

139216

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOĞAL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *BACİLLUS THURİNGİENSİS*'LERİN  
KARAKTERİZASYONU VE İNSEKTİSİDAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hatice KATI**

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

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

138216

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Osman BELDÜZ**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Saadettin GÜNER**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Yusuf AYVAZ**

Trabzon 2003

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

## ÖNSÖZ

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

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

Hatice KATI  
Trabzon, 2003

## İÇİNDEKİLER

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

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

|    |                |    |
|----|----------------|----|
| 7. | KAYNAKLAR..... | 56 |
|    | EKLER.....     | 69 |



## ÖZET

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

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

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

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

## SUMMARY

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

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

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

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

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

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. <i>B. thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskopik görünümü .....   | 3               |
| Şekil 2. <i>B. thuringiensis</i> suşlarına ait Cry proteinlerinin yapısı.....   | 8               |
| Şekil 3. <i>B. thuringiensis</i> 'in hedef böceklerdeki mekanizması .....   | 13              |
| Şekil 4. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının kristal morfolojilerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....                      | 30              |
| Şekil 5. BnBt izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                             | 32              |
| Şekil 6. MnÖ izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                              | 33              |
| Şekil 7. Mm2 izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                              | 33              |
| Şekil 8. 6 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                         | 34              |
| Şekil 9. 11 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                        | 34              |
| Şekil 10. 27 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                       | 35              |
| Şekil 11. 29 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                       | 35              |
| Şekil 12. 40 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                       | 36              |
| Şekil 13. 46 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri.....                       | 36              |
| Şekil 14. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının ISR-PCR analizleri.....   | 41              |
| Şekil 15. Topraktan izole edilen <i>B. thuringiensis</i> 'lerin cry gen PCR ürünleri .....                                    | 42              |
| Şekil 16. Böcekten izole edilen <i>B. thuringiensis</i> 'lerin cry gen PCR ürünleri.....                                      | 43              |
| Şekil 17. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının plazmit içerikleri .....  | 44              |
| Şekil 18. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının spor-kristal karışımlarının protein profilleri.....                           | 45              |
| Şekil 19. Böceklerden izole edilen <i>B. thuringiensis</i> izolatlarına ait çözünmüş kristallerin tripsin ile proteolizi..... | 46              |
| Şekil 20. Topraktan izole edilen <i>B. thuringiensis</i> izolatlarına ait çözünmüş kristallerin tripsin ile proteolizi.....   | 47              |




## TABLolar DİZİNİ

|   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Tablo 1. Mevcut <i>B. thuringiensis</i> 'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması .....   | 6               |
| Tablo 2. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları .....   | 9               |
| Tablo 3. Lepidopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler ...   | 14              |
| Tablo 4. Dipteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler.....  | 16              |
| Tablo 5. Coleopteraların kontrolü için ticari olarak kullanılan <i>B. thuringiensis</i> 'ler .....  | 16              |
| Tablo 6. Genel primerler ile tespit edilen <i>cry</i> genleri ve ürün büyüklükleri .....  | 26              |
| Tablo 7. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının oluşturduğu kristallerinin büyüklükleri.....   | 32              |
| Tablo 8. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının ( $10^9$ spor-kristal/ml) <i>Malacosoma neustria</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri .....       | 37              |
| Tablo 9. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının ( $10^9$ spor-kristal/ml) <i>Lymantria dispar</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri .....          | 38              |
| Tablo 10. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının ( $10^9$ spor-kristal/ml) <i>Hyphantria cunea</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri .....         | 38              |
| Tablo 11. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının ( $10^9$ spor-kristal/ml) <i>Leptinotarsa decemlineata</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkiler ..... | 39              |
| Tablo 12. <i>B. thuringiensis</i> izolatlarından elde edilen spor-kristal karışımlarının ( $10^9$ spor-kristal/ml) <i>Agelastica alni</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkileri .....          | 40              |
| Tablo 13. <i>Bacillus thuringiensis</i> izolatlarının antibiyotik test sonuçları.....   | 48              |
| Tablo 14. Çalışmada kullanılan <i>B. thuringiensis</i> izolatları ile kontrol <i>B. thuringiensis</i> izolatlarının karşılaştırılması .....   | 53              |
| Ek Tablo 1. <i>B. thuringiensis</i> suşlarının kristal proteinleri .....  | 69              |

## **SEMBOLLER DİZİNİ**

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



# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

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

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

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

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

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

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

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

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

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

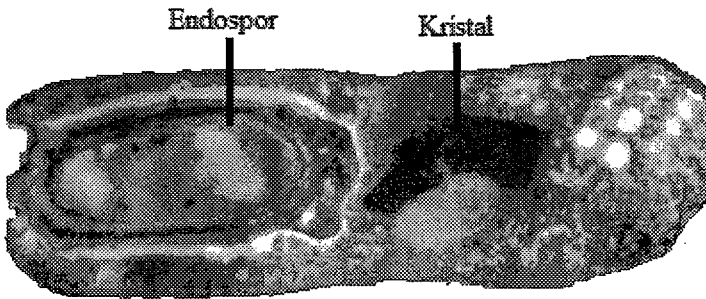
*B. thuringiensis* bir toprak bakterisidir. Buna rağmen hastalıklı ve sağlıklı böceklerden, bitkilerin yaprak yüzeylerinden ve depolanmış ürünlerden de izole edilmiştir (Carozzi vd., 1991; Burges ve Hurst, 1977; Kaelin vd., 1994).

## 1.2. *Bacillus thuringiensis*'lerin Genel Özellikleri

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

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

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



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

### 1.2.1. *Bacillus thuringiensis*'lerin Tarihi

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

### 1.3. *Bacillus thuringiensis*'lerin Plazmitleri

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

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

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

#### 1.4. *Bacillus thuringiensis*'lerin Ürettiği Bileşikler

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

#### 1.5. *Bacillus thuringiensis*'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

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

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

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



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

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



### 1.6. *Bacillus thuringiensis*'lerin Habitatları

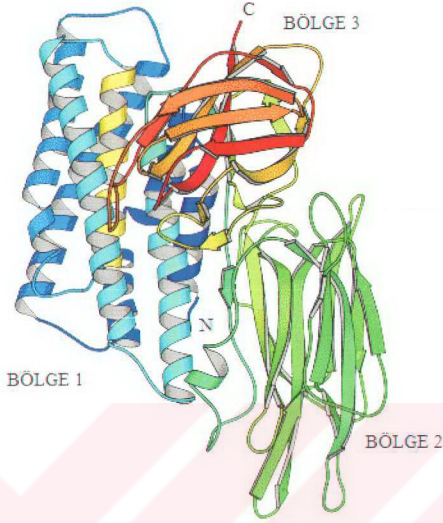
*B. thuringiensis* suşları genellikle topraktan (Carozzi vd., 1991; DeLucca vd., 1979; Hastowo vd., 1992; Martin ve Travers, 1989; Smith ve Couche, 1991), böceklerden (Carozzi vd., 1991), depolanmış ürünlerden (Burges ve Hurst, 1977; Chaufaux vd., 1997; DeLucca vd., 1984; Meadows vd., 1992) ve kozalaklı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

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

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

### 1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Yapısı

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



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

$\delta$ -endotoksinler, aktivitelerine bakılarak beş önemli sınıfa ayrılırlar.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1.7.1. İnektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması

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

### 1.7.2. İnektisidal Kristal Proteinin Genetiği

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

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

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

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

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

### 1.8. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Mekanizması

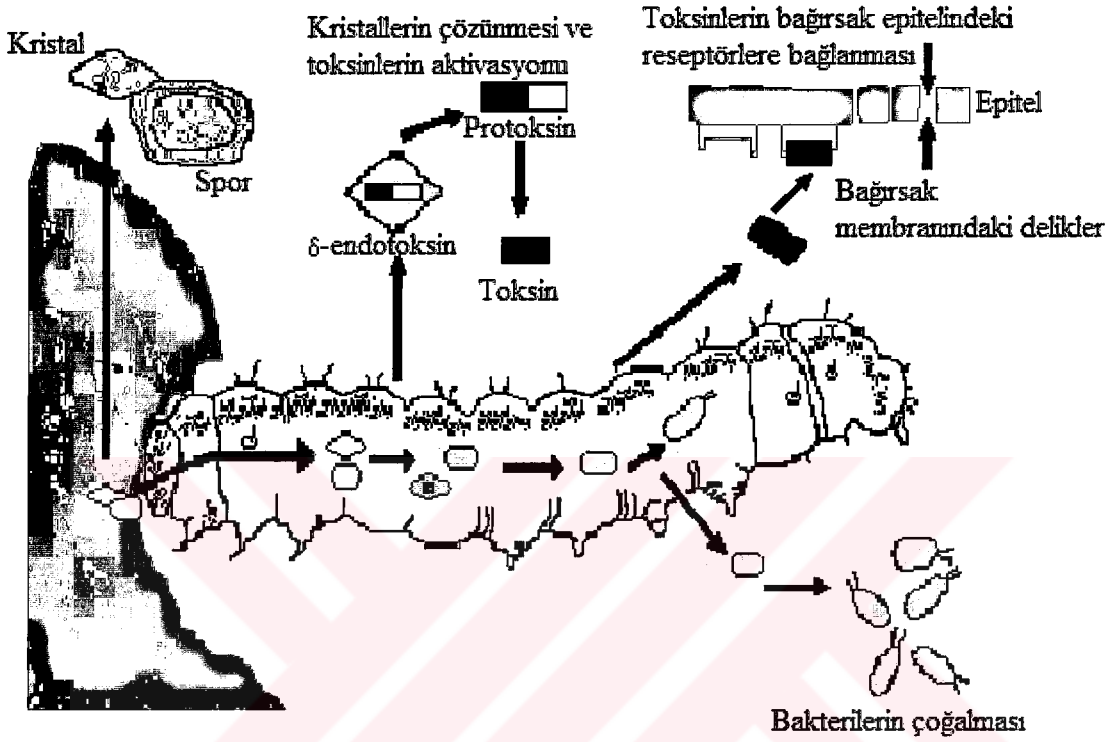
*B. thuringiensis*'in biyolojik aktivitesi Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarındaki hassas böceklere karşı *cry* genlerinin oluşturduğu aktif ICP'ler sayesinde. ICP'nin etkili olabilmesi için sindirilmesi gerekmektedir (Visser vd., 1993). Diğer böcek gruplarına (Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera,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

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

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



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



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

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

### 1.8.1. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis*'e Dirençliliği

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

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

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

### 1.9. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Biyoteknolojisi

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

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

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



Tablo 3'ün devamı.

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **1.10. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Karakterizasyonunda Kullanılan Bazı Yöntemler**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **1.10.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri**

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

### **1.11. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığı**

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

### 1.12. Tezin Amacı

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





## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bakteriler ve Büyüme Şartları

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

*B. thuringiensis* izolatları nutrient agar (Merck) ve Luria Bertani besiyerlerinde (1 litre dH<sub>2</sub>O için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü, LB) 30 °C'lik inkübatörlerde büyütüldü.

### 2.2. İzolatların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 2.2.1. Spor ve Kristal Süspansiyonlarının Hazırlanması

*B. thuringiensis* izolatları "nutrient agar" besiyerlerinde beş gün büyütüldü. Besiyerlerinden toplanan spor-kristal karışımları soğuk 1 M'lık NaCl'de süspanse edildi. Daha sonra bu karışım 13000×g' de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pelte steril ddH<sub>2</sub>O ile iki kez yıkandı. Pelte steril ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü. Kullanılincaya kadar -20 °C' de muhafaza edildi.



### 2.2.2. Kristallerin Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

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

### 2.2.3. Kristallerin Tarama Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

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

### 2.2.4. Kristallerin İnsektisidal Etkilerinin Belirlenmesi

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

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

## 2.3. İzolatların Bazı Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

### 2.3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarından DNA İzolasyonu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.3.4. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarından Plazmit İzolasyonu**

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

## **2.4. İzolatların Bazı Kemotaksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **2.4.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

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

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

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

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

#### **2.4.1.1. Kristal Proteinlerin Çözünmesi ve Tripsin ile Muamele Edilmesi**

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

#### **2.5. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

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

### 3. BULGULAR

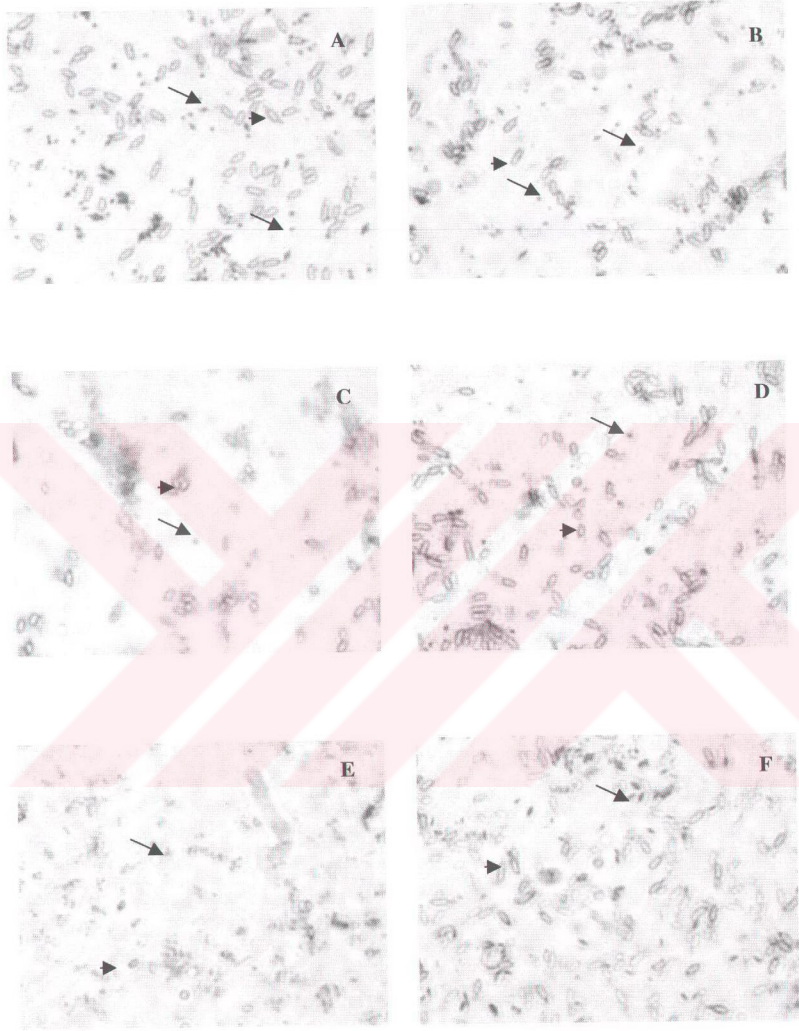
Bu çalışmada, kullanılan *B. thuringiensis* izolatları Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Bu izolatların üç tanesi böceklerden [BnBt (*Balaninus nucum*, ergin), Mm2 (*Melolonta melolanta*, ergin) ve MnÖ (*Malacosoma neustria*, larva)] altı tanesi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

#### 3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Fenotipik Özellikleri

##### 3.1.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kristal Morfolojileri

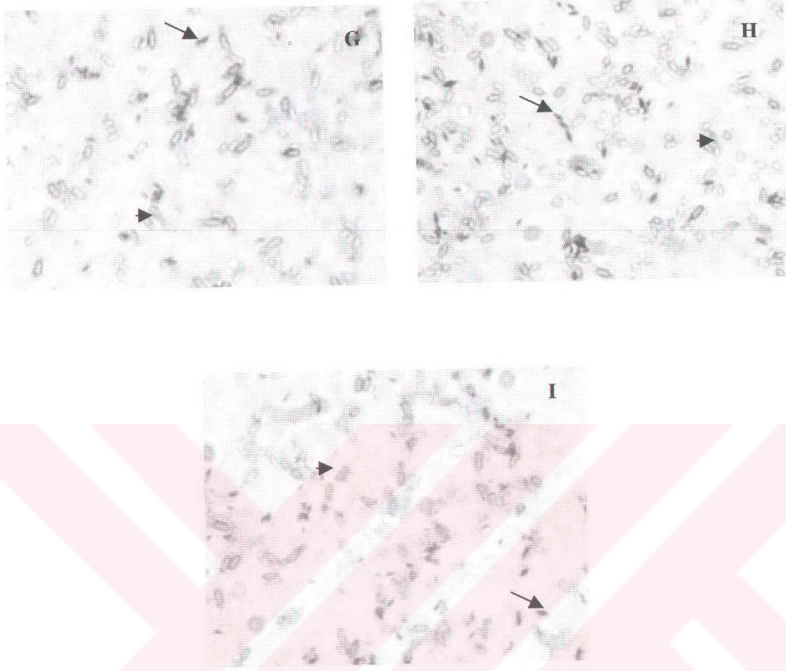
Bu çalışmada kullanılan sekiz *B. thuringiensis* izolatu nutrient agar üzerinde dalgalı ve krem renkli koloni oluştururken bir izolatın (11 numaralı izolat) yuvarlak ve sarımsı renk koloni oluşturduğu görüldü. Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanan *B. thuringiensis* izolatlarının oluşturduğu kristaller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





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





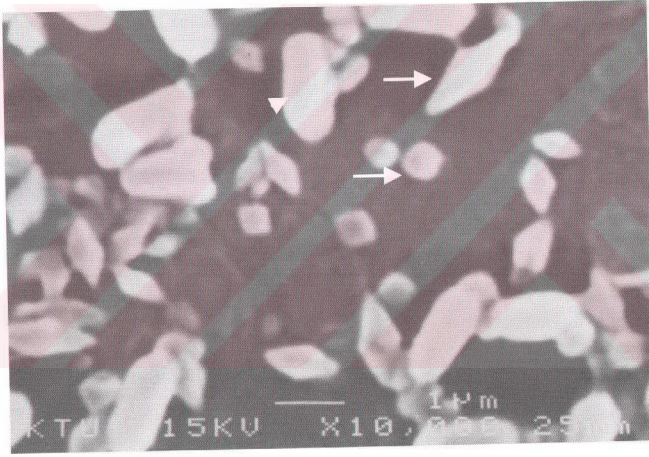
Şekil 4'ün devamı.

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

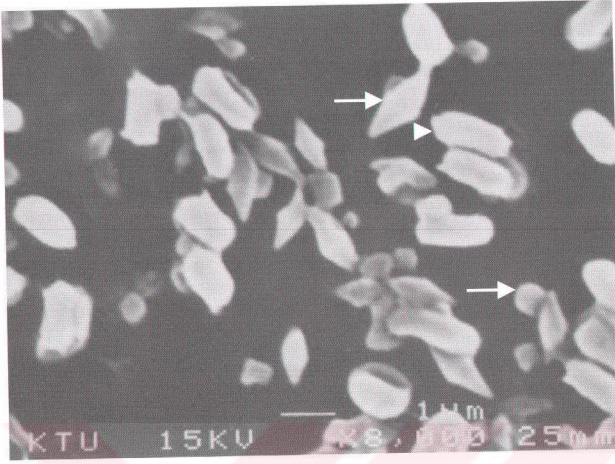
Tablo 7. *B. thuringiensis* izolatlarının oluşturduğu kristallerin büyüklükleri

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

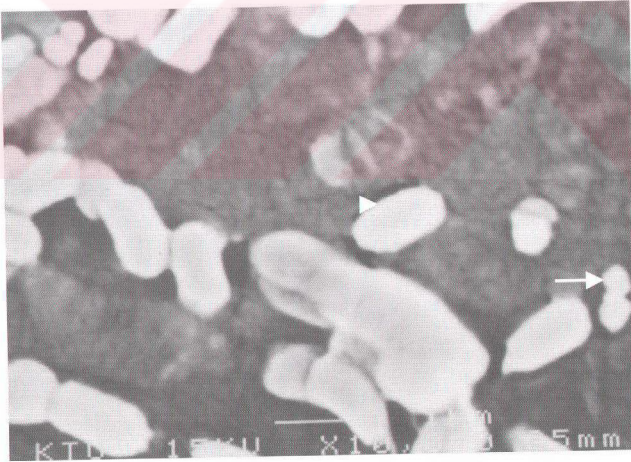
∴: Kristal tespit edilemedi. <sup>a</sup> Küresel <sup>b</sup> Şekilsiz



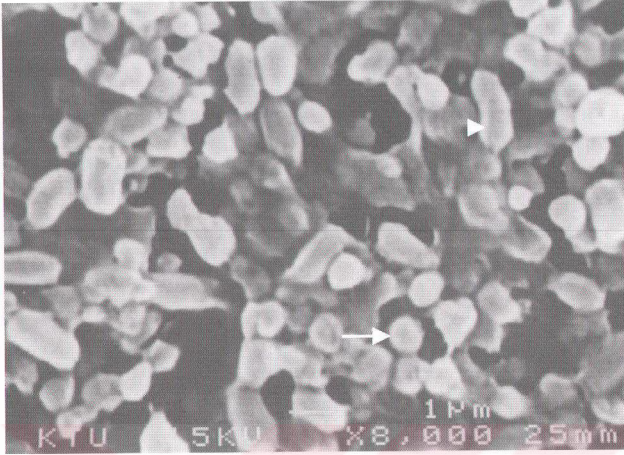
Şekil 5. BnBt izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



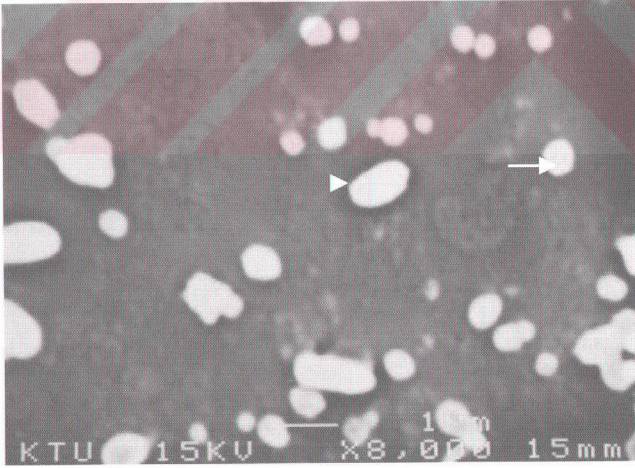
Şekil 6. MnÖ izolatının kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



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

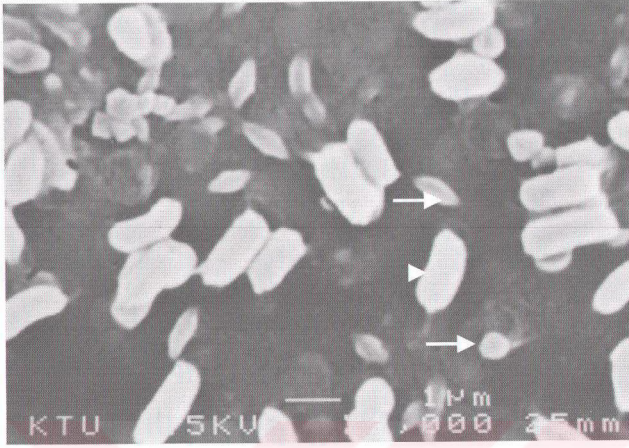


Şekil 8. 6 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir

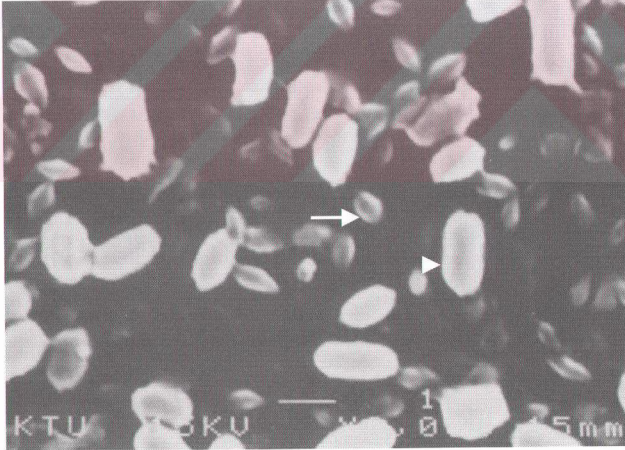


Şekil 9. 11 numaralı izolatın kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir

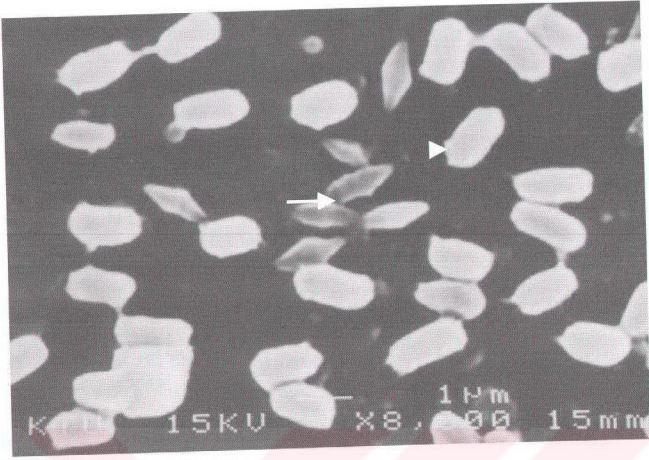




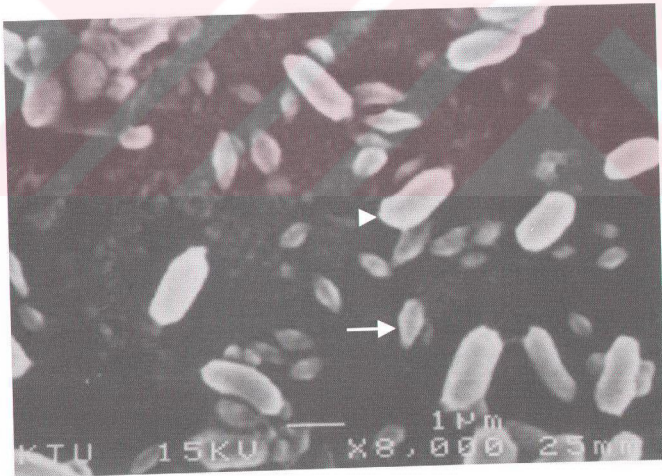
Şekil 10. 27 numaralı izolatin kristal ve spor şekillerinin tarama elektron mikroskobu görüntüleri. Uzun oklar kristalleri, kısa oklar sporları göstermektedir



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



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



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

### 3.1.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının İnsektisidal Özellikleri

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

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

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

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

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

-: insektisidal bir etki tespit edilemedi, <sup>a</sup>*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

<sup>b</sup>Steril ddH<sub>2</sub>O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

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



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

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

-: insektisidal bir etki tespit edilemedi, <sup>a</sup>*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

<sup>b</sup>Steril ddH<sub>2</sub>O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

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

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

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

-: insektisidal bir etki tespit edilemedi, <sup>a</sup>*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1,

<sup>b</sup>Steril ddH<sub>2</sub>O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

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

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

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

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

-. insektisidal bir etki tespit edilemedi, <sup>a</sup>*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*,

<sup>b</sup>Steril ddH<sub>2</sub>O Not: Diğer izolatlar insektisidal etki göstermediklerinden tabloya dahil edilmemişlerdir.

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

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

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

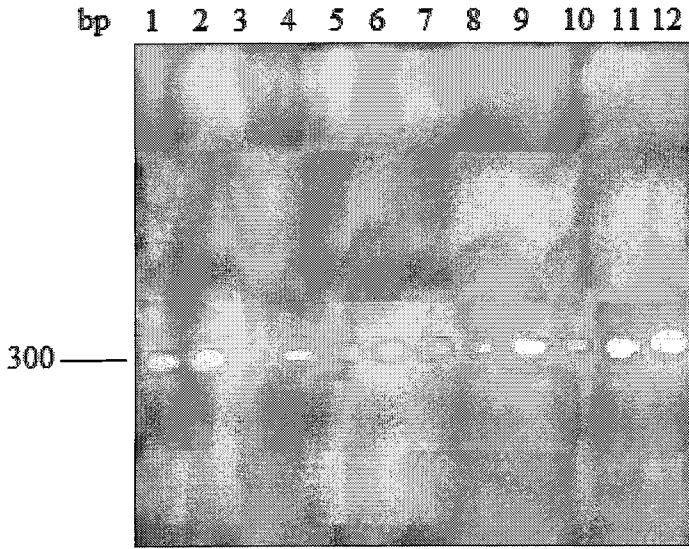
<sup>a</sup>*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, <sup>b</sup>Steril ddH<sub>2</sub>O

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

### 3.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Moleküler Özellikleri

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

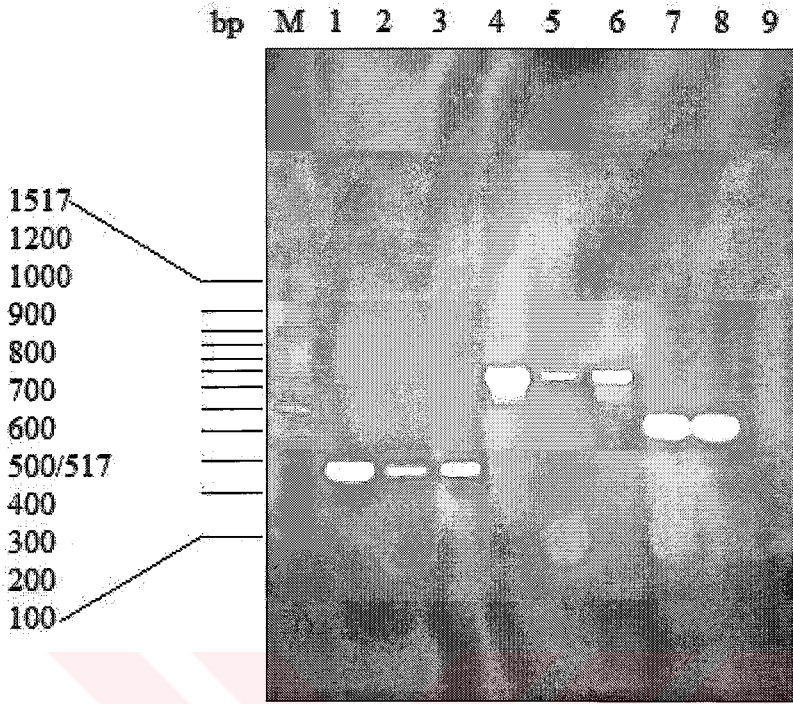
Toprak ve böceklerden izole edilen dokuz izolatın 16S-23S rRNA genleri arasındaki “intergenik” bölge PCR reaksiyonları ile artırıldı ve oluşan PCR profili incelendi. Yapılan inceleme sonunda Şekil 14 ‘te de görüldüğü gibi bütün izolatlar kontrol *B. thuringiensis*’in suşları ile aynı bantları oluşturmaktadır.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



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

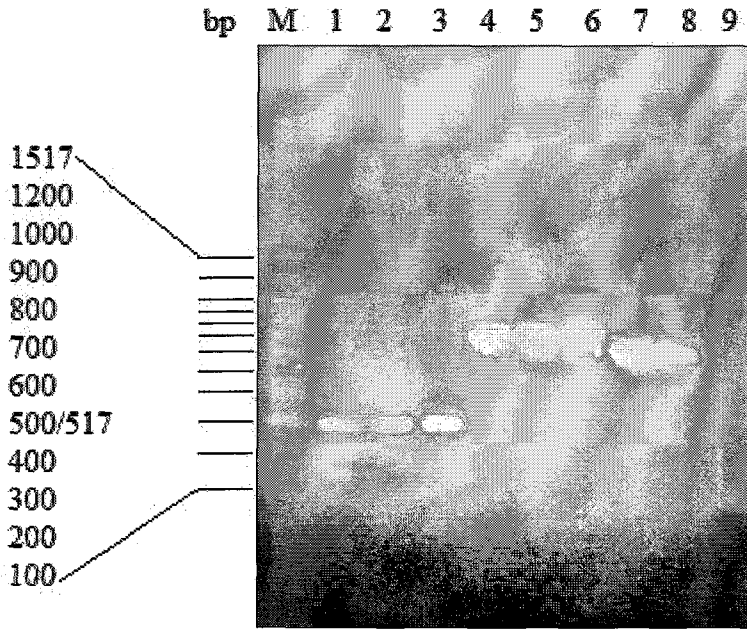
### 3.2.2. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının *cry* Gen İçerikleri

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



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



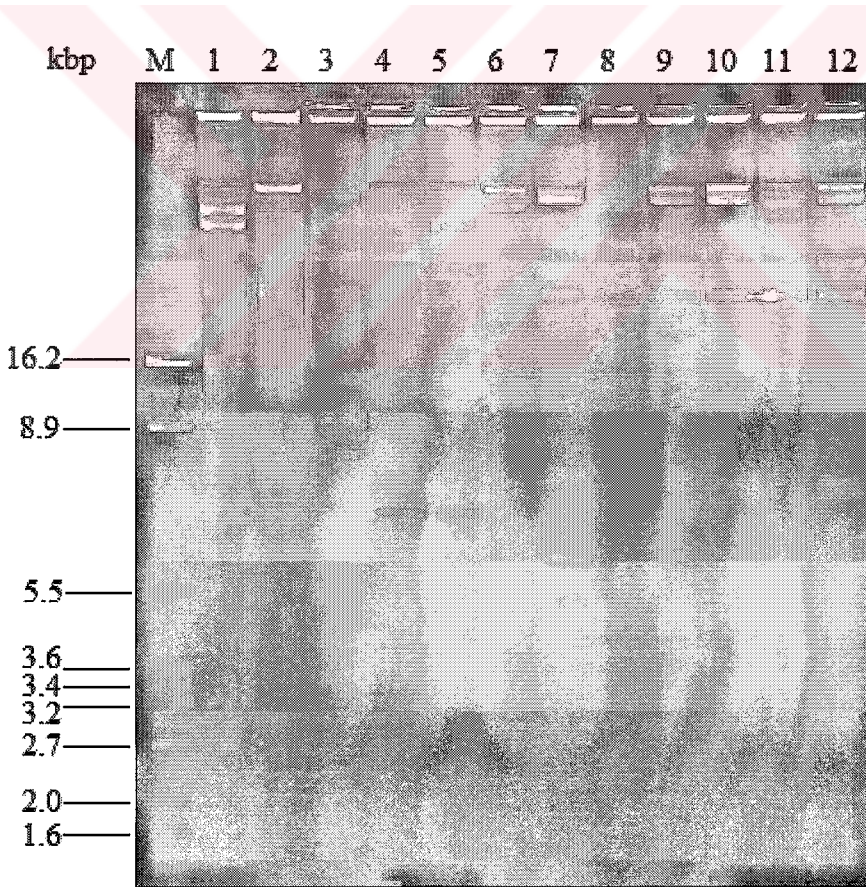


Şekil 16. Böcekten izole edilen *B. thuringiensis*'lerin *cry1* (1, 2, 3), *cry2* (4, 5, 6) ve *cry3* (7, 8) gen primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri. M) Markır (100 bp'lik DNA Markır), 1) *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 2) BnBt izolatu, 3) MnÖ izolatu, 4) *B.thuringiensis* subsp.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

### 3.2.3. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Plazmit İçerikleri

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

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



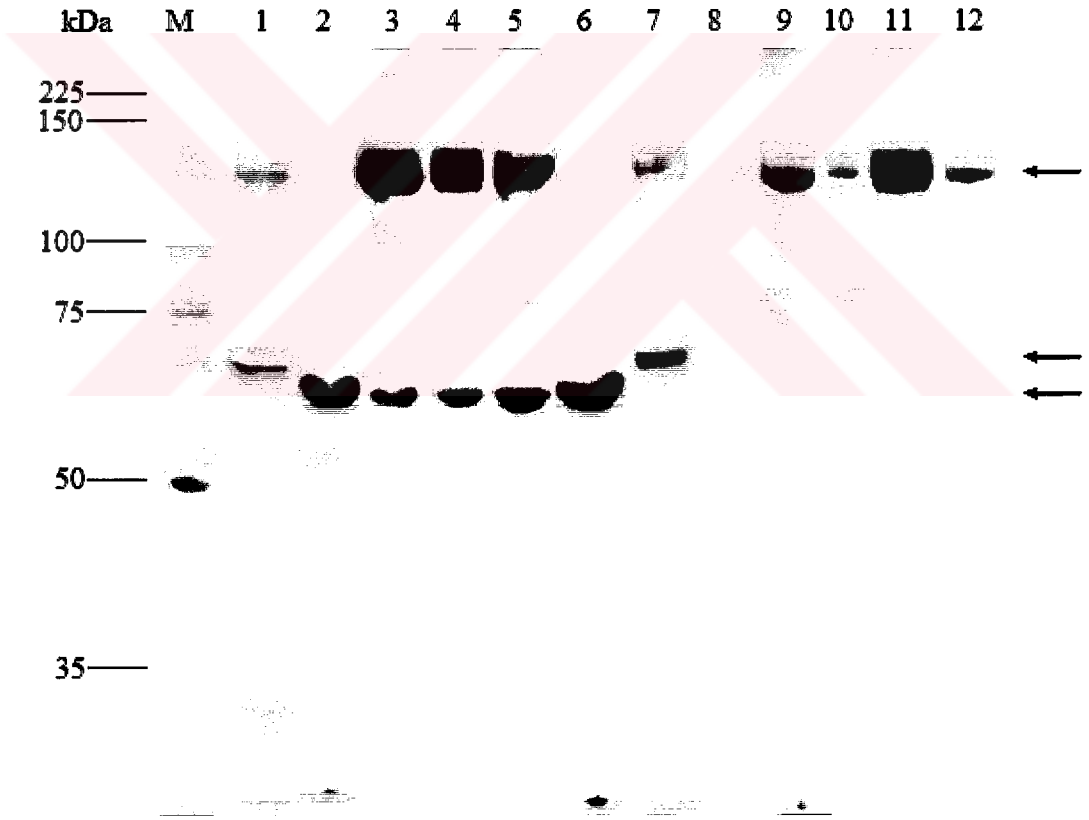
Şekil 17. *B. thuringiensis* izolatlarının plazmit içerikleri. M) Markır ( $\lambda$  DNA'sı *EcoRI*, *HindIII* ve *BamHI* ile kesilmiştir) 1) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, 2) *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 3) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 4) BnBt izolatu, 5) MnÖ izolatu,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



### 3.3. *Bacillus thuringiensis* izolatlarının Bazı Kemotaksonomik Özellikleri

#### 3.3.1. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Kristal Protein Profilleri

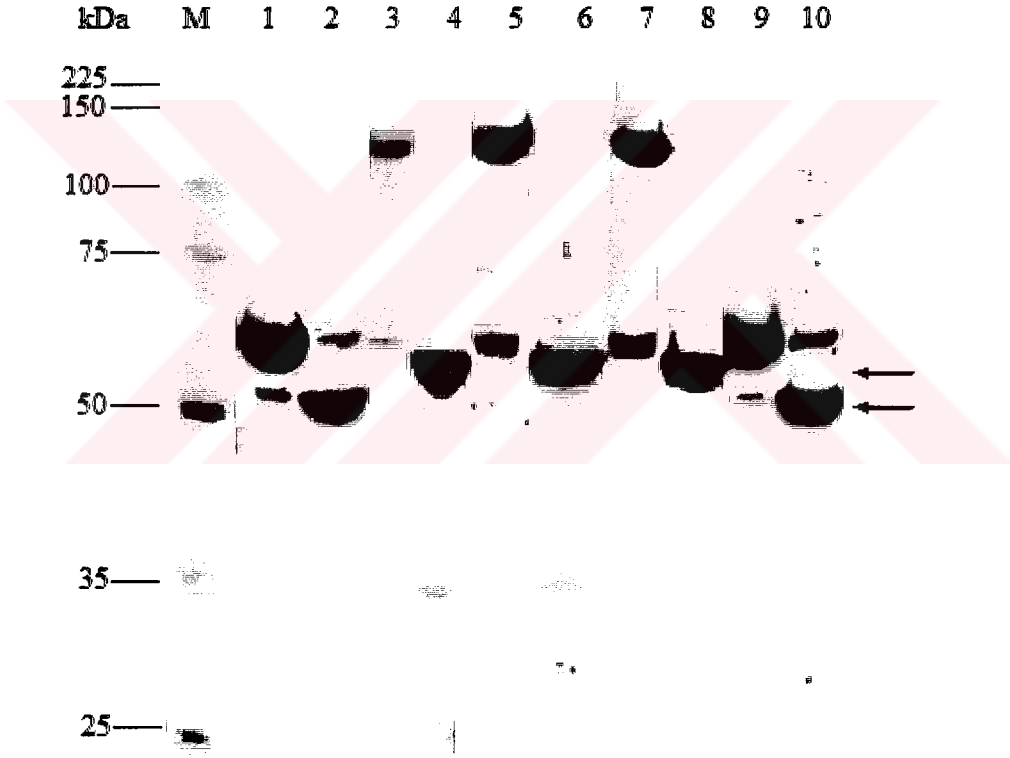
*B. thuringiensis* izolatlarının kristal proteinlerini tespit etmek için hazırlanan kristal-spor karışımları %10'luk SDS-PAGE'de analiz edildi (Şekil 18). BnBt ve MnÖ izolatlarında yaklaşık 65 ile 130 kDa'lık iki protein bandı, Mm2 izolatında yaklaşık 65 kDa'lık protein bandı, 6 numaralı izolatta yaklaşık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



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

### 3.3.1.1. Kristal Proteinlerinin Tripsin ile Muamele Edilmesi

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



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



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

### 3.4. *Bacillus thuringiensis* İzolatlarının Antibiyotik Testleri

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

Tablo 13. *B. thuringiensis* izolatlarının antibiyotik test sonuçları

| Antibiyotik              | BnBt | MnÖ | Mm2 | 6   | 11  | 27 | 29  | 40  | 46  |
|--------------------------|------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| Tetrasiklin<br>(30 µg)   | r    | ara | r   | r   | s   | s  | s   | ara | s   |
| Gentamisin<br>(10 µg)    | r    | s   | s   | s   | s   | s  | s   | s   | s   |
| Kanamisin<br>(30 µg)     | r    | s   | r   | s   | s   | s  | ara | ara | s   |
| Penisilin (10 µg)        | r    | r   | r   | ara | ara | r  | r   | r   | r   |
| Streptomisin<br>(10 µg)  | r    | s   | s   | s   | s   | s  | s   | ara | ara |
| Sülfametaksol<br>(25 µg) | r    | r   | r   | r   | s   | r  | r   | r   | r   |
| Kloromfenikol<br>(30 µg) | s    | ara | s   | s   | s   | s  | s   | ara | s   |

s. hassas, r. dirençli.

#### 4. İRDELEME

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, 6 tanesi toprak örneklerinden 3 tanesi böcekten izole edilen

9 *B. thuringiensis* izolatının karakterizasyonu yapıldı. Buna göre;

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

## 6. ÖNERİLER

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

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

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

## 7. KAYNAKLAR

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

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

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



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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



## EKLER

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

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

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



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

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

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

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

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

## ÖZGEÇMİŞ

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

