamalı DEAE-Sephacel anyon değişim kolonu ile Vip3 proteini saflaştırılmış ve lepidopteran zararlılarına karşı test edilerek LC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Tezimizin ikinci kısmında yapılan çalışmalar kapsamında Lepidopteralar üzerinde insektisidal etkisi bulunan *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarında tespit ettiğimiz *vip3A* geninin 2.370 bp'lık tam uzunlukta elde edilebilmesi için yeni bir primer çifti dizayn edildi. PCR yöntemi ile çoğaltılan *vip3A* geni pJET1.2/blunt vektörüne klonlandı. Elde edilen doğru klonlar DNA dizin analizine gönderilerek sonuçlar değerlendirildi. Başlangıçta, Macrogen (Hollanda) firmasına yaptırılan DNA dizin analizi sonucunda BnBt izolatu için 5' yönünden 1.038 baz, 3' yönünden ise 1.072 bazlık kısmı ve MnD izolatu için 5' yönünden 999 baz, 3' yönünden ise 1.064 bazlık kısmı tespit edildi. *vip3A* geninin tamamı 2.370 bp uzunluğunda olduğu için eksik olan bölgenin belirlenmesi için yeniden bir primer dizayn edildi. Yapılan dizi analizi sonucunda elde edilen veriler ile ilk gelen sonuçlar Clustal W Multiple Sequence Alignment programı ile karşılaştırılarak *vip3A* geninin tam sırası ortaya çıkarıldı. *vip3A* geni, 2.370 bp uzunluğunda olup 790 aminoaside sahiptir.

Kolay çalışılabilir olması, rahat elde edilebilmesi ve daha önce yapılan çalışmalarda verimli sonuçlar alınması nedeniyle bu çalışmada klonlama ve ekspresyon için konak olarak *E. coli* kullanıldı. Yapılan çalışmalarda, *B. thuringiensis kurstaki* MnD ve BnBt izolatlarında *vip3A* gen sıralarının tam olarak elde edilmesinin ardından genin ekspresyonu için çoklu klonlama bölgesinin önünde (MCS) güçlü bir promotor ve glutation S transferaz (GST) geni içeren pGEX-2T vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) konak hücresinde ifade edildi. Daha sonra GST kuyruğu içeren proteinler saflaştırıldı ve ardından SDS-PAGE analizi yapıldı. SDS-PAGE'in ardından yapılan gümüş boyama ve western blot analizi sonucunda saflaştırılmış olan GST kuyruk ile birlikte ifade edilen Vip3A proteinlerinin büyüklüğü yaklaşık olarak 116 kDa'luk bant olarak görüldü. Bunun nedeni, ~90 kDa olan Vip3A proteinine 26 kDa'luk GST kuyruğun eklenmesiyle 116 kDa'luk banta denk gelmesidir. ~116 kDa civarında belirlenen bant hizasında boş plazmitte bant gözlemlenmedi.

El-Ghareeb ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, lokal *B.*

thuringiensis izolatının vejetatif safhasında salındığı belirlenen Vip3Aa proteininin *S. littoralis* üzerindeki insektisidal aktivitesini belirlediler. Bunun için ilk olarak plazmit DNA'sından tam uzunlukta *vip3Aa* (2,3 kb) geni izole edildi. Buna ek olarak, bakteri suşundan izole edilen genomik DNA'da *vip3Aa* geninin saptanmadığı ve plazmit kaynaklı bir gen olabileceğini belirttiler. Daha sonra *vip3Aa* geni pGEM-T vektörüne klonlandı ve sekanslanarak gen dizilimini belirlediler. pQE-30 ekspresyon vektörüne klonlayarak *E.coli*'de ifade ettiler. İfade edilerek saflaştırılmış Vip3Aa proteininin toksisitesi, *S. littoralis*'in ilk instar larvalarına karşı biyotest yapılarak belirlediler ve yabancı suşla karşılaştırma yaptılar. Biyotest sonuçlarına göre yabancı suşun, rekombinant saflaştırılmış proteinden daha toksik olduğu belirtilmiştir. Mortalitedeki bu farklılığın, ekspresyonun doğasına ve rekombinant proteinin N-ucuna kaynaştırılan 0,5 kDa'dan kaynaklanabileceği söylenmiştir.

Bhalla ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada da, 24 tane *B. thuringiensis* (*Bt*) suşunda, *vip3Aa1*'e spesifik primerler kullanarak vejetatif insektisidal protein geni (*vip*) benzeri dizilerin varlığını saptamak için polimeraz zincir reaksiyonu ile tarandı. *vip*-benzeri gen sekansları sekiz bakteri suşunda tanımlandı ve bu genler klonlanarak gen dizilimi belirlendi. *B. thuringiensis tolwarthi*'den aminoasit dizisi belirlenen *vip*-benzeri genin şimdiye kadar bildirilen Vip proteinleri ile karşılaştırıldığında önemli farklılıklar gösterdiğini belirlediler. Vip3Aa1'den farklı olan bu geni *vip3Aa14* geni olarak tanımladılar. *Bt tolwarthi*'den gelen *vip3Aa14* geni, tam uzunlukta ve kesilmiş (sinyal diziliminden yoksun) olarak ayrı ayrı ekspresyon vektörü pET29a kullanılarak *E. coli*'de ifade edildi. İfade edilen Vip3Aa14 proteini sitozolik süpernatantda olduğu kadar pelet fraksiyonunda da bulunduğunu, ancak bu proteinin sitozolik süpernatant fraksiyonunda daha bol miktarda bulunduğunu belirttiler. Tam uzunlukta ve kesilmiş Vip3Aa14 proteinleri, *Spodoptera litura* ve *Plutella xylostella* larvalarına karşı yapılan biyotestler sonucunda oldukça toksik olduğu görüldü. Vip3Aa14 proteininin N-terminalinden 33 aminoasitin kesilmesi ile insektisidal aktivitenin etkilenmediğini belirlediler. Böylece, Vip protein sekansının 1-33 aminoasite denk gelen kısmın bu böceklerle karşı toksiklik bakımından hiçbir rol oynamadığını açıkça ortaya koydular.

Hernández-Rodríguez ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışma ile 507 *B. thuringiensis* suşlarında gerçekleştirilen PCR taraması sonucunda *vip* genlerini içeren suşların genel olarak hem *cry1A* hem de *cry2* genlerini de taşıdığı belirtilmiştir. *vip1* geni içeren suşların %79,6'sı, *vip2* geni içeren suşların %84,8'i ve *vip3* geni içeren suşların

%91,5'i hem *cry1A* hem de *cry2* genleri içeriyordu. Bu tez çalışmasında kullanılan lokal izolatlardan *B. thuringiensis tenebrionis* Xd3 ve Mm2 izolatlarında *cry3* geni, *B. thuringiensis kurstaki* MnD ve BnBt izolatlarında ise *cry1* ve *cry2* geni içerdiği bilinmektedir (Sezen vd., 2010). Yapılan *vip* genlerinin PCR ile taranması sonucunda da *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarının *vip1* ve *vip2* genleri, *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarının ise *vip3* geni tespit edildi.



5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, lokal *Bacillus thuringiensis kurstaki* (BnBt, MnD) ve *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarında *vip* (*vip1*, *vip2* ve *vip3*) genlerinin PCR ile taranması, izolatlara ait *vip* genlerinin klonlanması, karakterizasyonu, BnBt ve MnD suşlarına ait Vip3 proteinlerinin kültür süpernatantından iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılarak *Spodoptera littoralis* larvalarına karşı insektisidal aktivitesi belirlenmiştir.

- ✓ Yapılan PCR taraması ve klonlama çalışmaları sonucunda *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarının *vip1* ve *vip2* genlerini, *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarının ise *vip3* genini içerdiği tespit edildi.
- ✓ *B. thuringiensis kurstaki* BnBt ve MnD izolatlarının vejetatif safhasının maksimum olduğu zaman diliminin 24. saat olduğu belirlendi.
- ✓ SDS-PAGE analizi ile *vip3* genlerinin ~90 kDa'lık bir protein kodladığı belirlendi.
- ✓ Yapılan biyotest sonucunda BnBt izolatından elde edilen Vip3 proteininin % 40, MnD izolatından elde edilen Vip3 proteininin ise % 31 oranında öldürücü etkiye sahip olduğu bulundu.
- ✓ *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) izolatlarına ait tam uzunluktaki *vip3A* geni dizayn edilen primerler yardımıyla çoğaltılarak klonlandı ve baz dizilimi belirlendi.
- ✓ *vip3A* geninin, 2.370 bp uzunluğunda 790 aminoasitli sahip olduğu tespit edildi.
- ✓ SDS-PAGE analizi ile proteinin büyüklüğünün yaklaşık ~116 kDa olduğu gözlemlendi.

6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinsektisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan entomopatojenik bakterilerden *B. thuringiensis*'dir. *B. thuringiensis*'den elde edilen Cry proteinlerine dayalı formülasyonların zararlılar üzerinde insektisidal etkilerinin yüksek olmasından dolayı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Cry proteinlerinin biyolojik mücadeledeki başarısına rağmen, artan böcek direnci ve dar insektisidal spektrumları *Bt* teknolojisinin uzun vadeli sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir (McGaughey, 1985; Schnepf ve Crickmore, 1998; Shingote vd., 2013). Bu problemin üstesinden gelebilmek için bilim adamları, çok çeşitli habitatlardan yeni *B. thuringiensis* izolatlarının araştırılarak karakterize edilmesi ve Cry proteinlerinden farklı özelliklere sahip yeni insektisidal proteinlerin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda *B. thuringiensis*'in vejetatif safhasında, bazı suşların vejetatif insektisidal proteinler (Vip) olarak adlandırılan, ortama salınan proteinler ürettiği ve bir takım böcek türlerine karşı insektisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Estruch vd.,1996; Schnepf vd., 1998; Donovan vd., 2001; Milne vd., 2008).

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda lokal *B. thuringiensis kurstaki* (MnD, BnBt) ve *B. thuringiensis tenebrionis* (Xd3, Mm2) izolatlarında tespit edilen *vip1*, *vip2* ve *vip3* genlerinin alt türleri tespit edilebilir.

B. thuringiensis kurstaki MnD ve BnBt suşlarından elde edilen kısmi saflaştırılmış Vip3 proteinlerine ait insektisidal aktivite çalışmaları farklı böcek türleri üzerinde de yapılabilir.

B. thuringiensis kurstaki MnD ve BnBt suşlarından elde edilecek saf Vip3A proteinlerinin böcek türleri üzerinde etkileri test edilebilir.

B. thuringiensis tenebrionis Xd3 ve Mm2 izolatlarında tespit edilen *vip1* ve *vip2* genlerinin tam uzunlukta elde edilebilmesi için PCR ve klonlama çalışmaları yapılabilir. Ardından bu genler ifade edilerek Coleoptera takımına ait farklı böcek türlerine karşı insektisidal aktivitelerine bakılabilir.

vip3 geninin, böcekler üzerindeki etkilerini artırmak amacıyla yine böcekler üzerinde etkili olan farklı genlerle (Diğer *cry* genleri, *cyt* genleri gibi) bir araya getirilerek füzyon protein oluşturulabilir.

Cry ve Vip proteinlerini içeren yüksek öldürücü etkiye sahip olan mikrobiyal mücadele etmenleri kullanılarak biyolojik bitki koruma ürünü oluşturma çalışmaları yapılabilir.



7. KAYNAKLAR

- Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S. ve Jaoua, S., 2005. Characterization of a novel *vip3*-type gene *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid, FEMS Microbiol. Lett., 244, 353–358.
- Abdelkefi-Mesrati, L., Rouis, S., Sellami, S. ve Jaoua, S., 2009. Prays oleae midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin, Mol. Biotechnol., 43, 15–19.
- Abdelkefi-Mesrati, L., Boukedi, H., Dammak-Karray, M., Sellami-Boudawara, T., Jaoua, S. ve Tounsi, S., 2011a. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*, J. Invertebr. Pathol., 106, 250-254.
- Abdelkefi-Mesrati, L., Boukedi, H., Chakroun, M., Kamoun, F., Azzouz, H., Tounsi, S., Rouis, S. ve Jaoua, S., 2011b. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin, J. Invertebr. Pathol., 107, 198-201.
- Aguilar, C., Borrull, F. ve Marce, R.M., 1997. Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection, Journal of Chromatography, 771, 221–231.
- Ayvaz, A., 2001. Un güvesi, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) ve yumurta parazitoidi *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae)'un bazı biyolojik özellikleri üzerine gamma radyasyonunun etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi, Ankara.
- Ali, M.I. ve Luttrell, R.G., 2011. Susceptibility of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton, J. Invertebr. Pathol., 108, 76-84.
- Arora, N., Selvapandiyar, A., Agrawal, N. ve Bhatnagar, R.K., 2003. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 310, 158-62.
- Anilkumar, K.J., Rodrigo-Simón, A., Ferré, J., Pusztai-Carey, M., Sivasupramaniam, S. ve Moar, W.J., 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie), Appl. Environ. Microbiol., 74, 462-9.
- An, J., Gao, Y., Wu, K., Gould, F., Gao, J., Shen, Z. ve Lei, C., 2010. Vip3Aa tolerance response of *Helicoverpa armigera* populations from a Cry1Ac cotton planting region, J. Econ. Entomol., 103, 2169-73.

- Adamczyk, Jr. J.J. ve Mahaffey, J.S., 2008. Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests, Fla. Entomol., 91, 570-575.
- Baranek, J., Kaznowski, A., Konecka, E. ve Naimov, S., 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests, J. Invertebr. Pathol., 130, 72-81.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R. ve Stiles, B. G., 2004. Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68, 373-402.
- Beard, C. E., Court, L., Boets, A., Mourant, R., Van Rie, J. ve Akhurst, R. J., 2008. Unusually high frequency of genes encoding vegetative insecticidal proteins in an Australian *Bacillus thuringiensis* collection, Curr. Microbiol., 57, 195-9.
- Beegle, C. C. ve Yamamoto, T., 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124, 587-616.
- Ben Hamadou-Carfi, D., Boukedi, H., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S. ve Jaoua, S., 2013. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin, J. Invertebr. Pathol., 114, 139-143.
- Bergamasco, V.B., Mendes, D.R., Fernandes, O.A., Desidério, J.A. ve Lemos, M.V., 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera), J. Invertebr. Pathol., 112, 152-8.
- Bi, Y., Zhang, Y., Shu, C., Crickmore, N., Wang, Q., Du, L., Song, F. ve Zhang, J., 2015. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to *Scarabaeoidea* larvae, Appl. Microbiol. Biotechnol., 99, 753-60.
- Bhalla, R., Dalal, M., Panguluri, S.K., Jagadish, B., Mandaokar, A.D., Singh, A.K. ve Kumar, P.A., 2005. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*, FEMS Microbiol. Lett., 243, 467-472.
- Blaustein, R.O., Koehler, T.M., Collier, R.J. ve Finkelstein, A., 1989. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 2209-2213.
- Boets, A., Arnaut, G., Van Rie, J. ve Damme, N., 2011. Toxins, U.S. Patent, 7,919,609 B2, Eylül 2011.
- Boukedi, H., Ben Khedher, S., Triki, N., Kamoun, F., Saadaoui, I., Chakroun, M., Tounsi, S. ve Abdelkefi-Mesrati, L., 2015. Overproduction of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin and study of its insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*, J. Invertebr. Pathol., 127, 127-129.

- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Burkness, E.C., Dively, G., Patton, T., Morey, A.C. ve Hutchison, W.D., 2010. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management, G.M. Crops., 1, 337-343.
- Caccia, S., Chakroun, M., Vinokurov, K. ve Ferré, J., 2014. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins by two *Spodoptera* species, J. Insect. Physiol., 67, 76-84.
- Cai, Q., Liu, Z. ve Yu, Z., 2003. Research review of bioactive components of *Bacillus thuringiensis*., Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 19, 207-212.
- Carrière, Y., Crickmore, N. ve Tabashnik, B.E., 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management, Nat. Biotech., 33, 161-8.
- Chakroun, M., Bel, Y., Caccia, S., Abdelkefi-Mesrati, L., Escriche, B. ve Ferré, J., 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein, J. Invertebr. Pathol., 110, 334-9.
- Chakroun, M. ve Ferré, J., 2014. *In vivo* and *in vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by ¹²⁵I radiolabeling, Appl. Environ. Microbiol., 80, 6258-65.
- Chakroun, M. 2015. Biochemical and molecular study of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal proteins (Vip3A) mode of action in *Spodoptera* species, Doktora tezi, Universitat de Valencia, İspanya.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B. ve Ferré, J., 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 80, 329–350.
- Chen, J., Yu, J., Tang, L., Tang, M., Shi, Y. ve Pang, Y., 2003. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*, J. Appl. Microbiol., 95, 310-6.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., ve Dean, D.H., *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Available online: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. 25 Mayıs 2017.
- de Maagd, R. A., Bosch, S. ve Stiekema, W., 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants, Science, 4, 09-13.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Vandamme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. ve Vanrie, J., 1997. Cloning and Characterization of *Manduca sexta* and *Plutella*

xylostella Midgut Aminopeptidase N Enzymes Related to *Bacillus thuringiensis* Toxin-Binding Proteins, Eur. J. Biochem., 248, 748-761.

- Dong, F., Zhang, S., Shi, R., Yi, S., Xu, F. ve Liu, Z., 2012a. Ser-substituted mutations of Cys residues in *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa7 exert a negative effect on its insecticidal activity, Curr. Microbiol., 65, 583–588.
- Dong, F., Shi, R., Zhang, S., Zhan, T., Wu, G., Shen, J. ve Liu, Z., 2012b. Fusing the vegetative insecticidal protein Vip3Aa7 and the N terminus of Cry9Ca improves toxicity against *Plutella xylostella* larvae, Appl. Microbiol. Biotechnol., 96, 921-9.
- Donovan, W.P., Donovan, J.C. ve Engleman, J.T., 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*, J. Invertebr. Pathol., 78, 45-51.
- Donovan, W.P., Engleman, J.T., Donovan, J.C., Baum, J.A., Bunkers, G.J., Chi, D.J., Clinton, W.P., English, L., Heck, G.R., Ilagan, O.M., vd., 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae, Appl. Microbiol. Biotechnol., 72, 713–719.
- Doss, V.A., Kumar, K.A., Jayakumar, R. ve Sekar, V., 2002. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*, Protein Expr. Purif., 26, 82-8.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun, 5-8.
- EL-Ghareeb, D. K., Osman, G. H., ve El baz, A. F., 2012. Isolation, cloning, and overexpression of *vip3Aa* gene isolated from a local *Bacillus thuringiensis*, Biocont. Sci. Technol., 22, 11-21.
- Ely, S.P.F., et al., Eds., John Wiley ve Sons, 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins, In, *Bacillus thuringiensis*, An Experimental Biopesticide, Theory and Practice, Entwistle, 105-124.
- Eryüzlü, E., 2010. *Malacosoma neustria* orjinli *Bacillus thuringiensis*'e ait *cry2Ab* geninin karakterizasyonu, ekspresyonu ve insektisidal aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D. ve Sanchis, V., 2003. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*, Curr. Microbiol., 47, 501-7.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93, 5389–5394.
- Estruch, J.J. ve Yu, C.G., 2001. Plant pest control, U.S. Patent No. 6,291,156B1.

- Fang, J., Xu, X., Wang, P., Zhao, J.Z., Shelton, A., Cheng, J., Feng, M. ve Shen, Z. 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins, Appl. Environ. Microbiol., 73, 956–961.
- Feitelson, J.S., Schnepf, H.E., Narva, K.E., Stockhoff, B.A., Schmeits, J., Loewer, D., Dullum, C.J., Muller-cohn, J., Stamp, L., Morrill, G. ve Finstad-lee, S., 2003. Pesticidal toxins and nucleotide sequences which encode these toxins, U.S. Patent No. 6,656,908,B2.
- Ferre, J., vd., 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, FEMS Microbiol. Lett., 132, 1-7.
- Figueiredo, C.S., Marucci, S.C., Tezza, R.I.D., Lemos, M.V.F. ve Desidério, J.A., 2013. Characterization of the *vip3A* gene and toxicity of Vip3Aa50 protein to fall armyworm and velvetbean caterpillar, Pesqui. Agropecu. Bras. Brasília, 48, 1220–1227.
- Franco-Rivera, A., Benintende, G., Cozzi, J., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J. ve López-Meza, J.E., 2004. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina, Antonie Van Leeuwenhoek, 86, 87-92.
- Frutos, R., Rang, C. ve Royer, M., 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins, Crit. Rev. Biotechnol., 19, 227-276.
- Gayen, S., Hossain, M.A. ve Sen, S.K., 2012. Identification of the bioactive core component of the insecticidal Vip3A toxin peptide of *Bacillus thuringiensis*, J. Plant. Biochem. Biotechnol., 21, S128-S135.
- Gayen, S., Samanta, M.K., Hossain, M.A., Mandal, C.C. ve Sen, S.K., 2015. A deletion mutant *ndv200* of the *Bacillus thuringiensis vip3BR* insecticidal toxin gene is a prospective candidate for the next generation of genetically modified crop plants resistant to lepidopteran insect damage, Planta, 242, 269-81.
- Gouffon, C., Van Rie, J., Jansens, S. ve Juart Fuentes, J.L., 2011. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin, Appl. Environ. Microbiol., 77, 3182–3188.
- Gould, F., Martinez-Rarnirez, A., Anderson, A., Ferre, J., Silva, F. J. ve Moar, J., 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89,7986-7990.
- Gulzar, A., Pickett, B., Sayyed, A.H. ve Wright, D.J., 2012. Effect of temperature on the fitness of a Vip3A resistant population of *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae), J. Econ. Entomol., 105, 964-70.
- Gulzar, A. ve Wright, D.J., 2015. Sub-lethal effects of Vip3A toxin on survival, development and fecundity of *Heliothis virescens* and *Plutella xylostella*, Ecotoxicology, 24, 1815–1822.

- Han, S., Craig, J.A., Putnam, C.D., Carozzi, N.B. ve Tainer, J.A., 1999. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex, Nat. Struct. Biol., 6, 932-936.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Boets, A., Van Rie, J. ve Ferré, J., 2009. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains, J. Appl. Microbiol., 107, 219-225.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B. ve Ferré, J., 2012. Specific binding of radiolabeled Cry1Fa insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* to midgut sites in lepidopteran species, Appl. Environ. Microbiol., 78, 4048-50.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Ruiz de Escudero, I., Asensio, A.C., Ferré, J. ve Caballero, P., 2013. Encapsulation of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxins Vip3Aa and Cry1Ia in *Pseudomonas fluorescens*, Biol. Control., 66, 159-165.
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Van Rie, J., Escriche, B. ve Ferré, J., 2013. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests, J. Invertebr. Pathol., 113, 78-81.
- Huang, F., Qureshi, J.A., Meagher, R.L. Jr., Reisig, D.D., Head, G.P., Andow, D.A., Ni, X., Kerns, D., Buntin, G.D., Niu, Y., Yang, F. ve Dangal, V., 2014. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided Bt maize, PLoS One, 9, e112958.
- Iatsenko, I., Nikolov, A. ve Sommer, R.J., 2014. Identification of distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 nematocidal factors using the model nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*, Toxins, 6, 2050–2063.
- Jackson, R.E., Marcus, M.A., Gould, F., Bradley, J.R. Jr. ve Van Duyn, J.W., 2007. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A, J. Econ. Entomol., 100, 180-186.
- Jamoussi, K., Sellami, S., Abdelkefi-Mesrati, L., Givaudan, A. ve Jaoua, S., 2009. Heterologous expression of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein-encoding gene *vip3LB* in *Photobacterium temperata* strain K122 and oral toxicity against the Lepidoptera *Ephesia kuehniella* and *Spodoptera littoralis*, Mol. Biotechnol., 43, 97-103.
- Jucovic, M., Walters, F.S., Warren, G.W., Palekar, N.V., Chen, J.S., 2008. From enzyme to zymogen: Engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity, Protein Eng. Des. Sel., 21, 631–638.
- Katı, H., Sezen, K., Beldüz, A.O. ve Demirbağ, Z., 2005. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain isolated from *Malacosoma neustria* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae), Biologia, Bratislava, 60, 3, 301-305.

- Katı, H., Sezen, K., Nalçacıoğlu, R. ve Demirbağ, Z., 2007a. A Highly Pathogenic Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* in Lepidopteran Pests, The Journal of Microbiology, 45, 6, 553-557.
- Katı, H., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2007b. Characterization of a Highly Pathogenic *Bacillus thuringiensis* Strain Isolated from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha*, Folia Microbiol., 52, 2, 146-152.
- Kegley, S.E. ve Wise, L.J., 1998. Pesticides in fruit and vegetables, Sausalito, CA, University Science Books.
- Knapp, O., Benz, R., Gibert, M., Marvaud, J.C. ve Popoff, M.R., 2002. Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxin with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia, J. Biol. Chem., 277, 6143-52.
- Knowles, B.H., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins, Adv. Insect. Physiol., 24, 275-308.
- Kurtz, R.W., McCaffery, A., O'Reilly, D., 2007. Insect resistance management for Syngenta's VipCot transgenic cotton, J. Invertebr. Pathol., 95, 227-30.
- Kurtz, R.W., 2010. A review of Vip3A mode of action and effects on Bt Cry protein-resistant colonies of lepidopteran larvae, Southwest Entomol., 35, 391-394.
- Lee, M.K., Curtiss, A., Alcantara, E. ve Dean, D.H., 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*, Appl. Environ. Microbiol., 62, 583-6.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. ve Chen, J.S., 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin, Appl. Environ. Microbiol., 69, 4648-4657.
- Lee, M.K., Miles, P. ve Chen, J.S., 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts, Biochem. Biophys. Res. Commun., 339, 1043-1047.
- Lemes, A.R., Davolos, C.C., Legori, P.C., Fernandes, O.A., Ferré, J., Lemos, M.V. ve Desiderio, J.A., 2014. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*, PLoS One, 9, e107196.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A. ve Benz, R., 2006. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for oligomer and channel formation, Biochemistry, 45, 283-8.
- Li, C., Xua, N., Huanga, X., Wanga, W., Chenga, J., Wuc, K. ve Shen, Z., 2007. *Bacillus thuringiensis* Vip3 mutant proteins: Insecticidal activity and trypsin sensitivity, Biocontrol Sci. Technol., 17,699-708.

- Liao, C., Heckel, D.G. ve Akhurst, R., 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton, J. Invertebr. Pathol., 80, 55–63.
- Liu, Y.B. ve Tabashnik, B.E., 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*, Proc. R. Soc. Lond B, 264, 605–10.
- Liu, J., Song, F., Zhang, J., Liu, R., He, K., Tan, J. ve Huang, D., 2007. Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene, Lett. Appl. Microbiol., 45, 432–438.
- Liu, J., Yang, A., Shen, X., Hua, B. ve Shi, G., 2011. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation, J. Invertebr. Pathol., 108, 92–97.
- Llewellyn, D.J., Mares, C.L. ve Fitt, G.P., 2007. Field performance and seasonal changes in the efficacy against *Helicoverpa armigera* (Hübner) of transgenic cotton expressing the insecticidal protein *vip3A*, Agric. For. Entomol., 9, 93–101.
- Mahon, R.J., Downes, S.J. ve James, B., 2012. Vip3A resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin, PLoS One, 7, e39192.
- McGaughey, W.H., 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*, Science, 229, 193–5.
- McGaughey, W. H., 1985. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indian meal moths in farm grain bins and elevator silos, J. Econ. Entomol., 81, 28–33.
- Mesrati, L.A., Tounsi, S., Kamoun, F. ve Jaoua, S., 2005a. Identification of a promoter for the vegetative insecticidal protein-encoding gene *vip3LB* from *Bacillus thuringiensis*, FEMS Microbiol. Lett., 247, 101–4.
- Mesrati, L.A., Tounsi, S. ve Jaoua, S., 2005b. Characterization of a novel *vip3*-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid, FEMS Microbiol. Lett., 244, 353–8.
- Miller, G.T., 1998. Living in the environment (10th ed.). Belmont, CA, Wadsworth.
- Milne, R., Liu, Y., Gauthier, D. ve van Frankenhuyzen, K., 2008. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera), J. Invertebr. Pathol., 99, 166–172.
- Murawska, E., Fiedoruk, K., Bideshi, D.K. ve Swiecicka, I., 2013. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain IS5056, an isolate highly toxic to *Trichoplusia ni*, Genome Announc., 1:e00108–13.
- Newsom, L.D., 1996. Consequences of insecticide use on nontarget organisms, Department of Entomology, Louisiana State University, Baton rouge, Louisiana.

- Palma, L., Hernández-Rodríguez, C.S., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., Ruiz de Escudero, I., Escriche, B., Muñoz, D., Van Rie, J., Ferré, J. ve Caballero, P., 2012. Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 78,7163-5.
- Palma, L., Ruiz de Escudero, I., Maeztu, M., Caballero, P. ve Muñoz, D., 2013. Screening of *vip* genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests, Biol. Control, 66, 141-149.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. ve Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity, Toxins (Basel), 6,3296-325.
- Pickett, B., 2009. Studies on resistance to vegetative (Vip3A) and crystal (Cry1A) insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens* (Fabricius), Ph D. thesis. Imperial College London, London, United Kingdom.
- Rang, C., Gil, Neisner, N., Van Rie, J. ve Frutos, R., 2005. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 71, 6276-81.
- Ruiu, L. 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species, Insects, 4, 476-492.
- Ruiz de Escudero, I., Banyuls, N., Bel, Y., Maeztu, M., Escriche, B., Muñoz, D., Caballero, P. ve Ferré, J. 2014. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests, J. Invertebr. Pathol., 117, 51-55.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Baskı: 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T. ve Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications, Plant Biotechnol. J., 9, 283-300.
- Sanchis, V., 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: History of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review, Agron Sustain Dev., 31, 217-231.
- Saraswathy, N., Nain, V., Sushmita, K. ve Kumar, P.A., 2008. A fusion gene encoding two different insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Indian J. Biotechnol., 7, 204-209.
- Sattar, S., Biswas, P. K., Hossain, M. A., Maiti, M. K., Sen, S. K., ve Basu, A., 2008. Search for Vegetative Insecticidal Proteins (VIPs) from local isolates of *Bt* effective against lepidopteran and homopteran insect pests, Journal of Biopesticides, 1, 2, 216-222.
- Sattar, S. ve Maiti, M.K., 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest, J. Microbiol. Biotechnol., 21, 937-946.

- Sauka, D. H., Basurto-Rios, R. E., Ibarra, J. E. ve Benintende, G. B., 2010. Characterization of an argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain, Neotropical Entomology, 39, 5, 767-773.
- Schmid, A., Benz, R., Just, I. ve Aktories, K., 1994. Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes; Formation of cation-selective channels and inhibition of channel function by chloroquine, J. Biol. Chem., 269,16706–16711.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. ve Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 775-806.
- Schnepf, H.E., Narva, K.E., Stockhoff, B.A., Lee, S.F., Waltz, M. ve Sturgis, B., 2003. Pesticidal toxins and genes from *Bacillus laterosporus* strains, US patent 6,605,701 B2.
- Schnepf, H.E., Narva, K.E., Stockhoff, B.A., Lee, S.F., Walz, M. ve Sturgis, B., 2005. Pesticidal toxins and genes from *Bacillus laterosporus* strains, US Patent No. 6,956,116.
- Sellami, S., Jamoussi, K., Dabbeche, E. ve Jaoua, S., 2011. Increase of the *Bacillus thuringiensis* secreted toxicity against lepidopteron larvae by homologous expression of the *vip3LB* gene during sporulation stage, Curr. Microbiol., 63, 289-94.
- Sellami, S., Cherif, M., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S. ve Jamoussi, K., 2015. Toxicity, activation process, and histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 on *Tuta absoluta*, Appl. Biochem. Biotechnol., 175, 1992-9.
- Selvapandiyar, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S.K., Venkatesan, T., Singh, S.P. ve Bhatnagar, R.K., 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*, Appl. Environ. Microbiol., 67, 5855-8.
- Sena, J.A.D., Hernández-Rodríguez, C.S. ve Ferré, J., 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites, Appl. Environ. Microbiol., 75, 2236–2237.
- Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 1999. Isolation and Insecticidal Activity of Some Bacteria from the Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 85-89.
- Sezen, K., Demir, İ. ve Demirbağ, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Col., Scarabaeidae), New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 35, 79-85.
- Sezen, K., Katı, H., Nalçacıoğlu, R., Muratoğlu, H. ve Demirbağ, Z., 2008. Identification and pathogenicity of bacteria from european shot-hole borer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae), Annals of Microbiology, 58, 2, 173-179.

- Sezen, K., Katı, H., Muratoğlu, H. ve Demirbağ, Z., 2010. Characterisation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from hazelnut pests and fields, Pest Manag. Sci., 66,543-548.
- Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J. ve Pang, Y., 2004. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides, J. Appl. Microbiol., 97, 757–765.
- Shi, Y., Ma, W., Yuan, M., Sun, F. ve Pang, Y., 2007. Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*, World J. Microbiol. Biotechnol., 23, 501–507.
- Shingote, P.R., Moharil, M.P., Dhumale, D.R., Deshmukh, A.G., Jadhav, P.V., Dudhare, M.S. ve Satpute, N.S., 2013a. Distribution of *vip* genes, protein profiling and determination of entomopathogenic potential of local isolates of *Bacillus thuringiensis*, Bt Res., 4, 14-20.
- Shingote, P.R., Moharil, M.P., Dhumale, D.R., Jadhav, P.V., Satpute, N.S. ve Dudhare, M.S. 2013b. Screening of *vip1/vip2* binary toxin gene and its isolation and cloning from local *Bacillus thuringiensis* isolates, ScienceAsia, 39, 620–624.
- Singh, G., Sachdev, B., Sharma, N., Seth, R. ve Bhatnagar, R.K., 2010. Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*, Appl. Environ. Microbiol., 76, 7202–7209.
- Song, R., Peng, D., Yu, Z. ve Sun, M., 2008. Carboxy-terminal half of Cry1C can help vegetative insecticidal protein to form inclusion bodies in the mother cell of *Bacillus thuringiensis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 80, 647-54.
- Tabashnik, B.E., 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*, Annu. Rev. Entomol., 39, 47–79.
- Taborsky, V., 1992. Small-scale processing of microbial pesticides, FAO Agr. Serv. Bull., 96, 1-90.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN), 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Thamthiankul Chankhamhaengdecha, S., Tantichodok, A. ve Panbangred, W., 2008. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*, J. Biotechnol. 136, 122-8.
- Van Frankenhuyzen, K., et al., Eds., John Wiley ve Sons, 1993. Chichester,UK, The challenge of *Bacillus thuringiensis*, In: *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide, Theory and Practice, 1-35.

- Van Frankenhuyzen, K. ve Nystrom, C. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database, <http://www.glfccfs.nrcan.gc.ca/bacillus>. 05 Mart 2017.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. ve Van Mellaert, H., 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: Importance of Specific Receptors on the Brush Border Membrane of the Mid-Gut of Target Insects, Eur. J. Biochem., 186, 239-247.
- Van Rie, J., vd., 1990. Mechanism of insectresistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, Science, 247, 72–74.
- Vélez, A.M., Spencer, T.A., Alves, A.P., Moellenbeck, D., Meagher, R.L., Chirakkal, H. ve Siegfried, B.D., 2013. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), Bull. Entomol. Res., 103, 700-13.
- Visser, B., Bosch, D. ve Honée, G., 1993. Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Chichester, New York, Toronto, Wiley and Sons, 71-88.
- Walker, K., vd., The Role of Microbial BtProducts in U.S. Crop Protection, New Seeds, 51, 1, 31-51, 2003.
- Walsh, T.K., Downes, S.J., Gascoyne, J., James, W., Parker, T., Armstrong, J. ve Mahon, R.J., 2014. Dual Cry2Ab and Vip3A resistant strains of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae); testing linkage between loci and monitoring of allele frequencies, J. Econ. Entomol., 107, 1610-7.
- Warren, G.W., 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, In Carozzi NB, Koziel M (ed), *Advances in insect control, the role of transgenic plants*, Taylors & Francis Ltd., London, 109-121.
- Warren, G.W., Koziel, M.G., Mullins, M.A., Nye, G.J., Carr, B., Desai, N.M., Kostichka, K., Duck, N.B. ve Estruch, J.J., 1998. Auxiliary Proteins for Enhancing the Insecticidal Activity of Pesticidal Proteins, U.S. Patent 5, 770, 696.
- Welch, K.L., Unnithan, G.C., Degain, B.A., Wei, J., Zhang, J., Li, X., Tabashnik, B.E. ve Carrière, Y., 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*, J. Invertebr. Pathol., 132, 149–156.
- Wu, J., Zhao, F., Bai, J., Deng, G., Qin, S. ve Bao, Q., 2007. Evidence for positive darwinian selection of *vip* gene in *Bacillus thuringiensis*, J. Genet. Genomics, 34, 649-60.
- Wu, J., Luo, X., Zhang, X., Shi, Y. ve Tian, Y., 2011. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A* accumulating in chloroplasts, Transgenic Res., 20, 963-973.

- Wu, Z.L., Guo, W.Y., Qiu, J.Z., Huang, T.P., Li, X.B. ve Guan, X., 2004. Cloning and localization of *vip3A* gene of *Bacillus thuringiensis*, Biotechnol. Lett., 26, 1425-8.
- Yılmaz, S., 2010. Çeşitli habitatlardan izole edilen *Bacillus thuringiensis* suşlarının moleküler karakterizasyonu ve bazı zararlı böceklerle karşı mücadelede kullanımı, Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. ve Estruch, J.J., 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa lyses midgut epithelium cells of susceptible insects, Appl. Environ. Microbiol., 63, 532-536.
- Yu, X., Zheng, A., Zhu, J., Wang, S., Wang, L., Deng, Q., Li, S., Liu, H. ve Li, P., 2011a. Characterization of vegetative insecticidal protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China, Curr. Microbiol., 62, 752-757.
- Yu, X., Liu, T., Liang, X., Tang, C., Zhu, J., Wang, S., Li, S., Deng, Q., Wang, L., Zheng, A. ve Li, P., 2011b. Rapid detection of *vip1*-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel *vip* binary toxin gene, FEMS Microbiol. Lett., 325, 30-6.
- Yu, X., Liu, T., Sun, Z., Guan, P., Zhu, J., Wang, S., Li, S., Deng, Q., Wang, L., Zheng, A. ve Li, P., 2012. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, Curr. Microbiol. 64, 326-31.
- Yücel, Ü., 2007. Pestisitlerin insan ve çevreüzerine etkileri, Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ders notları.
- Zhu, C., Ruan, L., Peng, D., Yu, Z., Sun, M., 2005. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*, Lett. Appl. Microbiol., 42, 109-14.
- URL-1, www.agrotimeyayincilik.com.tr/2016/09/14/bioglobal-2050-hedeflerine-emin-adimlarla-kosuyor/. 12 Aralık 2016.
- URL-2, www.biologicalcontrol.info/bt-and-gmos.html. 27 Mart 2017.
- URL-3, www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/328833561. 16 Nisan 2017.
- URL-4, www.epa.gov/opppd1/biopesticides/pips/pip_list.htm. 03 Ocak 2017.
- URL-5, iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:30#p. 02 Nisan 2017.
- URL-6, [www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gene/default.asp?GeneID=24&Gene=vip3A\(a\)](http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gene/default.asp?GeneID=24&Gene=vip3A(a)). 12 Mayıs 2017.
- URL-7, en.biosafetyscanner.org/schedaevento.php?evento=208. 12 Mayıs 2017.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ankara'da doğdu. İlköğrenimini İsmail Erez İlköğretim Okulunda, ortaöğrenimini ise Alparslan Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğrenimini 2012 yılında tamamladı. 2013-2014 eğitim-öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.

