

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**β -EKZOTOKSİN GENİ (*thuE*) TAŞIYAN YEREL
BACILLUS THURINGIENSIS SUŞLARININ
BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Mehmet Erdem ÖZER**

**Danışman
Doç. Dr. Semih YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Mart 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**β -EKZOTOKSİN GENİ (*thuE*) TAŞIYAN YEREL
BACILLUS THURINGIENSIS SUŞLARININ
BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Mehmet Erdem ÖZER**

**Danışman
Doç. Dr. Semih YILMAZ**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FLY-2017- 7417 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Mart 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özlünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Mehmet Erdem ÖZER



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“ β -Ekzotoksin Geni (*thuE*) Taşıyan Yerel *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Hazırlayan

Mehmet Erdem ÖZER



Danışman

Doç. Dr. Semih YILMAZ



Tarımsal Biyoteknoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Doç. Dr. Semih YILMAZ danışmanlığında **Mehmet Erdem ÖZER** tarafından hazırlanan “ **β -Ekzotoksin geni (*thuE*) taşıyan yerel *Bacillus thuringiensis* suşlarının belirlenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

26 / 03 / 2018

JÜRİ:

Danışman : Doç.Dr. Semih YILMAZ

.....

Üye : Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

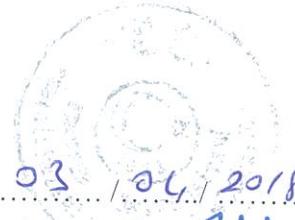
.....

Üye : Doç. Dr. Salih KARABÖRKLÜ

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 03/04/2018 tarih ve 2018/15-03..sayılı kararı ile onaylanmıştır.



03 / 04 / 2018

.....

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Öncelikle bu uzun ve yorucu tez sürecinin sonuna gelmemin mutluluğu içerisindeyim. Tez çalışmam boyunca her türlü yardımı ve fedakarlığı sağlayan Babam Fikret ÖZER'e, bana pozitif duygular veren ablam Miray ÖZER TOĞUŞLU'ya ve eşi Gökhan TOĞUŞLU'ya,

Proje süresince yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Semih YILMAZ'a ve Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mehmet ARSLAN'a,

Bana bu mesleği sevdiren ve başarılarını örnek almaya çalıştığım, Muş Alparslan Üniversitesi Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Yaşar KARADAĞ'a,

Laboratuvar ve gerekli materyalleri sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine Teşekkür ederim

.

Mehmet Erdem ÖZER

Mart 2018, KAYSERİ

β-EKZOTOKSİN GENİ (*thuE*) TAŞIYAN YEREL *BACILLUS THURINGIENSIS* SUŞLARININ BELİRLLENMESİ

Mehmet Erdem ÖZER

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Mart 2018
Danışman: Doç. Dr. Semih YILMAZ**

ÖZET

Bacillus thuringiensis (*Bt*) Cry, Vip ve β-ekzotoksin (*thuringiensin*) gibi çeşitli metabolitler üreten gram pozitif ve spor oluşturan bir toprak bakterisidir. Bundan dolayı *Bt* zararlılarla biyolojik mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. β-ekzotoksin, bazı *Bt* suşları tarafından üretilen, termostabil bir metabolittir. Omurgalı canlılar üzerinde toksit etkisi nedeniyle, *Bt*'in ticari preparatlarının çoğu, β-ekzotoksin üretmeyen suşlardan hazırlanmaktadır. Bu çalışma *cry* geni taşıdığı ve bazı zararlı böcekler üzerinde toksisite gösterdiği bilinen 75 adet *Bt* suşunun β-ekzotoksin geni (*thuE*) taşıyıp taşımadığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *cry1I* geni taşıyanların *thuE* taşıyanlar ile arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Yaptığımız bu çalışmada 75 adet *Bt*'den %53.33'ünün *thuE*₁, %2.67'sinin *thuE*₂, %2.67'sinin *thu4*, %5.33'ünün de *cry1I* geni taşıdığı belirlenmiştir. Öte yandan bunlardan sadece Sy29 suşunda *thuE*₁ bulunmazken bu suşun *thuE*₂ genini taşıdığı görülmüştür. Aynı zamanda HD125 ve Sy27.1 suşlarının hem *cry1I* hemde *thuE* genini taşıdığı belirlenmiştir. Suşların yarıdan fazlasında β-ekzotoksin geni tespit edilmiş olup hedef dışı organizmaların zarar görmemesi için biyoassay çalışmalarında bu geni taşıyanların kullanılmaması, kullanılacaklarda β-ekzotoksin ürünlerinden arındırıldıktan sonra kullanılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, β-ekzotoksin, *thuE*, *thu4*, *cry1I*

**DETERMINATION OF NATIVE *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS
CARRYING β -EXOTOXIN GENE (*thuE*)**

Mehmet Erdem ÖZER

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, March, 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Semih YILMAZ

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a gram-positive and spor forming soil bacterium that produces various metabolites as Cry, Vip and β -exotoxin (thuringiensin). Therefore, *Bt* is widely used in biological control of pest insects. β -exotoxin is a thermostable metabolite produced by some *Bt* strains. Due to toxic effect on vertebrate organisms, most commercial preparations of *Bt* are prepared from strains that do not produce β -exotoxin. In present study, previously characterised 75 *Bt* strains carrying *cry* genes and exhibiting toxicity on some pest insects were used. These 75 *Bt* strains were screened based on β -exotoxin gene (*thuE*). In particular, it was investigated whether there was a correlation between *cry1I* and *thuE* in strains. We observed that percentage of *thuE*₁, *thuE*₂, *thu4* and *cry1I* in *Bt* strains were 53.3, 2.67, 2.67 and 5.33, respectively. Although the *thuE*₁ was not seen in Sy29 strain, it had *thuE*₂ gene. Also it was observed that HD125 and Sy27.1 strains carry both the *cry1I* and *thuE* genes. In more than half of the strains, β -exotoxin gene was observed and concluded that products of those strains should not be used in bioassay studies, or for preventing the non-target organisms toxic substances as β -exotoxins should be removed from effective crystal protein preparations before use.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, β -exotoxin, *thuE*, *thu4*, *cry1I*

İÇİNDEKİLER

β -EKZOTOKSİN GENİ (*thuE*) TAŞIYAN YEREL *BACILLUS THURINGIENSIS* SUŞLARININ BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
ONAY	iv
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> ’in tarihçesi.....	3
1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> ’in biyolojik özellikleri.....	4
1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> ’in yaşam döngüsü ve spor oluşumu	6
1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> ’in sistematığı ve insektisit proteinleri	7
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> ’in biyolojik olarak aktif metabolitleri.....	10
1.5.1. Alfa-Ekzotoksinler	11
1.5.2. Delta-Endotoksinler (δ -Endotoksinler).....	11
1.6. Böcek öldürücü proteinlerin toksitesi ve etki mekanizması.....	12

1.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in sekonder metabolitleri	15
1.8. β -Ekzotoksin (<i>thuringiensin</i>).....	17
1.9. <i>Thu</i> 'nun insektisidal spekturumu.....	19
1.10. <i>Thu</i> üretimi ve plazmitler arasındaki ilişki	20
1.11. <i>Thuringiensin</i> sentez genleri	20
1.12. <i>Thuringiensin</i> biyosentez aşaması	22
1.13. <i>Thuringiensin</i> tipleri	23
1.14. <i>Thuringiensin</i> üretimi.....	25
1.15. <i>Thu</i> 'nun salınımı ve savunma sistemi	26
1.16. <i>Thuringiensin</i> 'in toksisitesi	26
1.17. <i>Thuringiensin</i> 'in hedef olmayan organizmalara karşı toksisitesi	26
1.17.1. <i>Thuringiensin</i> 'in memelilere ve diğer canlılara karşı toksisitesi	27
1.18. <i>Thuringiensin</i> (β -ekzotoksin) etki mekanizması	29
1.19. <i>Thuringiensin</i> içeren böcek öldürücü ilaçların yasaklanması	30
1.20. <i>Thuringiensin</i> lerin tesbiti için uygulanan prosedürler	31

2. BÖLÜM

YÖNTEM ve MATERYAL

2.1. Materyaller	33
2.1.1. Çalışmada kullanılan <i>Bacillus thuringiensis</i> suşları	33
2.1.2. Çalışmada kullanılan primer çiftleri.....	34
2.1.3. Çalışmada kullanılan besi ortamları	35
2.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler.....	35
2.1.5. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler	35
2.2. Yöntem	35
2.2.1. İzolatların yetiştirilmesi ve muhafazası	35
2.2.2. DNA izolasyonu	36

2.2.3. PCR yöntemi ile β -Ekzotoksin geni taşıyan suşların belirlenmesi	36
2.2.4. Agaroz jel elektroforezi	37
2.2.5. <i>thu4</i> primerinin oluşturulması	37

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1 <i>thuE</i> ₁ primerleri ile yapılan PCR çalışmaları.....	41
3.2 <i>thuE</i> ₂ primerleri ile yapılan PCR çalışmaları.....	43
3.3 <i>thu4</i> primerleri ile yapılan PCR çalışmaları.....	44
3.4. <i>cry1I</i> primerleri ile yapılan PCR çalışmaları	45

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma	47
4.2. Sonuç ve Öneriler	50
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ.....	72

KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrad derece
ABC	ATP-Binding Cassette
ACP	Açıl Taşıyıcı Protein
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
bç	Baz çifti
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bta	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>
Btt	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>
Cry	Kristal protein
CTP	Sitidin trifosfat
Cyt	Sitolitik protein
dNTP	Deoksiniükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
F	Forward (ileri)
GPI	Glikozil fosfatidil inozitol
gr	Gram
GTP	Guanozin trifosfat
ICP	İnsektisidal Kristal Protein
IPM	Entegre Zararlı Mücadele
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani broth
LC₅₀	%50 oranında ölüme neden olan konsantrasyon
LD₅₀	%50 oranında ölüme neden olan doz
LD₉₉	%99 oranında ölüme neden olan doz
M	Molar
ml	Mili litre
mM	Mili molar

n, p	Nano, Piko
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda kısım
R	Reverse (geri)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SAM	S-Adenozil Metiyonin
Sy	Semih Yılmaz
T4SS	type IV-like secretion system (4 Tipi Salgı Sistemi)
thu	Thuringiensin
Tm	Erime sıcaklığı
UDP	Üridin difosfat
v/v	Hacim/hacim
var.	Alttür
w/v	Ağırlık/hacim
xg	Devir sayısı (yerçekimi kuvveti birimi)
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μl	Mikro litre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	<i>B. thuringiensis</i> suşlarının H-antijenine göre sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'in biyolojik olarak aktif metabolitleri.....	10
Tablo 3.	<i>Thu</i> dizisindeki genlerin, tahmini fonksiyonları ve işlevleri.....	21
Tablo 4.	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovarlarının ürettiği thuringiensin tipleri (tip I ve II)	25
Tablo 5.	Thuringiensin'in tarım zararlılarına karşı toksik etkisinin sınıflandırılması.....	26
Tablo 6.	Aktifleştirilen <i>Bt</i> suşları.	33
Tablo 7.	Çalışmada kullanılan <i>thu</i> dizisi primerleri ve özellikleri	34
Tablo 8.	<i>cry1I</i> primeri ve özellikleri.....	34
Tablo 9.	Her bir örnek için kullanılan PCR karışımı.....	36
Tablo 10.	β -ekzotoksin ve <i>cry1I</i> geni bulunduran <i>Bt</i> suşları.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisi	5
Şekil 2.	Sy56.3 suşunun spor ve kristal proteinlerin taramalı elektron mikroskop görüntüsü	5
Şekil 3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> kristal oluşum evreleri	6
Şekil 4.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> suşunun spor hücresinin transmisyon elektron mikrofafisi.....	7
Şekil 5.	<i>Bt</i> δ -endotoksinlerin (Cry ve Cyt) bilinen konakçı spektrumunu gösteren özet bir görünüm	12
Şekil 6.	Cry ve Vip tersiyer yapısı.....	14
Şekil 7.	<i>Bacillus thuringiensis</i> 'in bazı sekonder metabolitleri	16
Şekil 8.	Thuringiensin (β -ekzotoksin) yapısı.....	18
Şekil 9.	Tüm <i>thu</i> dizisi.....	21
Şekil 10.	Thuringiensin biyosentez aşamaları şeması	22
Şekil 11.	<i>thu4</i> primerlerinin oluşturulması	38
Şekil 12.	<i>thuE₁</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü	42
Şekil 13.	<i>thuE₁</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 14.	<i>thuE₁</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.	43
Şekil 15.	<i>thuE₂</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.	44
Şekil 16.	<i>thu4</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.	45
Şekil 17.	<i>cry1I</i> primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.	46

GİRİŞ

Böceklerin bazı hastalıkları yayması ve tarım alanlarına zararı yüzünden insanlık tarihi boyunca böceklerle mücadele edilmiştir. Günümüzde doğal habitatı koruyacak şekilde tarımsal verimin artırılması için böceklere karşı kimyasal ve biyolojik mücadele yapılmaktadır. Doğal habitatı korumadan yapılan bazı kimyasal ve biyolojik mücadeleler biyolojik çeşitliliğin azalmasına, ekolojik dengenin bozulmasına, çeşitli zararlıların ortaya çıkmasına, bitkinin veriminin azalmasına yol açmıştır. Aynı zamanda kullanılan çeşitli kimyasal ilaçlar uzun vadede toprak kirliliğine de yol açmaktadır. Tarım alanlarının yanlış kullanımı hem çevreyi hem de insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bitkisel üretim sürecinde bitkiyi koruma yöntemleri ve uygulamaları insana ve çevreye zarar vermeden yapılmalıdır.

Birçok ülkede hedef olmayan faydalı böcekler üzerindeki ve özellikle de omurgalı hayvanlar üzerindeki etkileri sebebiyle ve de gıda ve su kaynaklarını kirlilemeleri nedeniyle kimyasal insektisit kullanımı kısıtlanmıştır [1]. Bu olumsuz etkiler ve çevresel kirliliğe karşı koymak için biyolojik kontrol ajanlarının (özellikle böcek patojenlerinin) kullanımı artmıştır. Sonuç olarak, entegre zararlı mücadele (IPM)'nin bir bileşeni olarak biyo-pestisitlerin kullanımı, dünya üzerinde kabul görmeye başlamıştır. Bununla birlikte, entomopatojen organizmalarda, potansiyel kontrol ajanı olarak çevreye salınmadan önce birkaç önemli noktaya dikkat edilmelidir [1];

- 1- Hedef zararlıya karşı oldukça spesifik ve etkili olmalıdır.
- 2- Organizma sürekli üretim teknolojisi ile başarılı bir şekilde işlenebilme potansiyelini göstermelidir.
- 3- Makul bir raf ömrüne sahip olmalı ve stabil olmalıdır.
- 4- İnsan ve hedef olmayan flora ve fauna için zararsız olmalıdır.

Entomopatojen bir organizma olarak *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tüm bu şartları karşılamaktadır. *Bt* ürünleri, tarım, ormancılık ve sağlık alanında zarar oluşturan böceklerin kontrolünde biopestisit olarak kullanılmaktadır [1].

Avantajları; hedef böceklerle karşı spesifik toksite, kalıntı bırakmama ve memeliler, kuşlar, amfibiler ve sürüngenler gibi hedef dışı organizmalara karşı güvenli olmasıdır. Fakat *Bt* suşlarının sporlanma esnasında ürettikleri Cry toksinleri böceklerle karşı spesifik etki göstermekle birlikte, aynı organizma türüne ait bazı suşların vejetatif haldeyken ürettikleri β -ekzotoksinler seçici bir etki göstermeden organizmalar üzerinde öldürücü etki gösterebilmektedir. Bu nedenle hazırlanan preparatlar içerisinde termostabil β -ekzotoksin geni (*thuE*) bulunmaması önem arz etmektedir. Bu çalışmada bu tür olumsuzların engellenmesine yönelik olarak laboratuvar stoklarımızda bulunan ve β -ekzotoksin geni taşıyan yerel *Bt* suşlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu şartları sağlayan *Bt* preparatlarının her açıdan ideal insektisit olduğu kanıtlanmıştır. Bu ürünler doğal dengeyi bozmadan hedef böcekleri kontrol eder. β -ekzotoksinler bu bakteride tanımlanan ilk yaygın vejetatif faktörlerden biridir [2]. Diğer hücre dışı insektisidal toksinler gibi, β -ekzotoksin de vejetatif büyüme sırasında üretilir [2]. Bu bileşik bir ATP analogu olup, bu benzerlik β -ekzotoksin'i DNA'ya bağlı RNA polimerazların bir inhibitörü yapar [2].

Tip I turingiensinler ile ilgili araştırmalardaki ilerlemelere rağmen tip II turingiensinlerin yapısı, özellikleri ve etki biçimleri hakkında ayrıntılı çalışmalar bulunmamaktadır. Biyokontrol amaçlı kullanılan *Bt* suşlarında turingiensinlerin tespiti ve miktarının belirlenmesine yönelik çalışmaların devam etmesi önem arz etmektedir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. *Bacillus thuringiensis* 'in tarihçesi

Bt, önce Japonya'da Shigetane Ishiwata (1901) tarafından ipekböceği (*Bombyx mori*) larvalarında sotto hastalığının sebebi olarak keşfedilmiştir [3]. Patojenisitenin kaynağının bir toksinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Daha sonra toksinlerin morfolojik olarak tanımlanması Alman bakteriyolog Ernst Berliner tarafından 1915 yılında yapılmıştır [4,5]. Aoki ve Ishiwata *Bacillus sotto* adı verdikleri organizmayı detaylı olarak tanımlayıp spor oluşturan kültürlerde böcek öldürücü aktivitesinin olduğunu ancak vejetatif hücre kültürlerinde bu toksinlerin olmadığını belirtmişlerdir [6]. Yapılan çalışmalarda *Bt*'nin temel biyolojisi hakkında çok az şey anlaşılmış olsada, bazı lepidopter larvalarına karşı patojenisite gösterdiği belirtilmiştir.

Bununla birlikte, organik klorlu ve organofosfatlı böcek öldürücülerin keşfedildiği 1940 yılında tamamen sentetik kimyasal böcek öldürücüler ortaya çıktı. Bu böcek öldürücüler büyüme mevsimlerinde böcek zararlılarının tüm gelişim evrelerinde etkili olmaktaydı [1]. Bu bileşiklerin tür spesifik olmaması, doğal düşmanları ortadan kaldırılması ve zararlı popülasyonlarında direnç ortaya çıkması nedeniyle 1950'de ciddi problemler ortaya çıkmaya başlamıştır [1]. *Bt* preparatlarının kullanımına yönelik ilgi, bu tarihten sonra önemli bir artış göstermiştir. *Bt* toksisitesinin parasporal kristallerden kaynaklandığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur [7]. Bu keşifle birlikte, *Bt*'nin kristal yapısı, biyokimyası ve etki mekanizması üzerine ilgi arttı. 1961 yılına gelindiğinde *Bt* EPA (Çevre Koruma Ajansı) tarafından biyopestisit olarak tescillendi.

Fakat sonraki araştırmalarda bazı *Bt* ürünlerinde Beta-ekzotoksin bulunması, çeşitli güvenlik sorunlarını da beraberinde getirmiştir [8,9]. *Bt* üzerindeki araştırmalar, tarımda kullanılabilecek çok çeşitli protein üretme kapasitesine sahip genler olduğunu ortaya çıkarmış ve çalışmalar genişleyerek devam etmiştir [10-15]. *Bt* ürünleri yüksek etkinlikleri ve spesifik hedef spektrumu dolayısıyla, zararlı kontrolünde kullanılan birçok geniş spektrumlu kimyasal pestisitini yerini almıştır [1].

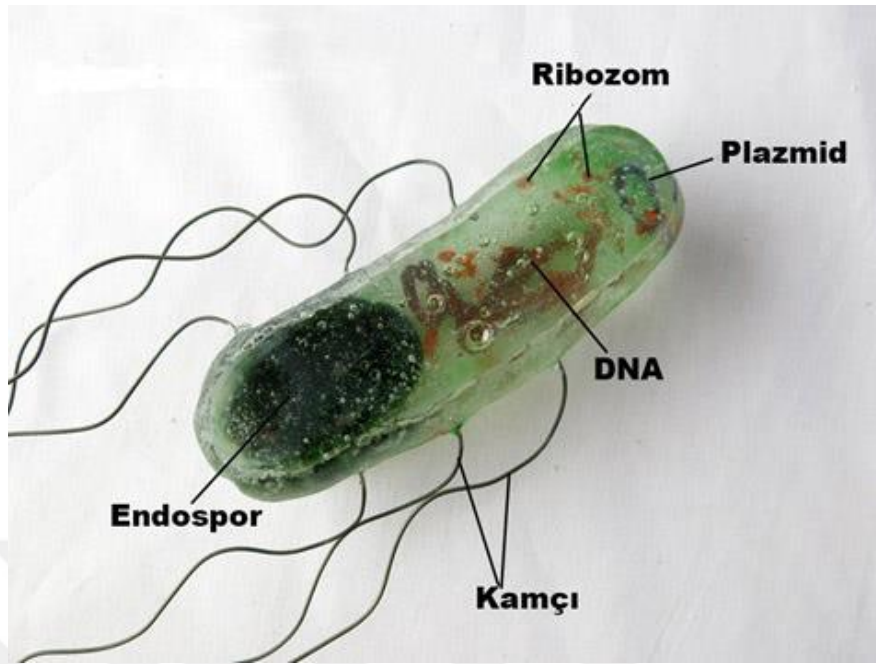
Bt toksinlerinin bu derece etkili ve spesifik olması araştırmacıları gen aktarımı yoluyla bitkilerde böceklerle karşı dayanıklılık geliştirilmesine yöneltmiş ve ekonomik değeri bulunan birçok bitkiye aktarım sağlanmıştır. Bitkiler arasında en önemlileri mısır, pamuk, patates ve pirinç olup kullanımında oldukça yaygındır [1, 16].

Tüm bunlara rağmen *Bt* ürünlerinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır; örneğin,

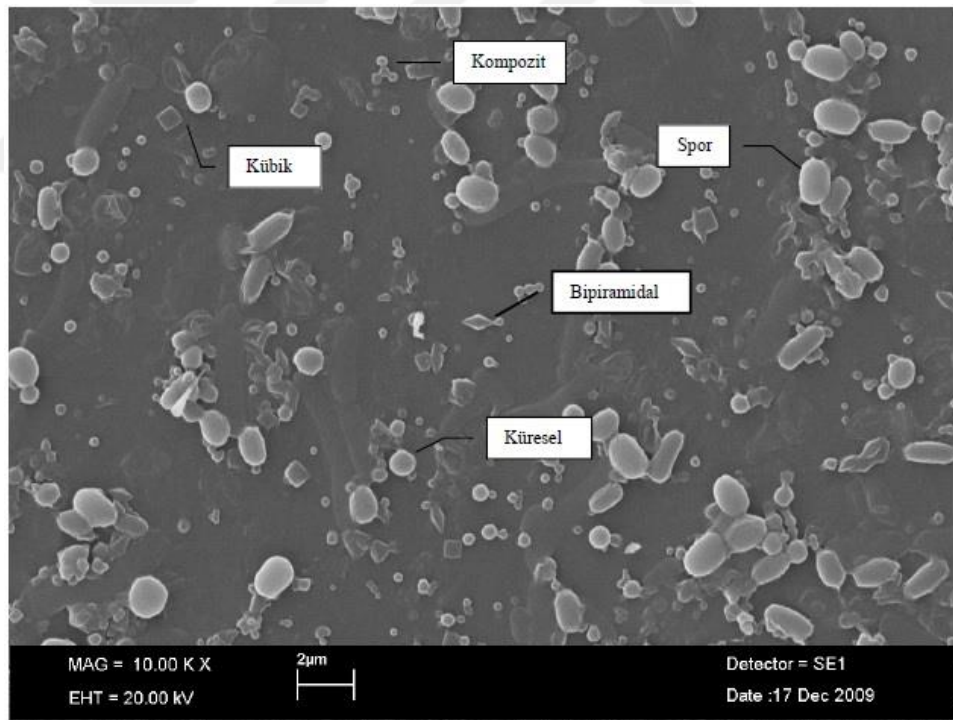
- 1- *Bt* spreyleri bitkinin tüm kısımlarına homojen olarak uygulanamayabilmekte,
- 2- Bitki dokuları içine girememekte,
- 3- UV ışınlarına karşı oldukça duyarlı olup hızlı bozulmaya uğrayabilmektedir [1]. Bu nedenle doğadaki yarı ömrü oldukça kısadır.

1.2 *Bacillus thuringiensis* 'in biyolojik özellikleri

Bt, toprak, su, bitki yüzeyleri, tohum tozu, ölü böcekler ve böcek dışkısı gibi çeşitli çevresel kaynaklardan kolaylıkla izole edilebilen, aerobik, gram pozitif ve spor oluşturan fakültatif bir entomopatojendir (şekil 1) [1]. şeker, amino asit veya oksijen gibi bir veya daha fazla unsurların sınırlayıcı etkisi ortaya çıkana kadar vejetatif büyüme ve çoğalma devam eder [1]. Koşulların sınırlanması durumunda bakteri sporlanır ve parasporal cisim üretir ve daha sonra yukarıda belirtildiği gibi kristal içeren formlarında bir veya daha fazla insektisidal protein oluştururlar (şekil 2).



Şekil 1. *Bacillus thuringiensis* bakterisi [17]



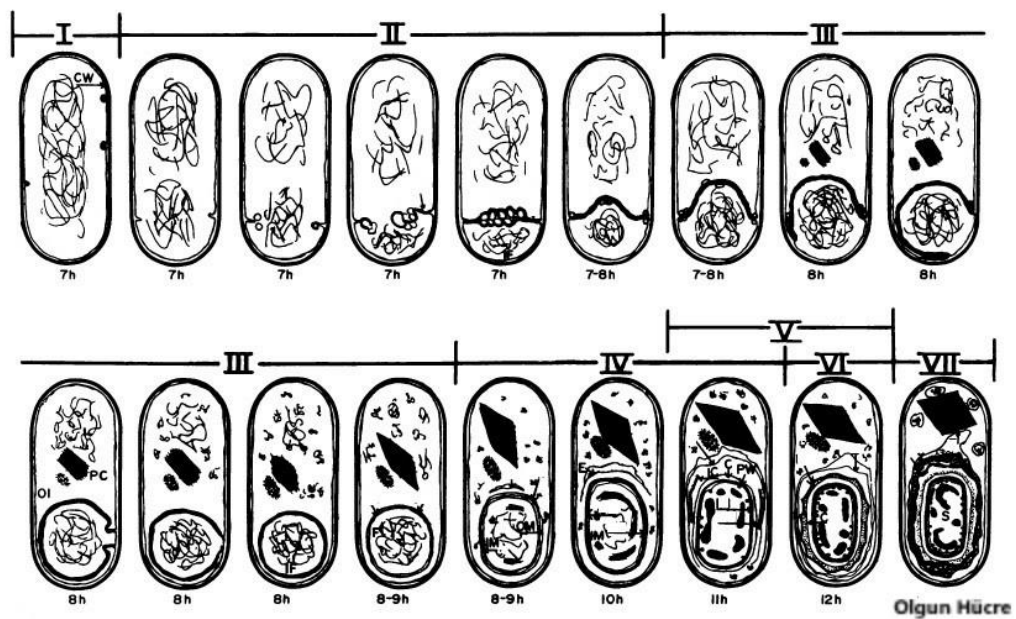
Şekil 2. Sy56.3 suşunun spor ve kristal proteinlerin taramalı elektron mikroskop görüntüsü [18].

Bt flagellar serotiplendirmeye göre 70'den fazla alttüre ayrılmıştır (Tablo 1.) [19]. *Bt*, *Bacillus cereus* grup olarak adlandırılan *B. cereus* (*Bc*), *B. anthracis* (*Ba*) ve *B. thuringiensis* (*Bt*) olmak üzere üç bakteriden biridir. Genetik yapı olarak birbirinden ayrılması oldukça güç olup Cry ve Cyt gibi proteinler üretmesiyle diğerlerinden ayırdedilebilir. Bu nedenle bu gruptaki bakterilerin izolasyon çalışmaları dikkatli bir şekilde yapılmalıdır [1].

Cry ve Cyt proteinlerinin hepsi olmasada çoğu plazmitlerde kodlanır. Dolayısıyla, eğer bu plazmidler bir suştan kaybolursa ya da çeşitli etkilere bağlı olarak atılırsa elde edilen suş *Bc* olarak tanımlanacaktır [20]. Bazı çalışmalarda, *Bc*, *Bt* ve *Ba*'in hepsinin aynı türde olduğu öne sürülmüştür [21]. *Ba*'de ise doğal olarak Cry proteinleri içeren parasporal cisimler bulunmaz [1].

1.3. *Bacillus thuringiensis*'in yaşam döngüsü ve spor oluşumu

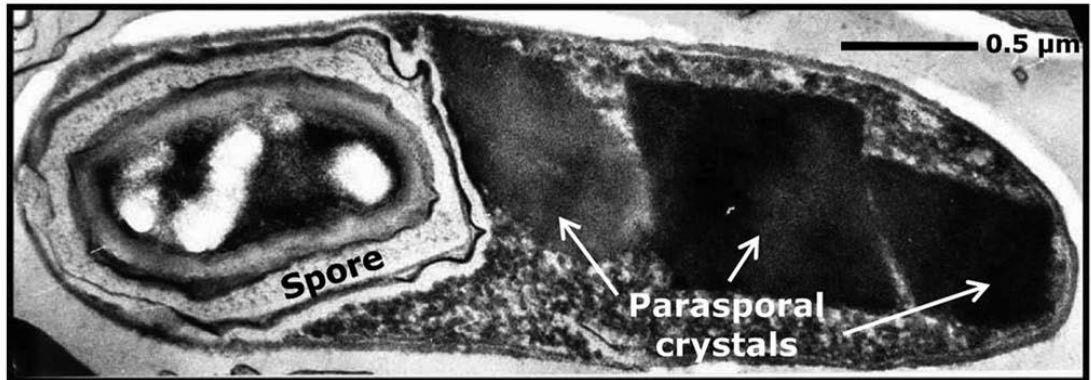
Bt'nin yaşam döngüsü, vegetatif hücre bölünmesi ve spor gelişimi olmak üzere iki faz ile karakterize edilmiştir [22]. Vegetatif hücre çubuk şeklinde olup (2-5 µm uzunluğunda ve yaklaşık 1µm genişliğinde) plazma zarının ortasında başlatılan bir septum oluşturularak iki üniform hücre oluşturulur. Fakat sporulasyon aşaması hücre içerisinde asimetrik olarak gerçekleşebiliş yedi ana evreden oluşur (Şekil 3) [23].



Şekil 3. *Bacillus thuringiensis* kristal oluşum evreleri [23].

Şekil 3.'de görüldüğü gibi (Evre I) nükleoidle mezosomların belirgin bir şekilde karışmadığı aksel filament oluşumu, (Evre II) mezosomları içeren forespore septum oluşumu, (Evre III) mezosomla çevrelenerek içeri alınma, parasporal kristallerin ilk görünümü ve bir forespore oluşumu, (Evre IV-VI.) ekzospore oluşumu, spor nükleoidinin transformasyonu ile birlikte ilk hücre duvarı, korteks ve spor katlarının oluşumu, (Evre VII ve sonrası) sporların olgunlaşması şeklinde gerçekleşir [23].

Şekil 4'de görüldüğü gibi *Bt*'nin tamamen olgunlaşmış ve spor oluşturmuş bir hücresinde endospore boyunca uzanan parasporal kristaller bulunmaktadır [23]. Spor oluşumu sırasında *Bt* tarafından kristal proteinlerin üretilmesi, spor oluşumu sırasında su kaybını sağlayarak stresin fiziksel olarak hafifletildiği ve konakçıda ölümcül bir etki yaparak sağ kalma avantajı sağladığı, genetik olarak düzenlenen benzersiz bir olaydır [23].



Şekil 4. *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* suşunun spor hücresinin transmisyon elektron mikrofisi [24].

1.4 *Bacillus thuringiensis*'in sistematığı ve insektisit proteinleri

B. cereus, *B. thuringiensis* ve *B. anthracis*'in aynı türün üyesi olduğu belirtilmiştir [20]. *Bt* plazmidlerinin *Bc* 'ye aktarılabilirdiği ve çoğaltılabildiği diğer özelliklerin arasında gösterilsede, *Ba*'nın toksinlerini kodlayan iki plazmit *Bt* veya *Bc*'de görülmez ve bu yüzden *Ba*'da *Bt* Cry proteinleri içeren parasporal cisimler bulunmaz [25].

Tablo 1. *B. thuringiensis* suşlarının H-antijenine göre sınıflandırılması [19].

H-antijeni	Serovar	Kısaltması
1	<i>thuringiensis</i>	<i>thu</i>
2	<i>finitimus</i>	<i>fin</i>
3a,3c	<i>alesti</i>	<i>ale</i>
3a,3b,3c	<i>kurstaki</i>	<i>kur</i>
3a,3d	<i>sumiyoshiensis</i>	<i>sum</i>
3a,3d,3c	<i>fukuokaensis</i>	<i>fuk</i>
4a,4b	<i>sotto</i>	<i>sot</i>
4a,4c	<i>kenyae</i>	<i>ken</i>
5a,5b	<i>galleriae</i>	<i>gal</i>
5a,5c	<i>canadensis</i>	<i>can</i>
6	<i>entomocidus</i>	<i>ent</i>
7	<i>aizawai</i>	<i>aiz</i>
8a,8b	<i>morrisoni</i>	<i>mor</i>
8a,8c	<i>ostrinae</i>	<i>ost</i>
8b,8d	<i>nigeriensis</i>	<i>nig</i>
9	<i>tolworthi</i>	<i>tol</i>
10a,10b	<i>darmstadiensis</i>	<i>dar</i>
10a,10c	<i>londrina</i>	<i>lon</i>
11a,11b	<i>toumanoffi</i>	<i>tou</i>
11a,11c	<i>kyushuensis</i>	<i>kyu</i>
12	<i>thompsoni</i>	<i>tho</i>
13	<i>pakistani</i>	<i>pak</i>
14	<i>israelensis</i>	<i>isr</i>
15	<i>dakota</i>	<i>dak</i>
16	<i>indiana</i>	<i>ind</i>
17	<i>tohokuensis</i>	<i>toh</i>
18a,18b	<i>kumamotoensis</i>	<i>kum</i>
18a,18c	<i>yosoo</i>	<i>yos</i>
19	<i>tochigiensis</i>	<i>toc</i>
20a,20b	<i>yunnanensis</i>	<i>yun</i>
20a,20c	<i>pondicheriensis</i>	<i>pon</i>
21	<i>colmeri</i>	<i>col</i>
22	<i>shandongiensis</i>	<i>sha</i>
23	<i>japonensis</i>	<i>jap</i>
24a,24b	<i>neoleonensis</i>	<i>neo</i>
24a,24c	<i>novosibirsk</i>	<i>nov</i>
25	<i>coreanensis</i>	<i>cor</i>
26	<i>silo</i>	<i>sil</i>
27	<i>mexicanensis</i>	<i>mex</i>
28a,28b	<i>monterrey</i>	<i>mon</i>
28a,28c	<i>jegathesan</i>	<i>jeg</i>
29	<i>amagiensis</i>	<i>ama</i>
30	<i>medellin</i>	<i>med</i>
31	<i>toguchini</i>	<i>tog</i>

Tablo 1. *B. thuringiensis* suşlarının H-antijenine göre sınıflandırılması (Devamı)

H-antijeni	Serovar	Kısaltması
32	<i>cameroun</i>	<i>cam</i>
33	<i>leesis</i>	<i>lee</i>
34	<i>konkukian</i>	<i>kon</i>
35	<i>seoulensis</i>	<i>seo</i>
36	<i>malaysiensis</i>	<i>mal</i>
37	<i>andaluciensis</i>	<i>and</i>
38	<i>oswaldocruzi</i>	<i>osw</i>
39	<i>brasiliensis</i>	<i>bra</i>
40	<i>huazhongensis</i>	<i>hua</i>
41	<i>sooncheon</i>	<i>soo</i>
42	<i>jinghongiensis</i>	<i>jin</i>
43	<i>guiyangiensis</i>	<i>gui</i>
44	<i>higo</i>	<i>hig</i>
45	<i>roskildiensis</i>	<i>ros</i>
46	<i>chanpaisis</i>	<i>cha</i>
47	<i>wratislaviensis</i>	<i>wra</i>
48	<i>balearica</i>	<i>bal</i>
49	<i>muju</i>	<i>muj</i>
50	<i>navarrens</i>	<i>nav</i>
51	<i>xiaguangiensis</i>	<i>xia</i>
52	<i>kim</i>	<i>kim</i>
53	<i>asturiensis</i>	<i>ast</i>
54	<i>poloniensis</i>	<i>pol</i>
55	<i>palmanyolensis</i>	<i>pal</i>
56	<i>rongseni</i>	<i>ron</i>
57	<i>pirenaica</i>	<i>pir</i>
58	<i>argentinensis</i>	<i>arg</i>
59	<i>iberica</i>	<i>ibe</i>
60	<i>pingluonsis</i>	<i>pın</i>
61	<i>sylvestriensis</i>	<i>syl</i>
62	<i>zhaodongensis</i>	<i>zha</i>
63	<i>bolivia</i>	<i>bol</i>
64	<i>azorensis</i>	<i>azo</i>
65	<i>pulsiensis</i>	<i>pul</i>
66	<i>graciosensis</i>	<i>gra</i>
67	<i>vazensis</i>	<i>vaz</i>
68	<i>thailandensis</i>	<i>tha</i>
69	<i>pahangi</i>	<i>pah</i>

1.5. *Bacillus thuringiensis*'in biyolojik olarak aktif metabolitleri

Oldukça farklı sınıflara ait çeşitli zehirli metabolitler *B. thuringiensis* tarafından büyüme döngüsü boyunca üretilir [26]. Bunlar Tablo 2'de özetlenmiştir. Bunların en önemlisi olan delta-endotoksinler, *Bt*'yi diğerlerinden ayıran önemli bir özelliktir [26].

Delta-endotoksin hemen hemen tek başına önemli bir insektisid olma özelliğine sahiptir. Diğer metabolitler olan α -ekzotoksin, β -ekzotoksin ve ekzoenzimler *Bt* çeşitleri tarafından üretilmektedir [26]. Beta-ekzotoksin vejetatif büyüme sırasında ortama salınan bir sekonder metabolittir. Tesbit edilen *Bt* çeşitlerinin yaklaşık yarısı beta-ekzotoksin üretir [26]. Faaliyet alanı sadece böcekleri değil aynı zamanda diğer organizmaları da kapsayacak kadar geniş spektrumludur [27]. ABD ve Batı Avrupa'da pazarlanan *Bt* preparatları, beta-ekzotoksin içermeyen suşlardır [26]. Vejetatif durumda ve spor üreten hücreler konakçılarda özellikle *Bt*'nin çoğalmasını destekleyen lesitinaz, kitinaz ve proteaz enzimleri salgırlar [26].

Tablo 2. *Bacillus thuringiensis*'in biyolojik olarak aktif metabolitleri [26].

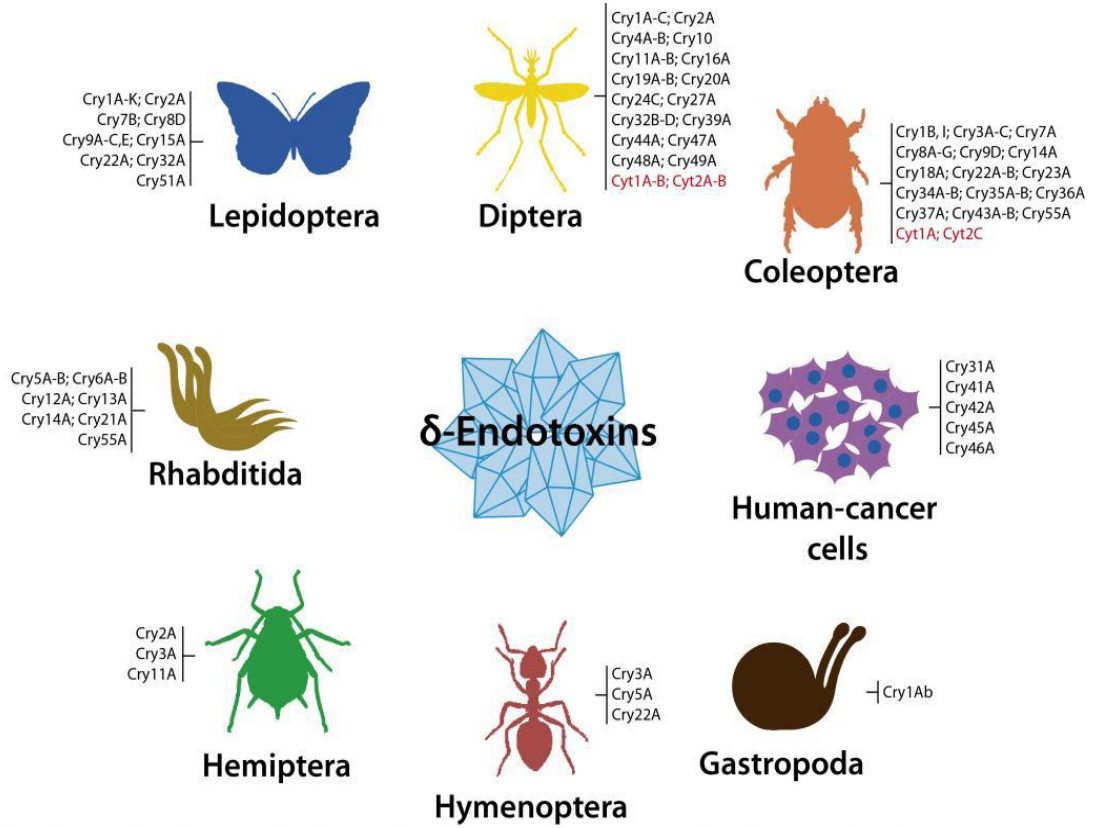
Metabolit	Yapısı	Etki alanı	Önemi
Alpha-ekzotoksin	Protein (tanımlanmamış)	Böceklerde ve yüksek konsantrasyonlarda omurgalılarda	Hiçbiri, ticari preparatlarda mevcut değildir
Beta-ekzotoksin	Nükleotid analogu	Omurgasızlar ve Omurgalılar	ABD ve Batı Avrupa'nın preparatlarında bulunmaz. Yüksek sivrisinek ve sinek aktivitesi gösterir.
Delta-endotoksin	Kristal protein	Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Nematod	Tüm <i>Bt</i> preparatlarında
Enzimler	Lesitinazlar, Kitinazlar ve Proteazlar	Uygun bir substrat varlığında hücrelere ve organlara zarar verme yeteneği	Ticari preparatlarında rapor edilmemiştir

1.5.1. Alfa-Ekzotoksinler

Bu bileşik hakkında çok az şey bilinmektedir. Krieg, böceklere ve farelere karşı aktif olan, ısıya dayanıklı bir protein olarak nitelendirmiştir [28]. Fare faktörü olarak da adlandırılan alfa ekzotoksin, *Bt* ve *Bc* suşları tarafından üretilir. Krieg, α -ekotoksinin, bu enzimi üretmeyen suşların vejetatif hücreleri tarafından da oluşturulduğu için, lesitinaz C ile özdeş olma olasılığını hariç tutmuştur [28].

1.5.2. Delta-Endotoksinler (δ -Endotoksinler)

Kristal proteinler, büyümenin sabit fazı boyunca parasporal kristal oluşum şeklinde üretilir [29,30]. En yaygın olarak bilinen, Cry ve Cyt toksinleri de dahil olmak üzere δ -endotoksinlerdir [31]. Cry proteinleri homoloji ve molekül yapısına göre gruplara ayrılabilir. Omurgasızlara karşı etkisi bulunmayan kristal toksinlerin hem Cry hem de Ps tanımlamaları vardır [32]. Cyt proteinleri, çeşitli diptera larvalarına, özellikle sivrisineklere ve kara sineklere karşı insektisit aktivitesi olan daha küçük, kristal protein gruplarını oluştururlar [33-35]. Ek olarak, bazı Cyt toksinleri diğer *Bt* proteinlerinin insektisit aktivitesini etkiliyor olabilir [35,36]. Bir proteinin Cry toksini olarak adlandırılması, parasporal bir kristal oluşturduğu gerçeğinden kaynaklanır [31]. Sonuç olarak, Cry toksinleri tek bir homolog protein ailesine ait değildir. Bunun yerine, bir takım ilgisiz soyları içerir [31]. En büyük grup, iyi bilinen Cry proteinlerini içerirken, diğer Cry toksinleri farklı protein ailelerine aittir [32]. *Lysinibacillus sphaericus* tarafından üretilen binary Bin- ve ETX_MTX2 (Cry45 ya da Ps4, Cry46 ya da Ps2, Cry64 ya da Ps5) benzeri toksinleridir [37,38]. Günümüzde, Cry proteinleri, *Bacillus* türlerinin ürettiği en büyük böcek öldürücü protein grubunu oluşturmaktadır. *Bt* Toxin Adlandırma Komitesi bugüne kadar *Bt* ve *Ls*'den ve ETX_MTX2 ailesi proteinleri de dahil olmak üzere 73 farklı (Cry1 ila Cry73) Cry proteini sınıflandırmış ve bunların Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera ve Dipteralara karşı toksisite gösterdiği belirtilmiştir [39]. Ayrıca Nematod ve bazı salyangoz [29,30,34,37,40-42] ve/veya insan kanseri hücreleri üzeridede toksisitesinin olduğu belirtilmiştir (Şekil 5) [32].

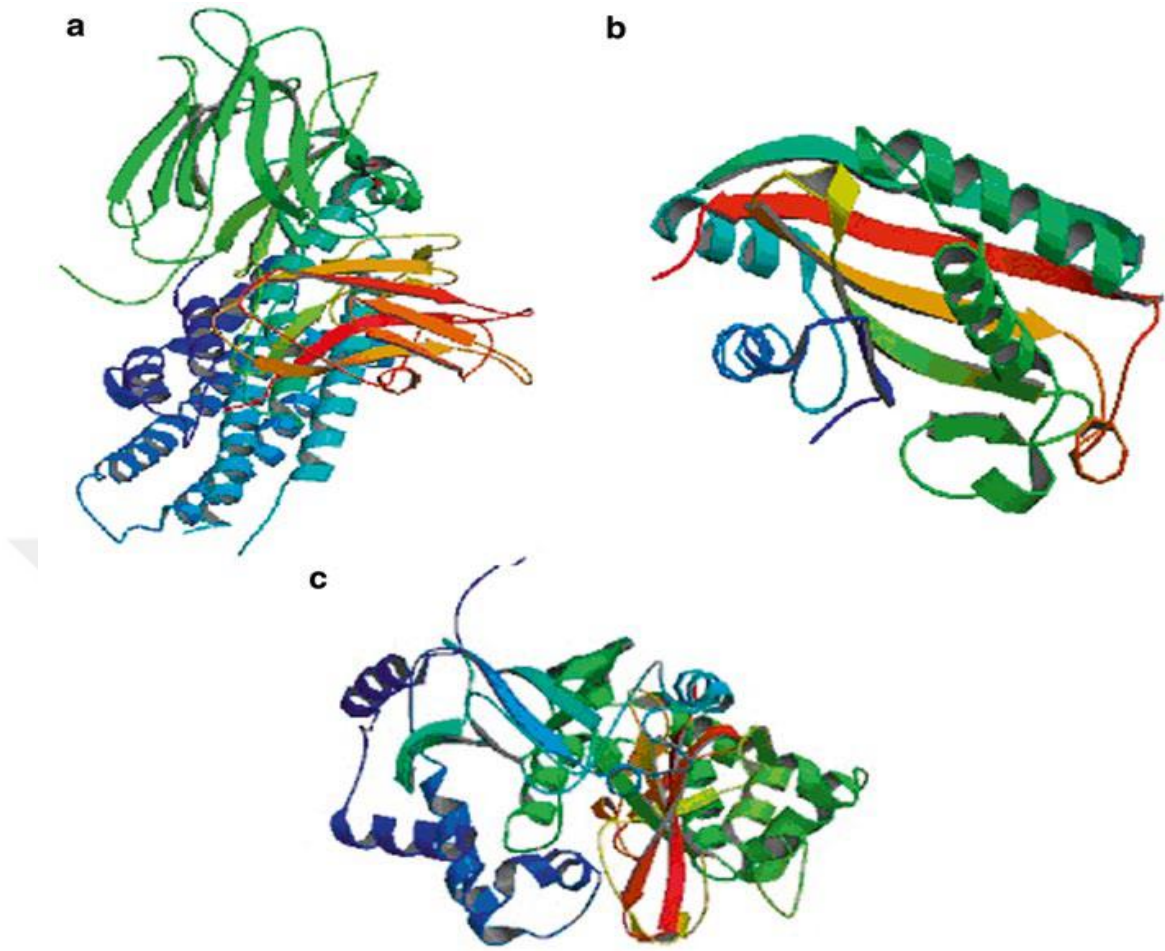


Şekil 5. *Bt* δ -endotoksinlerin (Cry ve Cyt) bilinen konakçı spektrumunu gösteren özet bir görünüm [40,43]. *cry1A-C* (tire ile ayrılmış), *cry1A*, *cry1B* ve *cry1C* toksinlerinin bir grubunu gösterir. *cry1B*, I (virgül ile ayrılmış), farklı *cry1B* ve *cry1I* toksinlerini gösterir. Noktalı virgül ayrı gruplar veya bireysel toksinler. Cyt toksinleri kırmızı renktedir [31].

1.6. Böcek öldürücü proteinlerin toksitesi ve etki mekanizması

Cry toksinleri belirli bir spektrumda böcek öldürücü aktiviteye sahip olup genellikle Lepidoptera (kelebekler ve güveler), Diptera (sinekler ve sivrisinekler), Coleoptera (Kabuklu böcekler), Hymenoptera (arılar) ve nematodlar üzerinde etkilidir [45]. Birkaç toksin, belirli bir suştaki toksinlerin kombinasyonu nedeniyle iki veya üç böcek takımını kapsayan bir aktivite spektrumuna sahiptir. Cry proteinleri, 200'den fazla üyeye sahip en az 50 alt gruptan oluşur [44] ve toksinler temel olarak sadece homolog amino asit dizisi olarak sınıflandırılır, her protoksin filogenetik sınıflandırmaya göre Cry (ya da Cyt) olarak adlandırılmıştır [42].

Cry ve Cyt proteinlerine olan aşırı ilgiden dolayı (Şekil 6a,b), diğer metabolitler daha az ilgi görmüştür [1]. Bunların içerisinde en önemlileri spor, β -ekzotoksin (thuringiensin olarak da bilinir) ile Zwittermicin, vegetatif insektisidal proteinler (Vip's) gibi antibiyotikler (Şekil 6c), fosfolipazlar, kitinazlar ve çeşitli proteazlardır [25]. Cyt proteinleri (Şekil 6b), bazı *Bt* suşları tarafından üretilen hemolitik ve sitolitik toksinlerdir [1]. Cyt toksinleride ayrıca por oluşturabilen proteinler olup Cry toksinleri ile filogenetik olarak ilişkili değildirler. Bunlar β -tabakalı yapı ve α -heliks yapıdan oluşan tek bir α - β domaine sahiptirler [45]. Cyt toksinleri protein reseptörlerine bağlanmazlar ve gözenek oluşturmak için membrana yerleştirilen membran lipidleri ile doğrudan etkileşirler [46] veya membranı deterjan benzeri bir etkileşimle bozarlar [47]. β -ekzotoksin I logaritmik büyüme evresinde üretilen, termostabil, spesifite göstermeyen ve dolayısıyla da hedef olmayan organizmalar üzerinde zararlı etki gösterebilen metabolitlerdir. Özellikle diptera türlerine karşı daha aktiftir. Ancak Coleoptera, Lepidoptera ve bazı nematod türlerine karşı da etkindir [1]. Bu toksin, bağlanma yerleri için ATP ile rekabete girerek RNA sentezini engeller. Dolayısıyla böceklerin deri değiştirme evresinde ve pupa evresinde öldürücü doz altında teratojenik etkilere neden olmaktadır [48,49]. Cry-bağımlı plazmitlerde bulunan β -ekzotoksin I üretiminden sorumlu genetik belirleyiciler muhtemelen düzenleyici elementler olacak ve büyük miktarlarda β -ekzotoksin I bu plazmidlerin yokluğunda üretilenilecektir [1]. *berAB* tarafından kodlanan bir ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcısı, β -ekzotoksin I üretimi için gereklidir [1]. β -ekzotoksin I üretimi, belirli çevresel koşullara yanıt olarak aktive edilebilir [48,49]. Vegetatif böcek öldürücü proteinler (Vip) (Şekil 6c), vejetatif büyüme sırasında bazı *Bt* suşları tarafından üretilir [1]. Bu proteinler parasporal kristal proteinlerinden olmayıp vejetatif büyüme sırasında salgılanırlar ve Lepidoptera ve bazı Coleopteralara karşı büyük bir aktivite spektrumu gösterirler [50].



Şekil 6. Cry ve Vip tersiyer yapısı [51]. **a** δ -endotoxin Cry4Aa tersiyer yapısı. **b**. Sitolitik endotoksin Cyt2Ba'nın tersiyer yapısı. **c** Vip2 protein tersiyer yapısı.

Zwittermicin bazı *Bt* suşları tarafından üretilir ve ikincil bir metabolit olarak fitopatogenik mantarlara karşı anlamlı etkinlik gösterebilir [52]. Endotoksin kristallerinin etkili olması için yutulmuş olması gerekir. Yuttuktan sonra, kristaller böceğin orta bağırsağındaki alkali koşullarda çözünür hale getirilir ve daha sonra proteolitik olarak toksik hale dönüştürülür [37]. İnsanlar da dahil olmak üzere birçok omurgalıda midedeki asidik koşullar altında Cry ve Cyt protein kristalleri çözülebilir, fakat 2 dakikadan daha az sürede mide özsuğu tarafından hızlı bir şekilde etkisizleştirilir [1]. Aktifleşmiş toksinler orta bağırsak epitel hücrelerinin apikal mikrovillus membranında bulunan reseptörlere (glikoprotein ya da glikolipid) bağlanır [53].

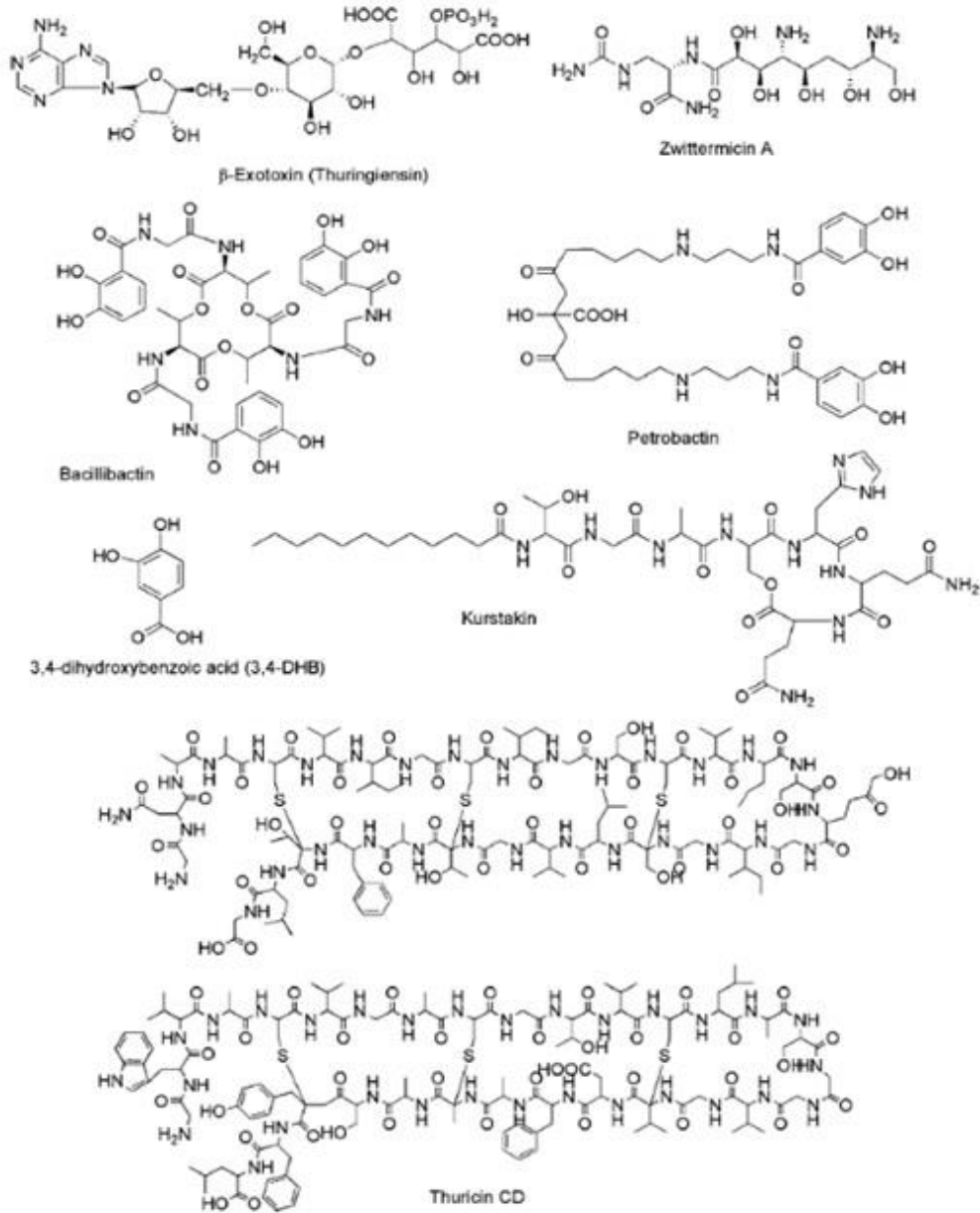
Bazı toksinler için farklı lepidopter böceklerde en az dört farklı bağlanma yeri tarif edilmiştir: bunlar, cadherin-benzeri protein (CADR), glikosilfosfatidil-inositol (GPI)-anchoredaminopeptidaz-N (APN), GPI bağlantılı alkalın fosfataz (ALP) ve birde 270 kDa boyutunda gliko-konjugat [54,55]. Bağlandıktan sonra, toksin, hücre zarı içine sokulmasına izin veren bir konformasyon ve bir katyon seçici kanal oluşturur [1]. Daha sonra, oligomerizasyon oluşur ve bu oligomer formlar membran üzerinde sınırlarına dokunur, bulunan fonksiyonel reseptörler içinde katyonik geçirgenliğin artmasıyla indüklenen bir gözenek veya iyon kanalı oluşturur [56].

1.7. *Bacillus thuringiensis*'in sekonder metabolitleri

Bacillus türleri arasında *Bt*, parasporal protein kristalleri üreten, en iyi bilinen ve en çok çalışılan entomopatojenik bakteridir. Bunlar çeşitli omurgasızların farklı türleri için seçici olarak toksiktirler [57]. *Bt*'nin birçok izolatu, kültür ortamına salgılanan çeşitli virülans faktörlerinden bir ürün yelpazesi üretir ve aynı zamanda bu faktörler vejetatif insektisidal protein (Vip) ve β -ekzotoksin I içerir. β -ekzotoksin ayrıca *thuringiensis* olarakta adlandırılır [58]. Vip ve Cry toksinlerinin aksine, β -ekzotoksin I spesifik değildir ve dolayısıyla hedef olmayan organizmalar üzerinde zararlı etkiler yapabilir [58]. Özellikle diptera türlerine karşı aktif olmakla birlikte Coleoptera, Lepidoptera ve bazı nematod türlerine karşı da etkindir [48]. Bu toksin, bağlanma yerleri için ATP ile rekabete girerek RNA sentezini engeller. Dolayısıyla deri değıştirme ve pupa evresini etkiler ve subletal dozlarda teratojenik etkilere neden olur [24,48]. Cry-bağımlı plazmidlerde bulunan β -ekzotoksin I üretiminden sorumlu genetik belirleyiciler muhtemelen düzenleyici elementler olup büyük miktarlarda β -ekzotoksin I, bu tür plazmidlerin yokluğunda üretilebilir [48,49].

Varsayılan ABC (ATP-Binding Cassette) taşıyıcısı gerekli β -ekzotoksin I üretimi için *berAB* tarafından kodlanır. β -ekzotoksin I üretimi, belirli çevre koşullarına tepki olarak aktifleştirilebilir [48,49]. Böceklerle karşı temel toksik maddeler olan parasporal kristal proteinler ve sporları, güneş ışığına maruz kaldıktan sonra hızla inaktive olur [58].

Melanin pigmentinin mükemmel bir fotokoruyucu olduğu görülmüştür ve *Bt israelensis*'in sivrisinek öldürücü aktivitesi melanin kullanılarak araştırılmıştır [57]. Bazı araştırmacılar *Bt*'den melanin üreten *Bt* mutantlarını elde etmiştir [48,59], fakat ikincil bir metabolit olarak üretilen melanin *Bt*'in yabancı suşlarından elde edildi [60].



Şekil 7. *Bacillus thuringiensis*'in bazı sekonder metabolitleri [58].

Büyümeyle birlikte β -ekzotoksin I ortaya çıkmasına rağmen, melanin pigment üretiminin düzenlenmesi β -ekzotoksin I'den bağımsızdır [58]. *Bt* aynı zamanda potansiyel bir antibiyotik ve antifungal bileşime sahip zwittermicin A üretir (Şekil 7).

Aynı zamanda bu bileşim ilk olarak *Bc*'tan izole edilmiş olup yapısı doğrusal bir aminopolyol antibiyotiktir [58]. Yoncada *Phytophthora medicaginis* tarafından neden olan fide çökerten hastalığını önlemiştir [60]. Daha da önemlisi zwittermicin A, *Bt* endotoksinlerinin böceklerle karşı aktivitesini artırır [61].

1.8. β -Ekzotoksin (thuringiensin)

Bacillus thuringiensis, çeşitli böcek zararlılarının larvaları için oldukça spesifik olan böcek öldürücü kristal (Cry) proteinleri üreten bir sporlu toprak bakterisidir. [30]. Bu kabiliyet nedeniyle, *Bt* biyolojik zararlılarla mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır [62,63,64]. Thuringiensin (*thu*), vejetatif böcek öldürücü proteinler (Vip) [65], secret insecticidal protein (Sip) [66], zwittermicin A (ZwA) [67], Mtx-like toxin [68], ve Bin-like toxin [69] gibi Cry proteinlerine ek olarak *Bt*'deki diğer birçok insektisit faktör gözlemlenmiştir. *Bt* tarafından üretilen β -ekzotoksin olarak da bilinen thuringiensin (*thu*), vejetatif büyüme sırasında üretilen ve süpernatanda bulunan geniş spektrumlu vejetatif bir faktör olup termostabil bir ekzotoksindir [70]. Cry proteininin aksine, thuringiensin, adenosin, glukoz, fosforik asit ve glukonik diasitten oluşan spesifik olmayan küçük moleküllü oligosakarittir [71].

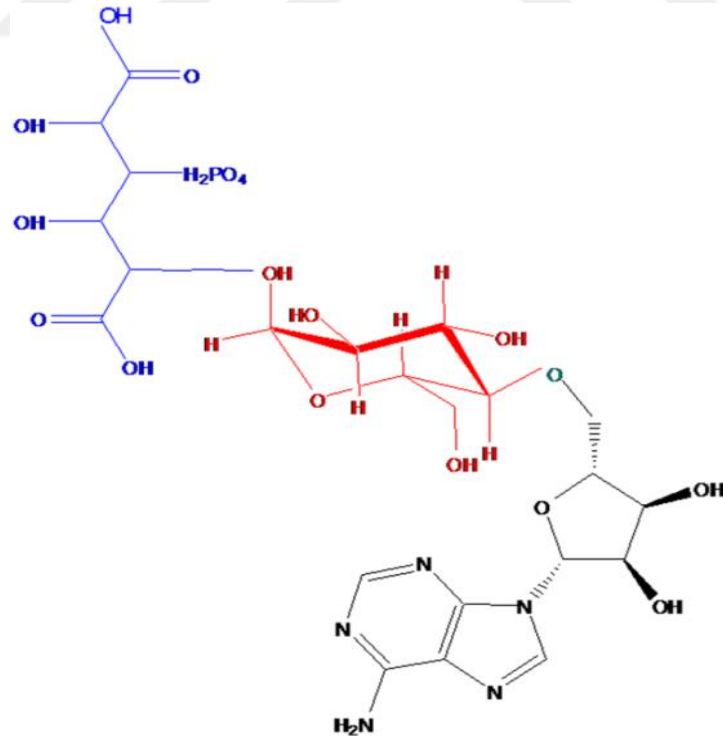
Thu ilk olarak otoklavlanan sıvı *Bt* kültürünün 1959'da McConnell ve Richards tarafından çeşitli böcek türlerine enjekte edildikten sonra böceklerin ölümüyle sonuçlanmasının ardından tespit edilmiştir [72]. Thuringiensin, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hymenoptera ve Isoptera takımlarına ait böcek türlerinin yanı sıra çeşitli nematod türlerine karşıda toksik etki gösterir [73-75]. Thuringiensinler protein olmayan ve suda çözününebilen sekonder metabolitlerdir. Aynı zamanda 15 dk boyunca 121°C ye kadar biyolojik aktivitelerini muhafaza eden ısıya dayanıklı ekzotoksinlerdir [76,77]. pH 7.0 da daha dayanıklı olduğu bilinmektedir, ancak sıcaklık artışıyla stabilitesi düşmektedir [78]. Diğer ekstraselüler insektisit toksinlerinde olduğu gibi, bakteri inokule edilen kültür ortamında bazı suşlar tarafından vejetatif büyüme sırasında üretilir [79].

Ancak sekonder metabolitlerin salgısı bu nedenle geçici olarak değişir. Bu istenmeyen ekzotoksin tanımlanmasının eksikliğini gidermek için kültür ortamındaki salgı veya numune aktivitesinin zamansal bilgisi gereklidir [80].

Thuringiensin'in farklı toksisite skalası, yüksek oranda suş üretiminin ekim zamanına bağlı olup ayrıca farklı kültür yoğunluğu ve kültür ortamının değişken koşulları ile açıklanabilir [80].

Thuringiensin'in sentezi ve etkinliği üzerinde pH ve glukoz konsantrasyonunun önemli bir etkisinin olduğu belirtilmiştir [81]. Suşlar arasındaki fizyolojik farklılıklar toksin çeşitliğinin bir sonucu olabilir. Hatta aynı miktarda hücre inokule edildiğinde bile her bir suş için farklı toksisite profilleri ve sonuç olarak izolat üreticilerinin olası bir sınıflandırma hatası meydana gelebilir [80]. Thuringiensin'in kimyasal yapı formülü $C_{22}H_{32}N_5O_{19}P$ şeklindedir (Şekil 8) [72].

Šebesta ve Horska (1970), bu ekzotoksinin adenin, fosforile alerik asit ve D-riboz ve D-glikozun eter ile olağandışı birleşimiyle şekillendirdiği bir şeker parçasından oluştuğunu ileri sürmüştür [82]. Günümüzde, thuringiensinin benzersiz bir yapıya sahip olduğu ve monosakaritlerin bir polimeri olarak asimetric karbon atomlarına sahip olduğu bilinmektedir [77].



Şekil 8. Thuringiensin (β -ekzotoksin) yapısı [70].

Farklı serotiplere ait birçok *Bt* suşu ve bazı *B. subtilis* ve *B. megaterium* suşları toksini dışarı salgılar [83,84], Bazı çalışmalarda *Bc* suşlarının thuringiensin üretebildiğini belirtilmiştir [85-88]. Örneğin, Perchat ve arkadaşları [89], 575 adet *Bc* suşu ile yaptığı çalışmada 270 tanesinin Tip II ekzotoksin ürettiğini belirtmişlerdir.

Ayrıca potansiyel mikrobik bir insektisit olan thuringiensin üretimi konusunda *Bt* sp. *darmstadiensis* HD199 suşu üzerinde çalışılmış ve penisilin G'nin, thuringiensin salınımı için hücreleri teşvik ettiği gösterilmiştir [90].

β -ekzotoksin, aslında endojen kristallerin özelliklerinden farklıdır. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- 1- Süpernatantların biyolojik aktivitesi 15dk 121°C de bile etkinliğini sürdürebilir [72].
- 2- Duyarlı böcek türlerinin spektrumu, endotoksin ile ilgili olanlardan farklıdır [72,91]
- 3- Toksisitenin genel resmi farklıdır; morfolojik anormallikler, şekil bozuklukları, dejenerasyon, teratolojik değişiklikler, tüy dökme veya pupasyon sırasında ölüm, yani fizyolojik olarak kritik aşamalardaki hemosit değişikliği farklıdır [91-98].
- 4- Endotoksin üretmeyen *Bt* çeşitleri, ekzotoksin için hala biyolojik aktivite özelliklerini korurlar [99].

1.9. *Thu*'nun insektisidal spekturumu

Thu, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera ve Isoptera böcek türleri ve birkaç nematod türü için toksiktir [73-75]. *Thu*'nun üç çeşit meyve sineği için oldukça toksik etki gösterdiği belirtilmiştir; *Anastrepha ludens* (Loew), *Anastrepha obliqua* (Macquart) ve *Anastrepha serpentina* (Wiedemann). Bunların LC₅₀ değerleri sırasıyla 0.641, 0.512 ve 0.408 mg/cm²'dir [73]. Saflaştırılmış *Thu* *Helicoverpa armigera*'ya verildiğinde ve büyümeyi önemli derecede kısıtladığı tespit edilmiştir [100]. 2002'de, Tsuchiya ve ark. Japonya'dan 2652 *Bt* suşu izole ederek sigara böceği *Lasioderma serricorne*'e (Coleoptera: Anobiidae) karşı toksisitesini değerlendirmiştir. Sonuç olarak *Thu*'nun sigara böceğine (*Lasioderma serricorne*) karşı toksik etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir [75]. Ayrıca *Thu* bitki parazit nematodlarına karşı da etkilidir [77].

1.10. Thu üretimi ve plazmitler arasındaki ilişki

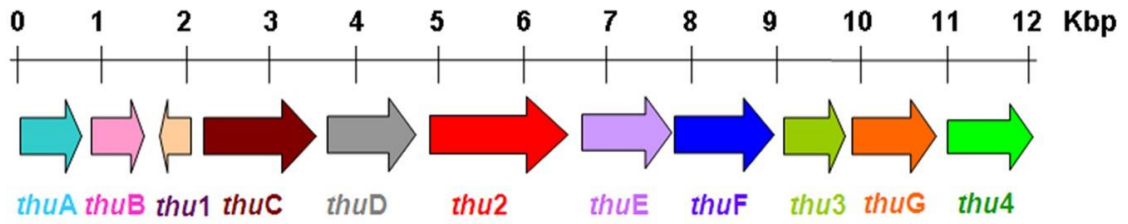
Bt HD-2'de plasmid eliminasyonu ve bunu takiben bir trans-konjugasyon deneyi gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak 75-MDa plazmidi kaybeden HD-2 türevlerinin Thu üretmediği gözlenmiştir [101]. Fakat plazmidi elde eden transkonjugantlar ise toksini ürettiği gözlemlenmiştir [101].

Biyoassayler, sadece 75-MDa plazmidini içeren suşların sinekler için toksik olduğunu göstermiştir [101]. Kristal geni olmaksızın *Bt* 407-1 (*Cry*⁻) (*Pig*⁺) mutant suşunun çözünür kahverengi bir melanin pigmenti ile önemli miktarda Thu ürettiğini bildirilmiştir [49]. Mini-Tn10 transpozonu kullanarak, 407-1 (*Cry*⁻) (*Pig*⁺) mutant suşların bir kütüphanesi kurulmuş ve bozulmuş Thu üretimi olan pigmentli olmayan mutantlar için tarama yapılmış, sonuç olarak, Thu üretimi için gerekli olan iki geni (*berA* ve *berB*) barındıran bir genetik lokus tespit edilmiştir [48].

2004 yılında aynı araştırmacılar, bir gen kümesinin karakterizasyonunu ve transkripsiyonel analizini tanımlamıştır. *Bt* sbsp. *thuringiensis* 407-1 suşunda Thu üretimi için *sigW-ecfX-ecfY*'nin gerekli olduğunu belirttiler [49]. Toksik olmayan kültür supernatantlarında *sigW* dizisinin olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar, yabancı tür 407 (*cry*⁺) suşunda *thu*'nun bir *cry* geni taşıyan plasmid üzerinde bulunan belirleyicilerden üretildiğini ve *Bt*'de *cry* gen taşıyan plazmidlerin yokluğunda *sigW*'nin Thu üretimini indüklendiğini belirtmişlerdir [49].

1.11. Thuringiensin sentez genleri

Liu ve arkadaşları 2010 yılında, bakteri yapay kromozom kütüphanesinde heterolog ekspresyon rehberli taramayı kullanarak tüm *thu* için gerekli diziyi klonlamıştır [70]. *Thu* dizisi, *Bt* CT-43 suşunda *cry1Ba* içeren 110 kb'lik endojen bir plazmit üzerinde yer almaktadır [70]. Bu dizi 11 açık okuma çerçevesinden oluşur ve ayrıca genom dizilimi verileri ile doğrulanmaktadır (Şekil 9) [102].



Şekil 9. Tüm *thu* dizisi [70].

Bu nedenle, gen fonksiyonuna dayanarak, *thuC*'nin ve *thuD*'nin glikoz 6-fosfattan anahtar prekürsör glukonik diasidin (A öncüsü) sentezlenmesinden sorumlu proteinleri kodlayabileceğinin mümkün olduğu anlaşılmıştır [70]. *ThuF* ve *thu1*, *thu*'nun birleştirilmesinden sorumlu proteinleri kodlarlar [70].

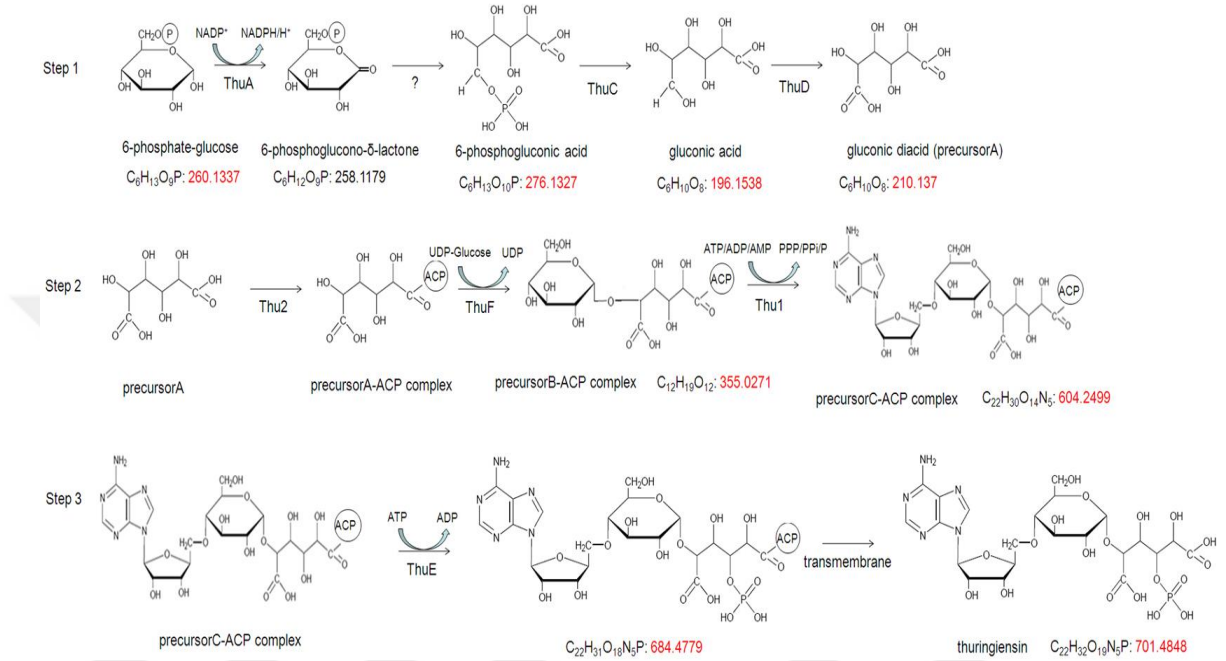
Bir adenilasyon (A) alanı, bir yoğunlaşma (C) alanı ve bir açıl taşıyıcı protein (ACP) domaini ihtiva eden tahmini *thu2* proteini *thu*'nun birleşme yeri olarak görev yapmaktadır [70]. *ThuE* geninin son olarak modifikasyonda (fosforilasyon) kullanılan enzimi kodladığı tahmin edilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* aktivite testleri ile *thuE*'nin β -ekzotoksin oluşumunun son basamaktaki fosforilasyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir [77] (Tablo 3.)

Tablo 3. *Thu* dizisindeki genlerin, tahmini fonksiyonları ve işlevleri.

Gen	Ürün	İşlevi
<i>thuA</i>	Glikoz-6-fosfat-1-dehidrogenaz	Aldehidi, karboksilik asite okside etmek
<i>thuB</i>	Racemase	Izomerin mutarotasyonu.
<i>thuC</i>	PEP-protein fosfotransferaz	Fosfat gruplarını aktarma
<i>thuD</i>	UDP-glikoz-6-dehidrogenaz	Monobazik asidin dibazik asite oksitlenmesi
<i>thuE</i>	Shikimate kinaz	Fosfat grupları ekleme
<i>thuF</i>	Glikoziltransferaz	Glikoz ekleme
<i>thuG</i>	N-açıl-d-glikozamin 2-epimeraz	Adenozin ekleme
<i>thu1</i>	Ekzopolisakkarit polimerizasyon proteini	Polisakkariti polimerize etme
<i>thu2</i>	Non-ribozomal peptid sentetaz	Birleştirme öncüsü
<i>thu3</i>	ABC taşıyıcı zar- aralayıcı permeaz	Fonksiyonu bilinmiyor
<i>thu4</i>	SAM-bağlı metiltransferaz	Modifikasyon

1.12. Thuringiensin biyosentez aşaması

Thu'nun biyosentez yolağı tahmin edilen gen fonksiyonlarına göre çıkarıldı (Şekil 10) [70].



Şekil 10. Thuringiensin biyosentez şeması [70]. Adım 1: Anahtar öncü molekül olan glukonik diasitin (precursor A) sentezi, *thuA*, *thuC* ve *thuD*; Adım 2: glikonik asit, glikoz ve adeninin *thuF* ve *thu1* tarafından birleştirilmesi; Adım 3: precursor C'nin ThuE tarafından fosforilasyonu [70]. Kırmızı yazılar moleküler ağılıktır.

Yapısal formül temelinde *thu*, dört öncüden türetilmiştir: adenosin, glikoz, bir fosfat grubu ve glukonik diasittir [70]. İlk aşamada, glukonik diasitin (precursor A) sentezi başlar ve bu nedenle, *thuC* ve *thuD* ürünlerini kullanır [70]. Başlangıçta substrat olan glikoz 6-fosfat, glikoz-6-fosfat 1-dehidrogenaz (*thuA*) tarafından 6-fosfogluco- δ laktone oksitlenir ve daha sonra 6-fosfoglikonik aside hidrolize edilir ve daha sonra 6-fosfoglukonik asitin defosforilasyonu bir PEP-protein fosfotransferaz (*thuC*) tarafından katalize edilir [70]. Elde edilen glukonik asit daha sonra, bir hidroksil grubunu doğrudan bir karboksil grubuna okside edebilen UDP-glikoz dehidrogenaz (*thuD*) tarafından glukonik diasit (precursor A) haline oksitlenir [70].

İkinci aşamada glukonik asit, glikoz ve adenin, ThuF ve Thu1 tarafından birleştirilir. İlk olarak, glukonik diasit, ribozomal olmayan peptid sentetaz Thu2'nin ACP bölgesine bağlanır [70]. Bir hidroksil grubu, Glukonik diasidin C-1'den kalan ACP proteini bir sülfhidril grubuyla bir tiyoester bağı oluşturur. Daha sonra, bir UDP-glikoz parçası, glikoziltransferaz ThuF tarafından glukonik diasit-ACP kompleksi üzerine ilave edilir ve glikoz ve glukonik diasit arasında 1,5-glikozidik bir bağ oluşur. Nihai ürün (precursor B), bir ekzopolisakkarit polimerizasyon proteini (Thu1) tarafından ATP/ADP/AMP'den adenosin ribozu ile polimerize edilir. Daha sonra, riboz ve glikoz arasında precursor C'yi üreten bir 4,5-glikozidik bağ oluşur. Sonunda, precursor C ACP'den bırakılır [70]. Üçüncü ve son aşamada, precursor C ThuE tarafından fosforile edilir. Olgun Thu molekülü hücre tarafından salgılanabilir [77].

1.13. Thuringiensin tipleri

High-performance liquid chromatography (HPLC) yöntemi ile thuringiensinin iki tipi belirlenmiştir [102]. Tip I thuringiensin düşük molekül ağırlıklı olup yaklaşık 701 Da ve adenosin glikoz, bir fosfat grubu ve glukonik diasitten oluşmuş bir karışıma sahiptir [77,103]. Uzun yıllar boyunca, thuringiensin I'in, bu nükleotide büyük yapısal benzerlik gösteren adenin nükleotidine benzeyen bir molekül olduğuna inanılmaktaydı [82,104, 105]. Ancak yakın zamanda Liu ve ark., (2010), aslında adenin nükleozitten bir oligosakkarit olduğunu ileri sürmüştür [77]. Adenine benzerliği nedeniyle, thuringiensin I'in toksisitesi, genetik bilginin transferinde anahtar enzim olan RNA polimeraz biyosentezinin inhibisyonu ile açıklanmıştır. Bunun nedeni, bu ekzotoksin, polimeraz reaksiyonunun polimerizasyonu aşamasında, ATP ile bağlanma yerlerinde rekabete girmesidir [89,106]. Daha spesifik olarak thuringiensin I ATP'nin spesifik bölgesine adenosinin bir kısmını (polimer içine katılmaksızın) tersine çevirerek bağlanabilir [104]. Fareler ile yapılan deneyde RNA polimeraz sentezinde azalma görülmüştür. RNA polimeraz sentezi tüm canlılarda temel işlem olduğundan thuringiensin I hemen hemen tüm canlı organizmalar için toksiktir [107].

Levinson ve ark. [101], *Bt* subsp. *thuringiensis*, *Bt* subsp. *tolworthi* ve *Bt* subsp. *darmstadiensis* suşlarının thuringiensin I üretimini kodlayan genin plasmidlerde kodlandığını belirtmiştir. Ozawa ve Iwahana [108], ekzotoksin üretiminin *Bt* subsp *darmstadiensis*'in suşunda 62-Mdal bir plazmit ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar

sağlamıştır. Fakat *Bt* suşlarının thuringiensins I üreten plazmitleri her yerde bulunmadığı gibi başlangıçta bir ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcının bu ekzotoksini salgıladığı ve üretimi ile ilgili olabileceğine inanılıyordu [48]. Thuringiensinler ile ilgili araştırmalar insektisit aktivitesini ölçmek için saflaştırma stratejileri üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü biyosentezinde yer alan genetik belirleyiciler üzerine yapılan çalışmalar halen azdır [77]. Son zamanlarda thuringiensin I salgısı içeren ABC taşıyıcılarında homolog *thu3* geni keşfedildi [77]. Ekzotoksin sentezleyen genler Cry1Ba proteinlerini sentezleyen genlerin yanısıra 110 kb'lık dairesel endojen plazmit gen kümesini barındıran genler tarafından da kodlanır [77].

Daha spesifik olarak, thuringiensin biyosentezinde, *thuA*, *thuC* ve *thuD* genleri, glikoz-6-fosfattan bir glukonik diasit (öncü A) olan öncü anahtar toksinin sentezinden sorumlu proteinleri kodlar [109]. *thuF* ve *thu1* genleri thuringiensin I de toplanan proteinleri kodlar [109].

Bazı çalışmalar, thuringiensin I üretiminin *cry* ve *vip1/vip2* genlerini de barındıran plazmidlerin varlığı ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir [101,110-112]. Yüksek miktarda thuringiensin I'in üretilmesinin, kristal protein CryIB'yi kodlayan geni taşıyan plazmidlerin varlığına bağlı olduğunu rapor etmiştir [110,113]. Ancak crystal üretmeyen *Bt* suşları da thuringiensin I üretebilir. *Bt* 407-1'in (Cry-) mutant suşu buna örnektir [109]. Bu nedenle, thuringiensin I'in üretimi, *cry* genleri içeren plazmidleri kaybeden bir kolonide bile ortaya çıkabilir [110]. Bu endojen plazmitlerin thuringiensin I kodlayıcılarının konukçu-parazit ilişkisi yoluyla böceklerle birlikte evrimleşerek, yatay gen aktarımı ile edinildiğine inanılmaktadır [109]. Eşsiz bir genetik kaynağı temsil etmek ve adaptif genetik havuzun bir parçası olarak konakçı hücrelerde *Bt*'in evriminde ve biyolojide önemli bir rol oynayabilir [29]. Levinson ve diğerleri, aynı zamanda *Bt* subsp. *morrisoni* suşunda bulunan başka bir tip II thuringiensin türünü tanımladı [101]. Tip II thuringiensin, urasil (UTP) ile benzer olup esas olarak Coleoptera'ya karşı tip I'e göre daha fazla etkilidir [30,77,89].

Tip II thuringiensin üreten suşlar plazmidlerinde çoğunlukla *thuE* geni bulundurmazlar [114]. Bu toksin türü hakkında az sayıdaki çalışmadan dolayı, yapısı henüz bilinmemektedir [79,115].

1.14. Thuringiensin üretimi

Belirli çevre şartlarına göre thuringiensin üretimi gerçekleşebilir [48]. Bazı araştırmacılar bu sekonder metabolitin, sporulasyon genlerinin transkripsiyonel kontrolünden sorumlu moleküler sinyal görevi görebileceğine inanmaktadır [116]. Daha önce belirtildiği gibi, thuringiensin üretimi, büyük plazmidlere bağlıdır [101]. *Bt*'nin herhangi bir suşunun herhangi bir serotipinin, thuringiensinleri konjugasyon sürecinde kodlayan bir plazmid elde edebildiği gösterilmiştir [79]. Bundan dolayı, bazı araştırmacılar, thuringiensin üretiminin, *Bt*'nin bazı serovarları ile sınırlı spesifik bir özellik olmaktan ziyade, suşlara özgü bir özellik olduğunu iddia etmiştir [2,88,117-119].

Bt suşlarının serotipleriyle, thuringiensin üretimini belirlemek güçken, bu ekzotoksinin serotipleri ile üretimin arasında güçlü bir korelasyon vardır [120]. Başka bir deyişle, ortak üreticiler olarak kabul edilen *darmstadiensis*, *thuringiensis* veya *tolworthi* serotiplerine ait suşlar, bu metabolitin nadir üreticileri olarak sınıflandırılan serovar *alesti*, *sotto*, *aizawai* ve *morrisoni*'ye ait olan suşlara kıyasla daha beta-ekzotoksin üretimi daha fazladır [115]. Literatürde, en az 13 *Bt* serotipinde thuringiensinlerin üretildiği bildirilmiştir [109] (Tablo 4).

Tablo 4. *Bacillus thuringiensis* serovarlarının ürettiği thuringiensin tipleri (tip I ve II).

<i>Bt</i> serovarları	Thuringiensin tipleri	Referanslar
<i>darmstadiensis</i>	I	[88,101,107,115,117,121]
<i>galleriae</i>	I	[107]
<i>israelensis</i>	I	[79]
<i>kenyae</i>	I	[75,79,117]
<i>kunamotoensis</i>	I	[88]
<i>kurstaki</i>	I	[75,79,101]
<i>morrisoni</i>	I-II	[101]
<i>pakistani</i>	I	[79]
<i>tenebrionis</i>	I	[109]
<i>thuringiensis</i>	I	[75,101,107,115,121-124]
<i>tohokuensis</i>	I	[79]
<i>tolworthi</i>	I-II	[88,101,121,124]
<i>toumanoffi</i>	I	[88,115,117]

1.15. Thu'nun salınımı ve savunma sistemi

Thu kümesi barındıran plazmid üzerinde 4 benzeri salgı sistemi (T4SS) bulunmuştur. *Thu*'nun salgılanmasında T4SS'ler ve Thu3 görev aldığı belirtilmiştir [70]. *Thu* kümesinde *thuE* geni thuringiensinin son aşamasında forforilasyondan sorumludur. Bu olay membran translokasyon işleminin son basamağında gerçekleşir. Olgun thuringiensin, Thu3 ve T4SS kombinasyonu sırasında çıkarıldığında hedef hücrenin Thu'nun olası zararlarından korunduğu görülmüştür [77].

1.16. Thuringiensin'in toksisitesi

Thuringiensin, dünyanın en önemli hastalık vektörleri, tarımsal zararlılar (Lepidoptera, Coleoptera ve Diptera) ve nematod türlerine karşı geniş spektrumlu spesifik olmayan bir etki etki göstermektedir (Tablo 5) [109]. Thuringiensinlerin etki biçimi, δ -endotoksin'in etki tarzından oldukça farklıdır [125,126,127]. Böcek hücrelerinin protein sentezini inhibe etmek için 2 mM ekzotoksinin yeterli olabileceği belirtilmiştir [128]. Dahası, bazı nematod türlerinde bu ekzotoksin gelişme aşamasından bağımsız olarak ölümcül etki gösterebilir. Bu nedenle hayat evresinin tüm aşamalarında etki gösterebilir [106].

Tablo 5. Thuringiensin'in tarım zararlılarına karşı toksik etkisinin sınıflandırılması.

Taksonomi	Öldürücü etkisi	Referanslar
Coleoptera	Larvalara mutajenik ve teratojenik etki	[48,75,93,129,130]
Diptera	Yetişkin larvalara mutajenik ve teratojenik etki	[86,88,105,101,118,124,131-145]
Lepidoptera	Larvalara teratojenik etki	[88,121,146-152]
Nematod	Üreme oranlarını azaltır	[153,154,155]

1.17. Thuringiensin'in hedef olmayan organizmalara karşı toksisitesi

Thuringiensin'in *Apis mellifera*'ya karşı etkisi incelenmiş ve yüksek dozların 7 gün içinde %100 ölüme neden olduğu belirtilmiştir [156]. *Allium cepa* (soğan) kök meristem hücreleri ile testler yapılmış ve iğ iplikleri ve sitokinez oluşumunu inhibe ettiği

belirtilmiştir [157]. Sonuç olarak ekzotoksinlerin esas hedefinin kromozomlara ve mikrotübül sistemlerine karşı olduğu idda edilmiştir.

1.17.1. Thuringiensin'in memelilere ve diğer canlılara karşı toksisitesi

Thuringiensinlerin omurgalı canlılar üzerindeki etkileri damar içi, deri altı, intraperitoneal enjeksiyonlar, mutajenite testleri ve insan kan kültürleri ile memelilerde güvenlik testleriyle sağlanmıştır [109]. İnsan kan ve kemik iliği hücrelerinin kültürlerini kullanarak çeşitli testler uygulanarak sitolojik etkisi kanıtlandıktan sonra in vitro işlem ile thuringiensinlerin akut ve kronik etkileri ortaya çıkmıştır [158]. Birkaç araştırmacı tarafından memelilere toksisitesi olduğu rapor edilmiştir [152,159,160].

Böceklerde ve memelilerde thuringiensinlerin toksisitesinde önemli bir fark olduğu sonucuna varmak mümkündür [109]. Intraperitoneal yolla toksin verilen farelerin idrarında thuringiensinler değişmeden atılmıştır [104]. β -ekzotoksinler farelerin dokularında birikmemiştir [104]. Thuringiensinlerin intraperitoneal yol ile uygulanmasının oral yolla uygulanmasına göre daha toksik etki gösterdiği doğrulanmıştır [30,105,149]. Birçok çalışma thuringiensin'in yüksek dozda uygulandığında zararlı olduğunu kanıtlamış olsada düşük dozlarda zararlı olmadığını ortaya koyan çalışmalarda vardır [161].

Farelerde gözlenen thuringiensinlerin tüm yan etkilerine rağmen, *Bt* kaynaklı insanda gıda zehirlenmesine ilişkin sadece bir rapor vardır [162]. Ancak, gastroenterit oluşturabilen fırsatçı bir insan patojeni olan *Bt* ve *Bc* suşları arasında farklılaşma olmadığından dolayı yetersiz temsil edildiği düşünülmektedir [163].

Devidas ve Rehberger [164], *Bt*'den alınan iki ekzotoksin formülasyonunun yanı sıra kısmen saflaştırılmış bir formülasyonun nematisidal aktivitesi değerlendirmiş, bu değerlendirilmede kullanılan yöntemler doğrudan temaslı nematisid testler, kuluçka testleri, enfeksiyon testleri tohum torbalarında hıyar / kök-ur nematodu (*Meloidogyne incognita*) ve serada kök-ur nematodunu kullanarak test yapılmış, *M. incognita* yavrularına kontakt nematisit aktivitesi gözlenmemesine karşın, test organizması olarak *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanıldığında %100 ölüm meydana geldiği görülmüştür. Tohum torbası tahlilindeki nematod enfeksiyonu değerlendirmeleri nispeten yüksek konsantrasyonlarda ($> 10 \text{ mg kg}^{-1}$) kök küçülmesini azalttığını

gözlemlemiştir. Ayrıca araştırmacılar serada yapılan analizlerde toprak popülasyonunda kayda değer azalma gözlemlemiştir ve uygulanan materyal miktarı ile ilgili gal sayılarında, larvaların toprak / köklerden ve bitki büyüme parametreleriyle ilişkili olarak kontrol derecesi yeterli olmamıştır.

Normand ve ark. [165], standartlaştırılmış spor ve *Bt* HD-1 suşu ile β -ekzotoksin karışımlarını içeren yapay bir diyetle beslenen *Lymantria dispar* (çingene güvesi) larvalarına karşı sinerjik etki ortaya koyduğunu gözlemlemiştir. 5 gün maruz kaldıktan sonra *Bt*'in LC_{50} değeri %0.01 ve %0.02'lik β -ekzotoksin ile karıştırılmış ve tek başına *Bt*'ninkinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlenmiştir. Uygulama süresi 7 güne çıkarıldığında, larvaların *Bt*'ye karşı duyarlılığı %0.001 β -ekzotoksinin ilavesiyle birlikte belirgin bir artış göstermiştir.

Shoushtari ve ark. [166] *Bt berliner*'in β -ekzotoksin (thuringiensin) 'in *Tetranychus urticae*'nin farklı evrelerine (üreme ve popülasyon gelişimi) direkt toksisitesi laboratuvar koşullarında değerlendirmişlerdir. *T. urticae*'nin olgunlaşmamış evreleri thuringiensin'e yetişkinlerden daha fazla duyarlı olduğu belirtilmiştir. Dişilerde 3 gün süreyle kalıntılara maruz bırakıldıklarında *T. urticae*'nin üremesini önemli ölçüde azalmıştır. LC_{50} 'de, larvalar ve protonimfler, thuringiensin için deutonymiflerden ve yetişkinlerden önemli derecede daha hassastır ve thuringiensinin, yumurta evresine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Larva, protonimf, deutonym ve erişkinlerde LC_{50} sırasıyla 148, 176.6, 293.4 ve 318.5 ppm olduğu belirtilmiştir. Günlük yumurtalar, β -ekzotoksinin altı konsantrasyonu arasında önemli farklılıklar sergilemiştir. Tüm konsantrasyonlar için kuluçkalık yumurta yüzdesinde önemli fark olmadığını gözlemlemiştir. Aynı zamanda *T. urticae* için üremenin azalması en fazla %75 (500 ppm'de) olarak belirtilmiştir.

Herbert ve ark. [167] *Bt*'in β -ekzotoksinin, 1., 3. ve 4. instar *Heliothis zea* larvaları üzerinde biyolojik olarak inceleme yapmış, larvaların, 1-700 μg AI / ml diyet konsantrasyonlarında ölümcül doza 7 gün sonra yanıt verdiği görülmüştür. Bu iki değerlendirmede 1. 3. ve 4. instar larvaların LC_{50} değerleri sırasıyla 4.9, 134.6 ve 286.2 μg AI / ml ve diyet konsantrasyonları sırasıyla 4.0, 17.6 ve 66.4 μg AI / ml olarak belirtilmiştir. Gelişme döneminden sonraki 7 günde larvalar arasındaki farklılıklar daha belirgin olmuştur. Doz artışının ölüm oranını yükselttiği gözlemlenmiş, β -ekzotoksin

zehirlenmesinden 3. ve 4. instar larvaları sırasıyla %19 ve %38 oranında hayatta kalmıştır.

Young T.K. ve ark. [168] *Bt* fermantasyonu ile ısıya dayanıklı β -ekzotoksin saflaştırılmasıyla 9 ng β -ekzotoksin ile larva başına 280 mg olgun larvaya enjekte edildiğinde olgun lahana tırtılı (*trichoplusia ni*) ağız kısmında deformasyonlar olduğu gözlemlenmiş ve larvaya 26 ng β -ekzotoksin enjekte edildiğinde olgun larvaların %50'sinin ağız kısmında deformasyonlar olmuştur. β -ekzotoksin varlığı ile protein ve nükleik asit sentezinin inhibe edildiği gözlemlenmiş ve spesifik olarak ^{14}C -valin, ^{14}C -urasil ve ^{14}C -timidin proteinlerinin RNA ve DNA ya katılmasını engellediğini gözlemlemişlerdir. Her bir larvada 30 $\mu\text{g}/\text{lt}$ β -ekzotoksin enjeksiyonundan 120 dakika sonra inhibisyon yüzdesi %53(protein), %36(RNA) ve %41(DNA) olarak gözlemlemişlerdir. Sentezin inhibe olmasının enjeksiyondan yaklaşık 30 dakika sonra gerçekleştiği belirtilmiştir

Lewis L.C. ve ark. [169] *Bt*'in altı alt türü tarafından üretilen spor-kristal komplekslerinin ve termostabil β -ekzotoksinin aktif olarak ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Mısır kurdu *Ostrinia nubilalis*'in larvaları kullanılarak yapılan araştırmada *Bt* subsp. *Kenya*, *Galleriae* ve *Kurstaki* aktif spor-kristal kompleksleri ürettiği belirtilmiştir. Buna karşılık *Bt* subsp. *thuringiensis* ve subsp. *darmstadensis*, *Ostrinia nubilalis*'in larvalarına karşı aktif olarak termostabil β -ekzotoksin ürettiği belirtilmiştir. *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*'nin hem spor kristali kompleksi hem de mısır kurdu larvalarına karşı etkili bir termostabil β -ekzotoksin ürettiği belirtilmiştir.

1.18. Thuringiensin (β -ekzotoksin) etki mekanizması

Defosforile ekzotoksin enzim preparatı, bu bileşiğin biyolojik olarak inaktif olduğunu göstermiştir [82,170,171]. β -ekzotoksin yılan zehiri fosfatazlarına karşı dirençlidir [100]. Bütün haldeki ekzotoksin, sadece bazı böcek türleri için değil, aynı zamanda memeliler içinde toksik etkisi vardır [99]. Ekzotoksinin RNA sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir [172,173].

Daha ayrıntılı bir çalışmadan sonra inhibitör etkinin DNA bağlı RNA polimeraz tarafından katalize edilen polimerizasyon reaksiyonunda görüldüğü bildirilmiştir [100].

İnhibisyon spesifik olup ekzotoksin sadece ATP ile rekabet eder ve ek olarak diğer nükleotidlerin eklenmesi inhibisyonu etkilemez [82].

RNA polimerizasyonunun ardışık süreçleri şu şekildedir [89]:

1. DNA matrisinin enzim ile birleşmesi;
2. Stabil bir 5'→ 3' bağı oluşturarak zincir başlatma;
3. Zincir uzaması;
4. Sentezlenmiş poliribonükleotid zincirinin matristen salınması.

Ekzotoksinin etki mekanizmasının daha ayrıntılı bir karakterizasyonu için iki türevi hazırlanmıştır. Bunlar inozin-ekzotoksin ve N¹-oksit ekzotoksindir. [82]. Ekzotoksinin N¹-oksidasyonunun adenin kısmı toksisite kaybına yol açmış ve inosin-ekzotoksin ATP ile azaltılmamış ancak GTP ilavesiyle azaldığı belirtilmiştir [99]. Böylece polimerizasyon tepkimesinin inhibisyonuna neden olur [99]. Farklı konsantrasyonlarda ve devam eden RNA polimerizasyon reaksiyonunun farklı zaman aralıklarında ATP'nin eklendiği diğer deneyler, ekzotoksinin başlangıç reaksiyonunu büyük ölçüde etkilemediğini ve zincir uzamasını geri dönüşümsüz olarak engellemediğini ortaya koymuştur [99]. Şimdiye kadar elde edilen sonuçlara dayanarak, ekzotoksin, ATP ile yapısal benzerliğinden ötürü, adenin kalıntısıyla DNA-enzim kompleksinin ATP spesifik alanına bağlandığı varsayılabilir [82,104]. Molekülün asidik (allarik) kısmında değiştirilen ekzotoksin türevlerinin ve analoglarının uygulanması, bu bileşiklerin polimerazın modifikasyon türüne bağlı olarak farklı ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuştur [174]. Iandolo ve ark. *Bt*'in sporlarında polimeraz inhibitörünün varlığından bahsetmiş ancak ekzotoksinin varlığından bahsetmemiştir [175].

1.19. Thuringiensin içeren böcek öldürücü ilaçların yasaklanması

Formülasyonunda thuringiensin içeren biopestisidler, Bitoxibacillin [176], Muscabac [85] veya Thuricide [177] gibi biyopestisitler *Bt* subsp. *thuringiensis*, *M. domestica* larvalarını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmıştır [139,140], ayrıca domuz ahırları ve mezbahaları istila eden sinekler içinde kullanılmıştır [145,158,178]. Ancak, thuringiensin'in farelerde öldürücü olduklarını belirttiğinden [173], bu toksinin ticari kullanımı eleştirilmeye başlanmıştır. Bundan dolayı memelilere karşı potansiyel toksik

etkisinden dolayı biyolojik mücadelede kullanım alanı sınırlandırılmıştır [78]. 1999 yılından bu yana, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) *Bt*'nin *thuringiensis* üreten suşlarını biyo-pestisit formülasyonunda kullanmamayı önerdi [33,103,107,163,177,179,180].

Bu nedenle biyolojik pestisitlerin kullanımı *Bt*'nin yeni suşlarını seçerken *thuringiensis* üretiminde sınırlayıcı faktör olmuştur [181]. Yeni bir entomopatojen mikroorganizma biyolojik mücadele uygulamalarında kullanım için bir aday olarak sunulduğunda, hedef olmayan organizmalar üzerindeki etkisi araştırılmalıdır [156]. Bu nedenle, bu istenmeyen ekzotoksinleri tespit etmek için testlerin yapılması önerilir ve eğer organizmanın bunları üretebileceği düşünülürse, bunların risk dozlarında bulunmadığından emin olunmalıdır [107]. Çevresel performansın ve güvenliğin değerlendirilmesinde bir diğer önemli faktördür, ek olarak fizyolojik toksite *thuringiensis*'inin stabilizesine bağlıdır [62]. Başlangıçta, birkaç yazar bu ekzotoksinlerin çevrede oldukça kalıcı olduğunu bildirmiştir [149,171,172]. *Thuringiensis*lerin UV ışınlarına maruz kalarak bozunmadığını [183], ancak yakın zamanda bu ekzotoksinin sulu çözeltide kararsız olduğunu ve toksit olmayan bileşikler içinde bozunabileceğini ve biyotik, fiziksel ve kimyasal değişikliklerle özellikle pH ve sıcaklık açısından güçlendirilebilir olduğunu gözlemlemişlerdir [78]. Bu araştırmacılara göre, *thuringiensis*ler simüle edilmiş çevresel koşullar altında oldukça kararsızdırlar. Sulu fazda yaklaşık 2.72 ila 19 gün arasında yarı ömre sahiptirler (diğer çevre kirleticilerinden önemli ölçüde daha kısa) ve diğer mikroorganizmalar olmadan %99 oranında bozunabilirler [109]. Bu veriler, bu toksinin güvenlikle ilgili endişelerini azaltabilir.

1.20. *Thuringiensis*lerin tesbiti için uygulanan prosedürler

*Thuringiensis*lerin ilk saflaştırma yöntemleri için santrifüj işlemleri uygulanmıştır [185], ardından CaCl_2 ile çökelme yöntemi [185], 367 setilpiridinyum klorür (SPK) surfaktan ile miselle desteklenmiş ultrafiltrasyon yöntemi [186], fermentasyonun ortasında ayrışma için kalsiyum silikat ve sodyum fosfat dibazik ile fiksasyon, ardından high-performance liquid chromatography (HPLC) ve çözeltiden fazla tuzları uzaklaştırmak için elektrodiyaliz veya süpernatana aseton ve asetonitril eklenerek çökeltmesini sağlama bunlardandır [187,188].

Ultrafiltrasyon içeren yöntemler çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bunlar maliyeti yüksek, etkinliği düşük ve uzun zaman almaktadır [188]. 2001 yılında, Gohar ve ark. tarafından önerilen bu yöntem ile çok düşük seviyelerde thuringiensin ($0.3 \mu\text{g/ml}$) tespit edilebiliyor ve bundan dolayı en çok kullanılan yöntemdir [188]. Thuringiensinlerin tespiti için en geleneksel yöntem, toksisiteye bağlı biyolojik tahlillere dayanır [117,188]. *Musca domestica* larvaları gibi ekzotoksine o kadar çok duyarlıdır ki normal yetişkinleri maruz kaldıktan sonra gelişme göstermezler ve bu organizmalar ile yapılan biyolojik tahliller β -ekzotoksinlerin tanımlanması için kullanılabilir [103,122,159,189]. Öte yandan bazı yazarlar thuringiensin tesbiti ve miktarını belirlemek için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Fakat bu yöntem 9 gün sürdüğü için zaman alıcı olması, spesifik olmaması, örneklerde yabancı maddeler olmasından dolayı hatalı tahminlerin olması nedeniyle biyolojik analizlere alternatif yöntem olarak kullanılır [77,115,190,191]. Thuringiensinlerin HPLC ile tesbit limitleri 0.1 ile $10 \mu\text{g/mL}$ arasındadır [192]. Ancak HPLC direk olarak toksiteyi değerlendirmez, yanlış sonuçlar verebilir ve pahalı ekipmanlardır [103,117]. Buna karşılık ELISA yöntemi HPLC'den daha hassastır ve 0.1 ng/mL ye kadar miktarı belirlenebilir. [77]. Liu ve ark., çok düşük konsantrasyonlarda bile, thuringiensinleri tesbit etmek ve ekzotoksinlerin niceliğini belirlemek için liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) yöntemini kullanmışlardır [77]. Sauka ve ark., thuringiensin senteziyle alakalı olan *thuE* geninin tesbiti ile thuringiensin I üretimini hızlı bir şekilde tahmin etmek için PCR yöntemini önermiştir [114]. PCR tekniğine ek olarak iyon değişim kromatografisi, spektrofotometri, misel elektrokinetik kılcal kromatografisinde kullanılabilir [101,191,192].

2. BÖLÜM

YÖNTEM ve MATERİYAL

2.1. Materyaller

2.1.1. Çalışmada kullanılan *Bacillus thuringiensis* suşları

Toplam 81 adet standart ve yerel *Bacillus thuringiensis* suşu Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji araştırma laboratuvarında bulunan stok kültürden aktiveleştirilerek kullanılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Aktiveleştirilen *Bt* suşları.

Sıra No	İzolat	Sıra No	İzolat
1	Sy 76	43	Sy 24
2	Sy 68	44	Sy 26
4	Sy 2.1.a	45	Sy 30
5	Sy 49.1.3	46	Sy 48.2.2
6	Sy 95	47	Sy 9
7	Sy 25.1	48	Sy 110
8	HD 125	49	Sy 21
9	Sy 60	50	Sy 140
10	Sy 126	51	Sy 56
11	Sy 66	52	Sy 136
12	Sy 23	53	Sy 98
13	Sy 79	54	Sy 59.5
14	Sy 5.1.1	55	Sy 2.2b.2
15	Sy 62	56	Sy 59
16	Sy 78.2.b	57	Sy 55
17	Sy 52	58	HD 1
18	Sy 90	59	HD 916
19	Sy 19	60	Sy 10
20	Sy 63	61	Sy 56
21	Sy 10	62	Sy 40
22	Sy 40	63	Sy 29
23	Sy 45.1	64	<i>Bt tenebrionis</i>
24	Sy 54	65	<i>Bt kurstaki</i>
25	Sy 57	66	Sy 73.2

Tablo 6. Aktifleştirilen *Bt* suşları (Devamı).

26	Sy 116	67	Sy 79.b
27	Sy 46	68	Sy 48
28	Sy 27.1	69	Sy 58.4
29	Sy 58.2	70	Sy 27.3
30	Sy 15	71	Sy 73.3
31	Sy 61	72	Sy 35.1
32	Sy 69.4	73	Sy 62.1.a
33	Sy 28.5	74	Sy 49.1
34	Sy 7	75	Sy 33.3
35	39.2	76	Sy 65.1.b
36	Sy 70	77	<i>Bt israelensis</i>
37	Sy 71	78	Sy 1.1.5
38	Sy 5	79	Sy 38.4
39	Sy 61.b	80	Sy 26.3
40	Sy 72	81	Sy 59.3
41	Sy 43		
42	Sy 6.2.c		

2.1.2. Çalışmada kullanılan primer çiftleri

Bt suşlarında β -ekzotoksin kodlayan genlerin belirlenmesi için yapılan PCR işlemlerinde Tablo 7 ve Tablo 8’de verilen primer çiftleri kullanılmıştır.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan *thu* dizisi primerleri ve özellikleri

Gen	<i>thu</i> Dizisi	Primerler	Boyut (bp)	Pozisyonu	Tm (°C)	Referans
<i>Thuringiensis (thu)</i>	<i>thuB</i>	F 5'-CGTGCGATACTCACATAC-3'	-	-	43 °C	[193]
		R 5'-GCTAACTAAGCGTTCTACT-3'				
	<i>thu4</i>	F 5'-GGCGCTTCCTATGAACATGC-3'	417	6361-6380 6777-6758	49 °C	Bu çalışmada dizayn edildi
		R 5'-ATAGCGCGCTTGTGTTGTTG-3'				
	<i>thuE₁</i>	F 5'-GCGGCAGCCGTTTATTCAAA-3'	406	373-778	51 °C	[114]
		R 5'-CCCCTTCCCATGGAGAAACA-3'				
	<i>thuE₂</i>	F 5'-CAGTAAAAGGCCCATTTGGAA-3'	385	263-647	46 °C	[114]
		R 5'-TTCCATGAATTTGCCGATTT-3'				

Tablo 8. *cryII* primeri ve özellikleri

Gen	Primer	Boyut (bp)	Pozisyon	Tm (°C)	Referans
<i>cryII</i>	F 5'-AACACTCAGTATATGAAT-3'	378	1059–1374	57 °C	[110]
	R 5'-CACATGTGATGCTGAAAT-3'		1437–1419		

2.1.3. Çalışmada kullanılan besi ortamları

Nutrient Agar (NA) besiyeri (pH 6.8±2): 1 lt distile su içerisinde 1 gr et özütü, 2 gr maya özütü, 5 gr pepton, 5 gr NaCl ve 15 gr agar olacak şekilde çözelti hazırlanıp 121 °C’de 15 dakika otoklav edilerek hazırlanmıştır.

2.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

- ✓ 10X Taq DNA polimeraz tamponu: 750 mM tris-HCl (pH 8.8), 200 mM
- ✓ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %0.1’lik tween 20
- ✓ MgCl_2 (25 mM)
- ✓ dNTPmix (10 mM)
- ✓ Taq DNA polimeraz (5 u/μl)
- ✓ Oligonükleotid primerler (Tablo 7 ve Tablo 8).

2.1.5. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

- ✓ Agaroz (%1): 2 gr
- ✓ Tris-asetik asit EDTA (1xTAE) tamponu, pH 8.0 (50x/litre): 242 gr trizma bazı, 57.1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0),
- ✓ Tris-borik asit EDTA (TBE) tamponu, pH 8.0 (5x/litre): 54 gr trizma bazı, 27.5 gr borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0),
- ✓ Etidyum bromür (10 mg/ml).

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolatların yetiştirilmesi ve muhafazası

Topraktan izole edilmiş olan *B. thuringiensis* suşları Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Enzim ve mikrobiyel biyoteknoloji laboratuvarındaki stok kültürlerden aktifleştirilerek standart suşlarla birlikte kullanıldı. Bakteriler gerektiğinde kullanılmak üzere cryo tüplerde stoğa alınarak (800 μl sıvı LB, 200 μl gliserol) -80°C’de saklandı.

2.2.2. DNA izolasyonu

Bakteriyel kültürler Nutrient Agar besiyerinde, 37 °C de bir gece büyütüldü. Bir öze dolusu hücre steril distile suyla karıştırılıp -80 °C de 30 dakika bekletildi. Ardından kaynayan suda 10 dakika bekletildi. Daha sonra oluşan lizat 10000 rpm de 1 dakika santrifüj edilerek pellet uzaklaştırıldı. DNA miktarı nanodrop ile belirlendikten sonra, elde edilen süpernatant PCR analizlerinde DNA kalıbı olarak kullanılmıştır.

2.2.3. PCR yöntemi ile β -ekzotoksin geni taşıyan suşların belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinde Tablo 7 ve Tablo 8’de özellikleri verilen primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonları ile β -ekzotoksin geni taşıyanlar belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı Tablo 9. da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır;

Tablo 9. Her bir örnek için kullanılan PCR karışımı.

Bileşim	Hacim
dH ₂ O	16 μ l
10x Taq Buffer	2.5 μ l
2.5 Mm dNTP	2 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Taq DNA Polymerase	0.5 μ l
Kalıp DNA	3 μ l
TOPLAM	25 μ l

PCR programı aşağıdaki gibi ayarlandı;

95°C 5 dakika (Başlangıç denatürasyon aşaması)

95°C 0.30 dakika (Denatürasyon)	} 35 döngü
*54°C 1 dakika (Annealing)	
72°C 1 dakika (Uzama)	

72°C 5 dakika (Son uzama aşaması)

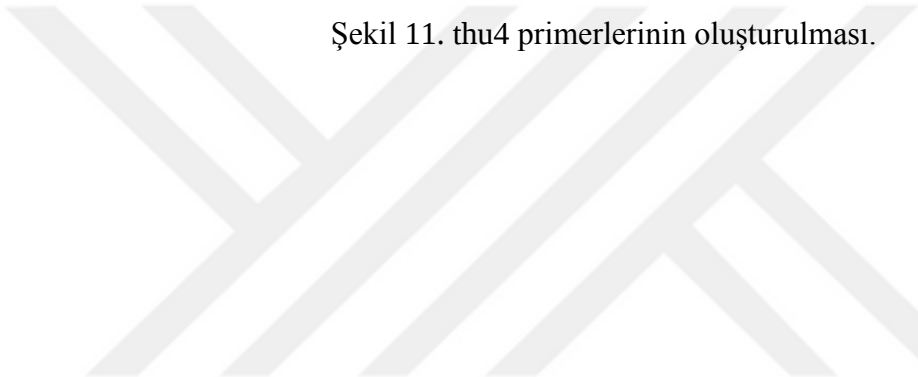
* Erime sıcaklığı her bir primer çifti için Tablo 7 ve Tablo 8’de belirtildiği şekilde ayarlanarak optimize edilmiştir.

2.2.4. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen ürüne 3 µl loading dye eklenip 25 µl alınarak agarose gel (%1) elektroforeziyle 100V’ta 90 dakika yürütüldükten sonra Biorad ChemiDoc MP ile görüntülenmiştir. DNA moleküler ağırlık marker’ı olarak 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, #SM0321) kullanılmıştır.

2.2.5. *thu4* primerinin oluşturulması

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web adresindeki veri tabanı kullanılarak NCBI referans sekans numarası: NZ_NTVS01000083.1 ve Protein ID numarası: WP 000551407.1 olan gen bölgesinden BLAST yöntemiyle primer dizileri belirlenmiştir. Şekil 11.’de gösterilen Primer 4 çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 11. thu4 primerlerinin oluşturulması.

3. BÖLÜM

BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji A.B.D Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilen toplam 81 adet *B. thuringiensis* bakterisine ait *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, HD125, HD1, HD916 standart suşları ve yerel suşlar kullanılarak β -ekzotoksin I (*thu*) dizisi olan *thuE*, *thuB*, *thu4* ve *cry1I* taşıyan genlerin belirlenmesi için Tablo 7 ve Tablo 8’de referansları ile verilen primerler kullanılarak PCR yöntemiyle tesbit edilip görüntülenmiştir.

75 adet *Bt* bakterisine ait yerel suşlar ile yapılan çalışmada *thuE₁*, *thuE₂*, *thu4*, *thuB*, *cry1I* genlerinin yüzdesi sırasıyla 53.33, 2.67, 2.67 ve 5.33 olarak tespit edilmiştir (Tablo 10). Yerel suşların 31 tanesinde (%41.33) *thu* geni tespit edilememiş olup bunlardan özellikle Sy27.3, Sy49.1, Sy62.1.A, Sy25.1’in daha önce yapılan çalışmalarda biyoassay denemelerinde etkili sonuçlar verdiği ve dolayısıyla biyopestisit geliştirilmesinde güvenli bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür.

Tablo 10. β -ekzotoksin ve *cry1I* geni bulunduran *Bt* suşları

Suşlar	<i>thuE₁</i>	<i>thuE₂</i>	<i>thuB</i>	<i>thu4</i>	<i>cry1I</i>
Sy 76	+				
Sy 68	+				
Sy 2.1.A					
Sy 49.1.3					
Sy 95					
Sy 25.1					
HD 125	+	+			+
Sy 60					+
Sy 126					
Sy 66					

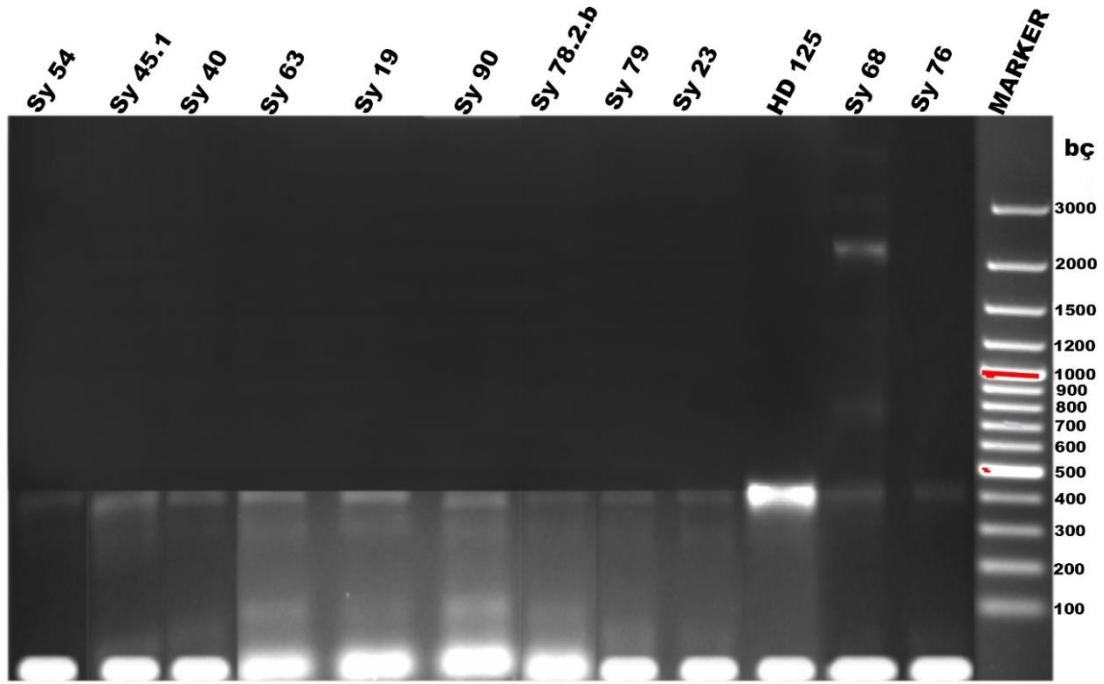
Tablo 10. β -ekzotoksin ve cry1I geni bulunduran *Bt* suşları (Devamı)

Sy 23	+				
Sy 79	+				
Sy 5.1.1					
Sy 62					
Sy 98					
Sy 52					
Sy 90	+				
Sy 19	+				
Sy 63	+				
Sy 78.2.b	+				
Sy 10					
Sy 40	+				
Sy 45.1	+				
Sy 54	+				
Sy 57					
Sy 116					
Sy 46	+				
Sy 58.2	+				
Sy 15	+				
Sy 61	+				
Sy 69.4	+			+	
Sy 67	+	+			
Sy 7	+				
Sy 28.5	+				
Sy 39.2.b	+				
Sy 70	+			+	
Sy 71	+				
Sy 5	+				
Sy 61.b	+				
Sy 72	+				
Sy 43	+				
Sy 6.2.C					
Sy 24	+				
Sy 26	+				
Sy 30	+				
Sy 48.2.2	+				
Sy 9	+				
Sy 110					
Sy 21					
Sy 140					
Sy 56	+				
Sy 136					
Sy 59.5					
Sy 2.2B.2					+
Sy 59					+
Sy 55					
HD 1					
HD 916					
Sy 10					
Sy 56					
Sy 40					
Sy 29		+			

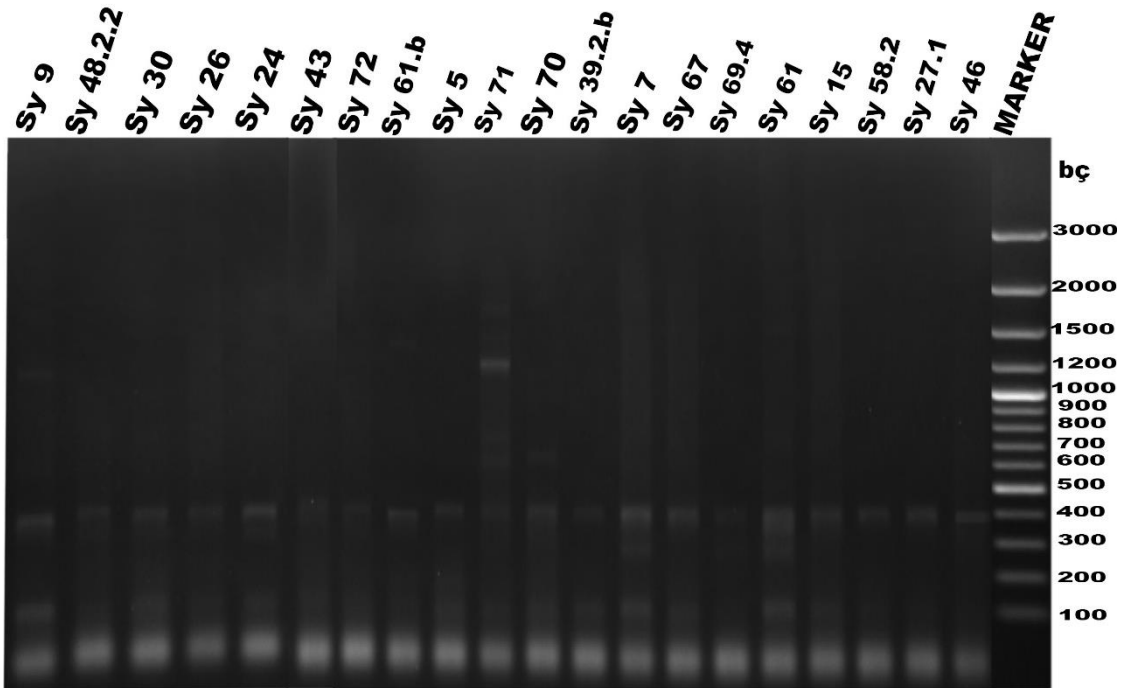
<i>Bt tenebrionis</i>	+				
<i>Bt kurstaki</i>	+				
Sy 73.2					
Sy 79.B					
Sy 48					
Sy 58.4					
Sy 27.3					
Sy 27.1	+				+
Sy 73.3					
Sy 35.1	+				
Sy 62.1.A					
Sy 49.1					
Sy 33.3	+				
Sy 65.1.B	+				
<i>Bt israelensis</i>	+				
Sy 1.1.5	+				
Sy 38.4	+				
Sy 26.3	+				
Sy 59.3	+				

3.1. thuE₁ primerleri ile yapılan PCR çalışmaları

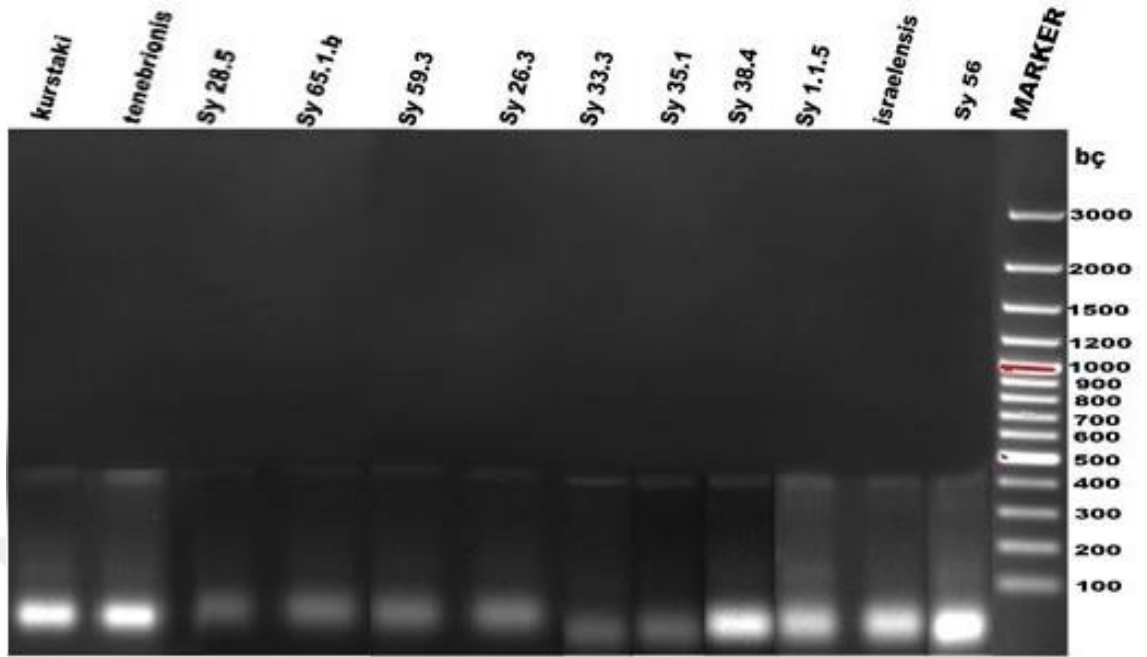
Bt var. tenebrionis, *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, HD 125, HD 1, HD 916 standart suşları ve diğer suşlarla Tablo 7. de belirtilen thuE₁ primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 V'da 90 dakika yürütülerek Şekil 12-14'teki görüntü elde edilmiştir. Yerel *Bt* suşlarının 40 tanesinin (%53.33) 400-410 arası bç oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 12. *thuE*₁ primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.



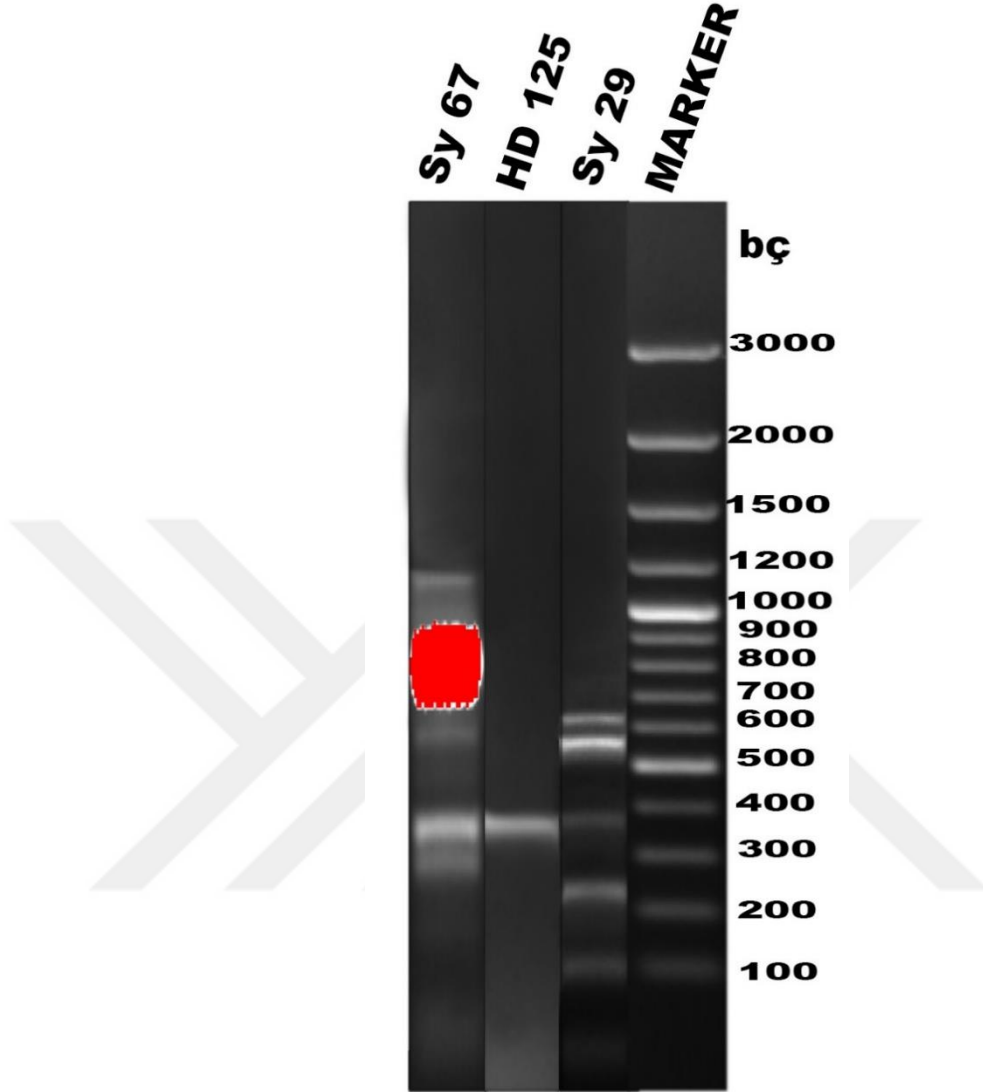
Şekil 13. *thuE*₁ primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.



Şekil 14. *thuE*₁ primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.

3.2. *thuE*₂ primerleri ile yapılan PCR çalışmaları

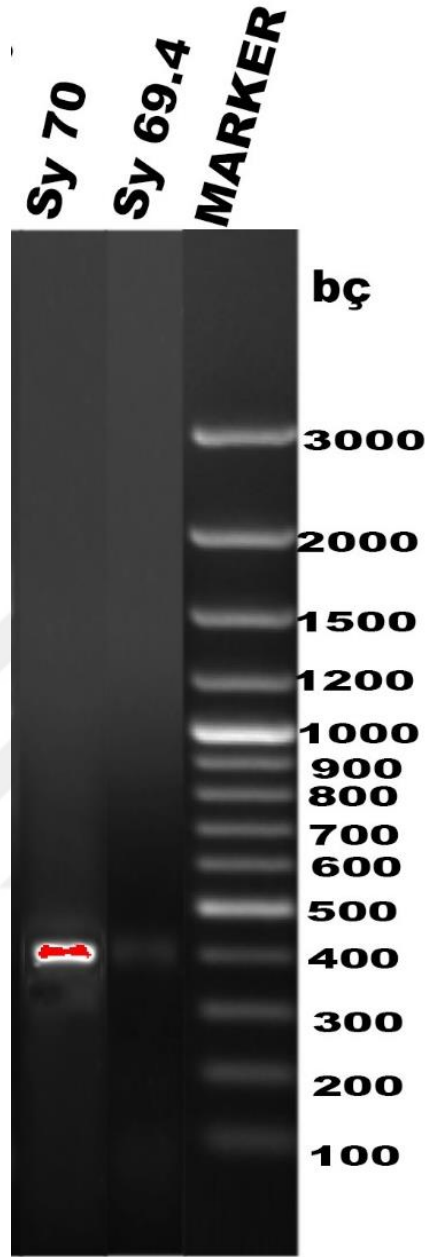
Bt var. tenebrionis, *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, HD125, HD1, HD916 standart suşları ve yerel suşlarla Tablo 7. de belirtilen *thuE*₂ primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 V'da 90 dakika yürütülerek Şekil 15.'deki görüntü elde edilmiştir. *Bt* Sy67 ve Sy29 suşlarının (%2.67) 380-400 arası bç oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 15. *thuE*₂ primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.

3.3. *thu4* primerleri ile yapılan PCR çalışmaları

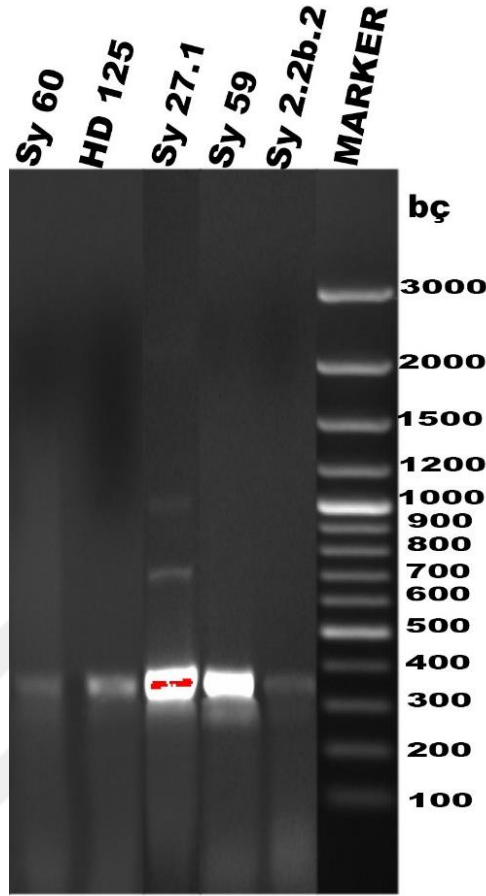
Bt var. tenebrionis, *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, HD125, HD1, HD916 standart suşları ve yerel suşlarla Tablo 7. de belirtilen *thu4* primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 V'da 90 dakika yürütülerek Şekil 16'daki görüntü elde edilmiştir. *Bt* Sy70 ve Sy69.4 suşlarının (%2.67) 400-450 arası bç oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 16. *thu4* primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.

3.4. *cry1I* primerleri ile yapılan PCR çalışmaları

Bt var. tenebrionis, *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, HD125, HD1, HD916 standart suşları ve yerel suşlarla Tablo 8. de belirtilen *cry1I* primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 V'da 90 dakika yürütülerek Şekil 17.'deki görüntü elde edilmiştir. *Bt* Sy27.1, Sy59, Sy60, ve Sy2.2b.2 suşlarının (%5.33) 350-400 arası bç oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 17. cry1I primerleri ile elde edilen PCR ürünlerinin %1' lik agaroz jel görüntüsü.

3.5. thuB primerleri ile yapılan PCR çalışmaları

Bt var. tenebrionis, *Bt var. kurstaki*, *Bt var. israelensis*, HD125, HD1, HD916 standart suşları ve diğer suşlarla Tablo 7. de belirtilen thuB primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100V'da 90 dakika yürütülerek fakat herhangi bir bant görüntüsü elde edilmemiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma

Mikrobiyel insektisitler kimyasal insektisitlerin kullanımına bir alternatiftir, çünkü insanlarda ve evcil hayvanlarda toksik etki göstermezler. *Bacillus thuringiensis* (Bt) gram pozitif bir bakteri olup Cry ve Cyt proteinleri üreten başlıca Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera larvalarına karşı toksisite gösteren çok başarılı bir mikrobiyal ajandır [194,195]. Bu proteinler, duyarlı böcek larvaları tarafından yutulduktan sonra alkali ortamda çözünürler ve enzimatik olarak aktif hale geçerler [196]. Daha sonra bu toksik proteinler, orta bağırsak hücrelerinde gözenekler oluşturarak ozmotik şoka ve hücre ölümüne neden olan belirli reseptörlerle etkileşir [197,198]. Alternatif olarak, *B. thuringiensis*'in bazı suşları β -ekzotoksin (thuringiensin) veya sinek faktörü olarak ta bilinen küçük bir termostabil toksin üretir [133,185]. Bu toksin ATP bağlanma bölgeleriyle rekabete girerek RNA sentezini inhibe edici özellik gösterir. Yani RNA polimerazı etkileyen bir adenin nükleotid analogudur [131,199]. β -ekzotoksin sentezinden sorumlu genler bir plazmid üzerinde kodlanır ve bir gen kümesinde organize edilirler [200].

Thuringiensin'in biyolojik mücadele çalışmalarında umut verici uygulamaları vardır. β -ekzotoksinler Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Hemiptera, Isoptera ve ayrıca çeşitli nematod türleri ve çeşitli akarlar dahil olmak üzere çok çeşitli böcek takımlarında toksik etkiye sahiptir [112,129,201,202]. Ancak, bu toksinin hedef olmayan organizmalara ve insan eritrositleride dahil omurgalılara karşı sitolitik ve hemolitik etkinliği vardır [79,107,112,179].

Buna rağmen bazı ülkelerde biyoinsektisit yapımında kullanılmıştır. Ağızdan uygulandığında, thuringiensinler çok çeşitli böcek türlerine karşı oldukça toksik etkiye

sahiptir [89]. Ölümcül olmayan dozlarda ise teratojenik etki gösterebilmektedir [48,75,93]. Bazı durumlarda larval dönemin süresini uzatabilir veya böceklerin ömrü ve doğurganlığını etkileyebilir [86]. Thuringiensinler ayrıca böcek larvalarının orta bağırsak hücrelerinin rejenarasyonunu engelleyerek onları zehirler [24]. Böcekler arasında Diptera takımı thuringiensine karşı daha hassas olup meyve sineklerine (*Drosophila melanogaster*) karşı mutajenik etkisinin olduğunda rapor edilmiştir [135].

Böceklerde ve memelilerde thuringiensinlerin toksisitesinde belirgin bir farklılığın olduğu bilinmektedir. Farelerde ortalama ölümcül doz (LD₅₀), *Galleria mellonella* larvalarına göre 30 kat daha yüksektir (Lepidoptera: Pyralidae) [149]. Yüksek konsantrasyonlarda, thuringiensinler memeli sistemlerinde hücre ve çekirdek zarlarını geçebilir. β -ekzotoksinlerin farelere uygulandığında nörotoksik, mutajenik ve teratojenik etki gösterdiği belirtilmiştir [151]. Ölümcül miktarlarda thuringiensin (10 ml/kg) enjeksiyonu, farelerde karaciğer rahatsızlıklarına, hücresel dejenerasyona, nekroza ve hepatik steatoza neden olabilir [151]. Farklı dozlardaki thuringiensin uygulamasının insan kan hücrelerinde kromozomal anormalliklere neden olduğu belirtilmiştir [161]. Farelerin serebral korteksinde enzim adenilat siklazın aktivitesi üzerindeki thuringiensinlerin etkisi değerlendirildiğinde [160], β -ekzotoksinin enzimi aktive edebildiği ve nöroendokrin sistemlerde çeşitli fizyolojik işlevlerin önemli bir aracı olan cAMP ile sinyal iletimini (adenosin 3'→5'-monofosfat) bozduğu rapor edilmiştir [109]. Thuringiensinlerin intratrakeal aşı yoluyla farelere etkisi pulmoner amfizemi, fibrozis ve ölüme yol açmıştır [203]. İntrakeal instilasyon ile thuringiensinlerin nörolojik bozukluklara ve akciğer hücrelerindeki bronşların uç noktasında hasarlara yol açabilen, polimorfonükleer nötrofillerin önemli bir infiltrasyonu ile yüksek derecede iltihaplanma etkisine neden olduğu, buna ek olarak, kollojen birikimi nedeniyle fibrotik özellikler gösterdiği belirtilmiştir [204].

Ancak thuringiensinler, enzimatik veya kimyasal olarak defosforile edildiğinde, biyolojik olarak pasif hale gelir [131]. Bu yüzden bu toksin memeliler tarafından alındığında gastrointestinal sistemde toksisite ile sonuçlanan enzimatik defosforilasyon meydana gelebilir [104,105]. Thuringiensinlerin insanlar üzerindeki toksisite dozunun 10⁵ hücre/g olabileceği varsayılmıştır [205]. Farelerde LD₅₀ değeri 170 mg / kg veya 5000 mg / kg'dan fazla oral olarak verildiğinde ya da intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde, thuringiensinlerin omurgalılarda vücut ağırlığına göre 13-18 mg / kg

olduğu ileri sürülmüştür [107]. Birçok *Bt* ürünü, omurgalılara hava yoluyla kolayca girebilmektedir. Farelerle yapılan çalışmalarda thuringiensin'in nefes yoluyla alındığında LC₅₀ değerinin 4 saatlik maruz kalma için 0.024-0.30 mg /L'nin üzerinde olduğu belirtilmiştir [48]. Farelerde thuringiensin'in akut intratrakeal instilasyonunun LD₅₀ değeri vücut ağırlığına göre 4.4 mg/ kg olduğunu belirtilmiştir [205].

Hall ve ark. [201], *Bt* β-ekzotoksini narenciye kırmızı akarına karşı sera ve laboratuvar şartlarında uygulamış ve yetişkin akarda yüksek oranda ölümcül olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde yumurtalar ve olgun olmayan akarlarda da ölümcül etki gösterdiği belirtilmiştir.

Tüm bunlardan dolayı 1999 yılında Dünya sağlık örgütü (WHO) β-ekzotoksin bulunduran suşların biyoinsektisidal formulasyonunu yasaklamıştır. [180]. β-ekzotoksin I üretimi genellikle *cry* ve *vip1/vip2* geni taşıyan plazmitlerle bağlantılıdır. 110 kb plazmitte β-ekzotoksinin 11 açık okuma çerçevesinde kümелendiği belirtilmiştir [48,206]. Bu genlerden üretilen enzimlerin bir yolak içerisinde çeşitli basamakları katalizleyerek en sonunda thuringiensin üretimini sağladığı belirtilmiştir [70].

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile hızlı bir şekilde tip I β-ekzotoksin taşıyan *B. thuringiensis* suşları tahmin edilebilir. Bizde bu çalışmada topraktan izole edilen çeşitli yerel *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) suşlarını kullanarak (Tablo 6.) PCR yöntemiyle β-ekzotoksin I (thuringiensin) taşıyan suşları tesbit ettik. 11 açık okuma çerçevesinden oluşan *thu* dizisini oluşturan *thu* A, B, C, D, E, F, G, 1, 2, 3, 4'den Tablo 7.'de belirtilen primerler kullanılmıştır. PCR yöntemiyle tesbit edilen suşlar arasından *thuE* bulunduranların β-ekzotoksin I üretme yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir.

β-ekzotoksin II üreten suşlar *thuE* geni taşımayabilirler [114]. Bu nedenle *thuE*₁ ve *thuE*₂ primerleriyle yaptığımız PCR çalışmasında tesbit ettiğimiz β-ekzotoksin I bulunduran standart ve yerel suşlarda β-ekzotoksin II bulunmayabilir. β-ekzotoksin I üretiminin *cry1B*, *vip1* ve *vip2* genlerini de barındıran plazmitlerin varlığı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [110]. Sauka ve ark. [114], yaptığı araştırmayla, bu çalışmada *thuE*₁ ve *thuE*₂ primerleri ile elde ettiğimiz veriler benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Perani ve ark. [129], yaptığı çalışmada topraktan *Bt* izole edilmiş ve suşların %35 kadarının *cry1B*'ye sahip olduğu ve bunların da %58'inin Thu ürettiği belirtilmiştir.

Espinasse ve ark. [110], yaptığı çalışmada, *Bt*'nin 640 doğal izolatı incelemiş ve önemli miktarlarda Thu salgısının *cry1B* ve *vip2* ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Aynı araştırmacılar *cry1B* ve *vip2*'yi taşıyan suşların aynı plazmid üzerinde yüksek miktarda Thu üretimini düzenlemek için gerekli olan genetik bilgiye sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

Bt kurstaki [75,79,101], *israelensis* [79], *tenebrionis* [107] suşları β -ekzotoksin I üretme yeteneğine sahiptir. Bizde bu çalışmada *thuE₁* primer çiftlerini kullanarak *kurstaki*, *israelensis* ve *tenebrionis* suşlarında β -ekzotoksin I görülmüştür. Fakat Levinson ve ark. [101] *B. thuringiensis morrisoni* suşunda β -ekzotoksin II bulunduğunu belirtmiş ve *Leptinotarsa decemlineata*'ya karşı β -ekzotoksin I'den daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Yapılan bu çalışmada 75 adet yerel *B. thuringiensis* suşu PCR yöntemi ile taranarak 40 tanesinde *thuE₁* olduğu belirlenmiştir (Şekil 12-14). *thuE₂* primer çiftleri ile yapılan çalışmada ise sadece 3 suшта beklenen boyutta bant elde edilmiştir. Standart suş *Bt* HD125 ve *Bt* Sy67 izolatında hem *thuE₁* hemde *thuE₂* taşıdığı belirlenmiştir.

Sy 69.4 ve Sy 70 suşlarında *thu4* belirlenmiştir. Öte yandan *thuE₁* ve *thu4* taşıdığı belirlenen suşlar Sy 69.4 ve Sy 70 olarak belirlenmiştir. *cry1I* primerleri ile yapılan çalışmada Sy 60, Sy 2.2b.2, Sy 59 ve Sy 27.1 suşlarının bu geni taşıdığı belirlenmiştir. *cry1I* taşıyan suşların *vip3* ile arasında önemli ölçüde korelasyon olduğu belirtilmiştir [206]. Bu çalışmada tesbit ettiğimiz *cry1I* geni taşıyan Sy 60, Sy 2.2B.2, Sy 59, ve Sy 27.1 suşlarında *vip3* geninin araştırılması gerekir. β -ekzotoksin I üretimi yapabilen suşlar ile *cry1B*, *vip1* ve *vip2* taşıyan plazmitler arasında önemli ölçüde korelasyon vardır. Bundan dolayı *thuE₁*, *thuE₂* ve *thu4* primerleri kullanarak belirlenen suşlarda *cry1B*, *vip1*, *vip2* bulundurup bulundurmadıklarının araştırılması gerekir. Yaptığımız bu çalışmada 75 adet yerel *Bt* suşunun %53,33'ünde *thuE₁*, %2,67'sinde *thuE₂*, %2,67'sinde *thu4*, %5,33'ünde ise *cry1I* geni tesbit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan HD 125 ve Sy 27.1 suşunda hem *thuE* hemde *cry1I* geni bulunduğu görülmüştür. Daha fazla suş ve izolatta tarama yapılması gerekmesine rağmen *thuE* ve *cry1I* arasındaki ilişkinin detaylı olarak incelenmesi gerekir.

B. thuringiensis tarafından üretilen β -ekzotoksinler tür spesifik olmayıp hedef olmayan birçok canlıyı olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle β -ekzotoksin taşıdığı belirlenen suşların insektisidal preparat hazırlanmasında dikkatli kullanılması gerekir. Çalışma sonuçları göstermektedir ki daha önce yapılan toksisite çalışmalarında etkili olduğu belirlenmiş olan Sy27.3, Sy49.1, Sy62.1.A, Sy25.1 suşları insektisidal preparat hazırlanmasında güvenli bir şekilde kullanılabilir [18,207].

β -ekzotoksin I üzerinde oldukça fazla ilerleme kaydedilmesine karşın β -ekzotoksin II üzerinde fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden β -ekzotoksin II taşıyan suş ve izolatlar üzerinde de araştırmaların genişletilmesi gerekir.



KAYNAKÇA

1. Sansinenea, E., 2012. Discovery and description of *Bacillus thuringiensis*, 3-18".
In: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology (Eds: Estibaliz Sansinenea). Springer
Dordrecht Heidelberg London New York.
2. Hernandez, C. S., Martínez, C., Porcar, M., Caballero, P., Ferré J., 2003.
Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin
production, **Journal of Invertebrate Pathology**, **82(1)**: 57-62.
3. Ishiwata, S., 1901. On a new type of severe flacherie (sotto disease) (original in
Japanese). **Dainihon Sansi Kaiho**, **114**: 1-5.
4. Ishiwata, S., 1905. About "Sottokin," a *Bacillus* of a disease of the silk-worm.
Dainihon Sanshi Kaiho, **161**: 1-5.
5. Berliner, E., 1915. Ueber die schlaffsucht der *Ephestia kuhniella* und *Bac.*
thuringiensis n. sp. **Z Angew Entomol**, **2**: 21-56.
6. Aoki, K, Chigasaki, Y., 1916. Über die Pathogenität der sog. Sottobacillen
(Ishiwata) bei Seidenraupen. **Bull Imp Sericult Expt Sta**, **1**: 97-139.
7. Angus, T.A., 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. **Nature** **173**:
545-546.
8. Talalaev, E.V., 1956. Septicemia of the caterpillars of the Siberian silkworm.
Mikrobiologiya, **25**: 99.
9. Weiser, J., 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in
Eastern Europe and in the Soviet Union. In: Krieg A, Huger AM (eds) Mitt.
Biol. Bundesanst. Land Forstwirtschaft Berl Dahlem, vol 233. Paul Parey, Berlin,
pp 37-49.
10. Kurstak, E., 1962. Donnees sur l'épizootie bacterienne naturelle provoquee par un
Bacillus du type *Bacillus thuringiensis* sur *Ephestia kuhniella* Zeller.
Entomophaga Mem Hors Ser, **2**: 245-247.
11. Beegle, C.C., Yamamoto, T., 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund):
history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can**
Entomol, **124**: 587-604.
12. Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus*
thuringiensis var. *alesti*. **J. Invertebr Pathol**, **15**: 232-239.
13. de Barjac, H., Lemille, F., 1970. Presence of flagellar antigenic subfactors in
Serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. **J Invertebr Pathol**, **15**: 139-140.

14. Aizawa, K., Iida, S., 1963. Nucleic acids extracted from the virus polyhedra of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). **J Insect Path**, **5**: 344–348.
15. Zakharyan, R.A., Agabalyan, A.S., Chil-Akopyan L.A., Gasparyan N.S., Bakunts K.A., Tatevosyan P.E., Afrikyan E.K., 1976. About the possibility of extrachromosomal DNA in creation of the entomocidal endotoxin of *B. thuringiensis*. **Dokl Akad Nauk Arrn SSR**, **63**: 42–47.
16. Ely, S., 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. In: Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ Rosas-García NM (2009) Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. **Recent Pat Biotechnol**, **3**: 28–36.
17. (Web sayfası: <https://trilobiteglassworks.deviantart.com/art/Bacillus-thuringiensis-Paperweight-410036825>), (Erişim tarihi: Mart 2018).
18. Yılmaz, S., 2010. Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu Ve Bazı Zararlı Böceklerle Karşı Mücadelede Kullanımı. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kayseri, 137 s.
19. Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V., Ripouteau, C., Hamon, H. S., Laurent, P., Thiery, I., 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. Unitedes Bacteries Entomopathogenes. **J Appl Microbiol**, **86**: 660–672.
20. Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J., 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group organisms. **FEMS Microbiol Rev.**, **29**: 303–310.
21. Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolsto, A.B., 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-One species on the basis of genetic evidence. **Appl Environ Microbiol**, **66**: 2627–2630.
22. Bulla, L.A., Bechtel, DB, Kramer, K.J., Shethna Y.I., Aronson, A.I., Fitz-James, P.C., 1980. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **Crit Rev Microbiol**, **8**: 147-204.
23. Bechtel, D.B., Bulla, L.A. Jr. 1976. "Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*" **Journal of bacteriology**, **127**: 1472-1481.

24. Mohamed, A. I., 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, **1**: 31-50.
25. Federici, A., Park Hyun W., Bideshi D.K, 2010. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. **The Open Toxinology Journal**, **3**: 154-171.
26. Peter, L., Hans Rudolf E., 1981. The Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*, Institute of Microbiology, Swiss Federal Institute of Technology, 8092 Zurich, Switzerland. *Pharmac. Ther.* **13**, 257-283.
27. Krieg, A., Lysenko, O., 1979. Toxins and enzymes of several species of *Bacillus*, especially of the *B. cereus-thuringiensis* group, *Zentralbl. Bakteriologie, Naturwiss.* **134**: 70-88.
28. Krieg, A., 1971. Concerning α -Exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **J Invertebrate Pathology**, **17**: 134-135.
29. Höfte, H.; Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, **53**(2): 242–255.
30. Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **62**: 775–806.
31. Palma, L., Muñoz, D., Berry, c., Murillo, J., Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity, **Toxins**, **6**: 3296-3325.
32. Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Coté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K., Shin, T., vd. Parasporin Nomenclature. (Web sayfası: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>) (Erişim tarihi: Mart 2018).
33. Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, **49**, 423–435.
34. Ben-Dov, E., 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, **6**: 1222–1243.
35. Soberon, M., Lopez-Diaz, J.A., Bravo A., 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, **41**: 87–93.

36. Yu, X., Liu, T., Sun, Z., Guan, P., Zhu, J., Wang, S., Li, S., Deng, Q., Wang, L., Zheng, A., 2012. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Curr. Microbiol.**, **64**: 326–331.
37. De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E., 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, **37**: 409–433.
38. Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **J Invertebr Pathol**, **109**: 1–10.
39. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D.H., *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. (Web sayfası: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/), (Erişim tarihi: Şubat 2018).
40. Van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **J Invertebr Pathol**, **101**: 1–16.
41. Chougule, N.P., Bonning, B.C., 2012. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. **Toxins**, **4**: 405–429.
42. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.**, **62**: 807-13.
43. Van Frankenhuyzen, K., 2013. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **J Invertebr Pathol**, **114**: 76–85.
44. de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet**, **17**: 193–199.
45. Li, J, Koni, P.A., Ellar, D.J., 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **J Mol Biol**, **257**:129–152.
46. Promdonkoy, B., Ellar, D.J., 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochem J**, **350**: 275–282.

47. Butko, P., 2003. Cytolytic toxin Cyt1Aa and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. **Appl Environ Microbiol**, **69**: 2415–2422.
48. Sansinenea, E., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchis, V., 2002. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production. **J Bacteriol**, **184**: 5848–5854.
49. Sansinenea, E., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchis, V., 2004. An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling β -Exotoxin I production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Strain 407–1. **J Bacteriol**, **186**: 3108–3116.
50. Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., Chen J-S., 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Appl Environ Microbiol**, **69**: 4648–4657.
51. (Web sayfası: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), (Erişim tarihi: Şubat 2018).
52. Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.J., He, H., Clardy, J., Handelsman, J., 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Appl Environ Microbiol**, **60**: 2023–2030.
53. Griffiths, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J., Aroian, R.V., 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, **307**: 922–925.
54. Lee, M.K., You, T.H., Young, B.A., Cotrill, J.A., Valaitis, A.P., Dean, D.H., 1996. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Appl Environ Microbiol**, **62**: 2845–2849.
55. Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2004. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Eur J Biochem**, **271**: 3127–3135.
56. Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N

receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochem Biophys Acta**, **1667**: 38-46.

57. Bode, H.B., 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Curr Opin Chem Biol**, **13**: 224–230.
58. Sansinenea, E., Ortiz, A., 2011. Secondary Metabolites of Soil *Bacillus* spp., **Biotechnol Lett** **33**: 1523–1538.
59. Saxena, D., Ben-Dov E., Manasherob, R., Barak, Z., Boussiba S., Zaritsky A., 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* producing melanin. **Curr Microbiol**, **44**: 25–30.
60. Che, Y., Deng, Y., Wang, J., Cai, J., Ren, G., 2004. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus thuringiensis*. **J Gen Appl Microbiol**, **50**: 183–188.
61. Silo-Suh, L.A., Stabb, E.V., Raffel, S.J., Handelsman, J. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. **Curr Microbiol**, **37**: 6–11.
62. Zhou, Y., Choi Y-L., Sun, M., Yu, Z., 2008. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. **Appl Microbiol Biotechnol.**, **80**: 563–572.
63. Sudakin, D.L., 2003. Biopesticides. **Toxicol. Rev.** **22**: 83–90.
64. Ye, W., Zhu, L., Liu, Y., Crickmore, N., Peng, D., Ruan, L., Sun, M., 2012. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline. **Appl. Environ. Microbiol.**, **78**: 4795–4801.
65. Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93(11)**: 5389–5394.
66. Donovan, W.P., Engleman, J.T., Donovan, J.C., Baum, J.A., Bunkers, G.J., Chi, D.J., Clinton, W.P., English, L., Heck, G.R., Ilagan, O.M. vd 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **72**: 713–719.

67. Stabb, E.V., Jacobson, L.M., Handelsman, J., 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 4404–4412.
68. Xu, C., Wang, B.C., Yu, Z., Sun, M., 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Toxins**, **6**: 2732–2770.
69. Wirth, M.C.; Walton, W.E.; Federici, B.A. 2010. Inheritance patterns, dominance, stability, and allelism of insecticide resistance and cross-resistance in two colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*) selected with cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Med. Entomol.**, **47**: 814–822.
70. Liu, X., Lifang, R., Donghai, P, Lin L., Ming, S., Ziniu, Y., 2014. Thuringiensin: A Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. **Toxins**, **6**: 2229–2238.
71. Sharma, C.B, Prasad S.S, Pai S.B, Sharma S., 1976. The exotoxin of *Bacillus thuringiensis*: a new C-mitotic agent. **Experientia** **32**: 1465–6.
72. McConnell, Richards, A. G., 1959. The production by *Bacillus thuringiensis* berliner of a heat-stable substance toxic for insects. **Canadian Journal of Microbiology**, **5**: 161–168.
73. Toledo, J, Liedo, P, Williams, T, Ibarra, J., 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: *Tephritidae*). **J Econ Entomol**, **92**: 1052–6.
74. Tamez-Guerra, P., Iracheta, M.M., Pereyra-Alf  rez, B., Galán-Wong, L.J., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R.S., 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. **J Invertebr Pathol**, **86**: 7–18.
75. Tsuchiya, S, Kasaishi, Y, Harada, H, Ichimatsu, T, Saitoh, H, Mizuki, E, 2002. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). **J Invertebr Pathol**, **81**: 122–6.
76. Farkas, J, Sebesta, K, Horska, K, Samek, Z, Dollijs, J, Storm, F., 1969. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechia*. **Collect Czechslov Chem Commun**, **34**: 1118–20.

77. Liu, X. Y., Ruan, L. F., Hu, Z. F., Peng, D. H., Cao, S. Y., Yu, Z. N., Liu, Y., Zheng, J. S., Sun, M., 2010. Genome-wide Screening Reveals the Genetic Determinants of an Antibiotic Insecticide in *Bacillus thuringiensis*, **The Journal of Biological Chemistry**, **285 (50)**: 39191-39200.
78. Zhou, J., Xu Z., Chen S., 2013. Simulation and prediction of the thuringiensin abiotic degradation processes in aqueous solution by a radius basis function neural network model, **Chemosphere**, **91**: 442-447.
79. Obeidat, M., Horani, H. K., Al-Momani, F., 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxins and δ -endotoxins to *Drosophila melanogaster*, *Ephestia kuhniella* and human erythrocytes. **African Journal of Biotechnology**, **11(46)**: 10504-10512.
80. Argôlo-Filho, R. C., Costa, R. C., Pinheiro, D. H., Corrêa, F. M., Valicente, F. H., Pomella, A. W. V., Loguercio, L. L., 2014. Requirement of Simultaneous assessment of Crystal- and supernatant-Related Entomotoxic Activities of *Bacillus thuringiensis* Strains for Biocontrol-Product Development. **Toxins**, **6**: 1598-1614.
81. Jing-Wen, Z., Ya-Fei, C., Zheng-Hong, X., Zi-Niu, Y., Shou-Wen, C., 2007. Production of thuringiensin by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy, **Process Biochemistry**, **42**: 52-56.
82. Šebesta, K., Horska, K., 1970. Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, **Biochimica et Biophysica Acta**, **209**: 357-376.
83. Taylor, J.M.W, Sutherland, D.A., Aidoo, K.E., Logan, N.A., 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, **242**: 313–317.
84. Pinto, L.M.N., Berlitz, D. L., Castilhos-Fortes, R., Fiuza L. M., 2010. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia*. **Ciência e Desenvolvimento**, **11(38)**:24-31.
85. Heimpel, A. M., 1955. Investigation of the mode of action of strains *Bacillus cereus* Fr. and pathogenic for the larch sawfly *prisliphora erichsoni* (Htg.). **Can. J. Zool.**, **33**: 311-326.

86. Carlberg, G., 1986. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. **MIRCEN Journal**, **2**: 267- 274.
87. Krieg, A., 1970. In vitro determination of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* and related bacilli. **Journal of Invertebrate Pathology**, **15**: 313-320.
88. Ohba, M., Tantichodok, A., Aizawa, K., 1981. Production of heatstable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria, **Journal of Invertebrate Pathology**, **38**: 26-32.
89. Perchat, S., Buisson, C., Chaufaux, J., Sanchis, V., Lereclus, D., Gohar, M., 2005. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins, **Journal of Invertebrate Pathology**, **90(2)**: 131-133.
90. Tzeng, Y., Young, Y., 1995. Penicillin-G Enhanced Production of Thuringiensin by *Bacillus thuringiensis* sp. *Darmstadiensis*. **Biotechnol. Prog.**, **11**: 231-234.
91. Burgerjon, A., Barjac, H., 1960. de: Nouvelles donnees sur le role de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Compt. Rend. Acad. Sci., Paris**, **251**: 911.
92. Burgerjon, A., Barjac H., 1964. Etude de la toxine soluble thermostable chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis*. **Colloq. Intern Pathol. Insectes**, **3**: 221-226.
93. Burgerjon, A., Biache, G., Cals, Ph., 1969. Teratology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebrate Pathol.**, **14**: 274.
94. Wolfen, B. D. A., Guerra, A. A., Dulmage, H. T., Garcia, R.D., 1972. Properties of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* IMC 10,000 against the tobacco budworm. **J. Econ. Entomol.**, **65**: 1245.
95. Ignoffo, C. M., Gregory, B., 1972. Effects of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin on larvae maturation, adult longevity, fecundity and egg viability in several species of *Lepidoptera*. **Envir. Ent.**, **1**: 269.
96. Vankova, J., Leskova, J., 1972. Changes in the haemolymph of *Galleria meUenella* (L.) caterpillars infected by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Entomol. Bohemaslov.**, **69**: 297.
97. Lain, A. B. D., Webster J. N.I., 1972. Effect of the DD-136 Nematode and of a β -exotoxin preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on leatherjackets, *Tipula paludosa* larvae. **J Invertebrate Pathol**, **20**: 141.

98. Wasti, S. S., Mahadeo, C. R., Knell, L. J. D., 1973. Larvicidal activity of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* berliner against two species of flies. **Z. Angew. Entomol.**, **74**: 157.
99. Vankova, J., 1978. The Heat-Stable Exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, **Folia Microbiol.**, **23**: 162-174.
100. Zhang, J.H., Wang, C.Z., 2000. Comparison of toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Acta Entomol Sin**, **2000 43**: 85–91.
101. Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C., Gonzalez, J.M., 1990. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **J. Bacteriol** **172**: 3172–3179.
102. He, J., Wang, J., Yin, W., Shao, X., Zheng, H., Li M., Zhao, Y., Sun, M., Wang, S., Yu, Z., 2011. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* Strain CT-43. **Journal of Bacteriology**, **193 (13)**: 3407-3408.
103. Mac Innest, C., Bouwer, G., 2009. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, **101**: 137-139.
104. Šebesta, K., Sternbach, H., 1970. The specificity of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by *Bacillus thuringiensis* exotoxin. **FEBS Letters**, **8**: 223-235.
105. Šebesta, K., Farkas, J., Horska, K.V., 1981. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Microbial Control of Pests and Plant Diseases, New York, p. 249-281.
106. Horská, K., Vanková, J., Šebesta, K., 1975. Determination of Exotoxin in *Bacillus thuringiensis* Cells. **Z. Naturforsch**, **30**: 120-123.
107. Belder, E., Elderson, J., 2013. The introduction of Integrated Pest Management in the Ethiopian Horticultural Sector, Plant Research International, part of Wageningen UR, 1-13.
108. Ozawa K., and Iwahana H., 1986, Involvement of a transmissible plasmid in heat-stable exotoxin and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *Darmstadiensis*, **Current Microbiology**, **13**: 337-340.

109. Wiest, S.L.F., Pilz Júnior, H.L., Fiuza, L.M., 2015. Thuringiensin: a toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Bt Research**, **6(4)**: 1–12.
110. Espinasse, S., Gohar, M., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Sanchis, V., 2002. Correspondence of High Levels of Beta-Exotoxin I and the Presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**: 4182-4186.
111. Castagnola, A., Stock, S. P., 2014. Common Virulence Factors and Tissue Targets of Entomopathogenic Bacteria for Biological Control of Lepidopteran Pests. **Insects**, **5**: 139-166.7.
112. Iatsenko, I., Nikolov, A., Sommer, R. J., 2014. Identification of Distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 Nematicidal Factors Using the Model Nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. **Toxins**, **6**: 2050-2063.
113. Perani, M., Bishop, A.H., Vaid, A. 1998. Prevalence of β -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **160**: 55–60.
114. Sauka, D.H., Pérez, M. P., López, N. N., Onco, M. I., Berretta, M. F., Benintende, G. B., 2014. PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains, **Journal of Invertebrate Pathology**, **122**: 28-31.
115. Rodríguez C. S. H., Martínez C., Porcar M., Caballero P., Ferré J., 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. **Journal of Invertebrate Pathology**, **82**: 57-62.
116. Johnson, D. E., Bulla, L. A., Nickerson, K. W., 1975. Differential inhibition by β -exotoxin of vegetative and sporulation-specific ribonucleic acid polymerases from *Bacillus thuringiensis*. **American Society for Microbiology**,: 248-254.
117. Rodríguez C. S. H., Ferré J., Larget-Thiéry I., 2001. Update on the detection of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis, **Journal of Applied Entomology**, **90**: 643-647.
118. Lee, I. H., Je, Y. H., Chang, J. H., Roh, J. Y., Oh, W. H., Lee, S. G., Shin, S. C., Boo, K. S., 2001. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. **Current Microbiology**, **43**: 284-287.
119. Tanada, Y., Kaya, K. H., 1992. Insect pathology, Academic Press, San Diego, p. 94-96.

120. Barfod, K. K., 2010. Occupational exposure to *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Development of an aerosol hazard identification model, Dissertation for Philosophiae Doctor Faculty of Health Sciences University of Copenhagen, pp. 130.
121. Mohd-Salleh, M. B., Lewis, L. C., 1982. Toxic effects of spore/crystal ratios of *Bacillus thuringiensis* on European corn borer larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, **39**: 290-297.
122. Cantwell, G. E., Heimpel, A. M., Thompson, M. J., 1964. The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner, **Journal of Invertebrate Pathology**, **6**: 466-480.
123. Burgerjon A., Galichet, P. F., 1965. The effectiveness of the heatstable toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on larvae of *Musca domestica* Linnaeus, **Journal of Invertebrate Pathology**, **7**: 263-264.
124. Mohd-Salleh, M. B., Beegle, C. C., Lewis, L. C., 1980. Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **35**: 75-83.
125. Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J. L., 2012. Current Models of the Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: A Critical Review, **Journal of Invertebrate Pathology**, **111(1)**: 1- 12.
126. Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiol. Rev.**, **37**: 3–22.
127. Soberón, M., Pardo, L., Muñoz- Garay, C., Sanchez, J., Gómez I., Porta H. and Bravo A., 2010. Pore formation by Cry toxins. Proteins: membrane binding and pore formation. **Landes Bioscience and Springer Science and Business Media**, **11**: 127-142.
128. Somerville, H. J., Swain H. M., 1975. Temperature dependent inhibition of polyphenylalanine formation by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, **FEBS Letters**, **54**: 330-333.
129. Burgerjon, A., 1974. Effets physiologiques et mutagenes sur les Insectes de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ann Parasitol** **48**, 835–844.

130. Peña, G., Miranda-Rios, J., Riva, G., Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A., 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied and Environmental Microbiology**, **72(1)**: 353-360.
131. Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C., French S. J., 1969. A Purification and some Properties of an Insecticidal Exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Biochemical Journal**, **114**: 477.
132. Ignoffo, C. M., Gard, I., 1970. Use of an Agar-Base Diet and House Fly Larvae to assay β -exotoxin Activity of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, **63**: 1987-1989.
133. Bond, R.P.M., Boyce, C.B.C., Rogoff, M.H., Shieh, T.R., 1971. The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In Microbial Control of Insects and Mites, ed. Burges, H.D. and Hussey, N.W. pp. 275–303. London: Academic Press.
134. Gingrich, R. E., Eschle, J. L., 1971. Susceptibility of immature horn flies to toxins of *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Economic Entomology**, **64**: 1183- 1187.
135. Carlberg, G., 1973. Biological effects of the thermostable β -exotoxin produced by different serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Department of Microbiology, University of Helsinki, 6:1-90.
136. Hall, I. M., Arakawa, K. Y., 1959. The susceptibility of the house fly, *Musca domestica* Linnaeus to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. **J. Inscct. Pathol.** **1**: 351-355.
137. Haufler M., Kunz S. E., 1985. Laboratory evaluation of an exotoxin rom *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* to horn fly larvae (Diptera: Muscidae) and mice. **Journal of Economic Entomology**, **78**: 613-616.
138. Gingrich R.E., 1987. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a potential ontrol agent for the adult Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wied.). **Journal of Applied Entomology**, **104**:378-385.
139. Mullens, B. A., Rodriguez, J. L., 1988. Field evaluation of ABG-6162A (Thuringiesin) as a fly larvicida. **Insect Acar. Tests**, **13**: 417.
140. Mullens, B. A., McKeen, W. D., Rodriguez J. L., Mandeville J. D., 1988. Evaluation of ABG-6208 (Thuringiensin) for control of northern fowl mite. **Insect. Acar. Tests**, **13**: 405.

141. Marec F., Matha V., and Weiser J., 1989, Analysis of genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin by means of the *Drosophila* wing test. **Journal of Invertebrate Pathology**, **53**: 347-353.
142. Yamvrias C., Anagnou M., 1989. Preliminary tests on the sensitivity of the larvae of *Dacus oleae* to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Fruit flies of economic importance Balkema, Rotterdam.
143. Karamanlidou G., Lambropoulos A., Koliais S., Manousis T., Ellar D., Kastritsis C., 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*), **Applied and Environmental Microbiology**, **57(8)**:2277-2282.
144. Robacker D. C., Martinez A. J., García J. A., Diaz M., Romero C., 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, **89**:104-110.
145. Carlberg, G., Oketch, M., Virkajarvi, I., Lako, G., Makayoto, M., Otieno, W., Holmberg, A., 1991. Control of fly larvae with *Bacillus thuringiensis*: Field and socio-economic studies in Kenya, Natural Environmental Research Council, Oxford, UK.
146. Dubois, N. R., 1986. Synergism between β -exotoxin *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* (HD-I) in gypsy moth, *Lymantria dispar* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, **48**: 146-151.
147. Gardner W. A., Pendley A. F., Stokey G. K., 1986, Interactions between *Bacillus thuringiensis* and its beta-exotoxin in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) neonate larvae. **The Florida Entomologist**, **69**: 531-536.
148. Sarfraz, R.M., Dosdall, L.M., Keddle, A.B., Myers, J.H., 2011. Larval survival, host plant preferences and developmental responses of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on wild brassicaceous species. **Entomol. Sci.** **14**: 20–30.
149. Vanková, J., Horská, K., Šebesta, K., 1974. The fate of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* caterpillars. **Journal Invertebrate Pathology**, **23**: 209-212.
150. Moar W. J., Osbrink W. L. A., Trumble J. T., 1986. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* with thuringiensin on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, **79**: 1443-1446.

151. Barreto, M. R., Loguercio, L. L., Valicente, F. H., Paiva, E., 1999. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, **28**: 675-685.
152. Robacker D. C., Garcia J. A., Martinez A. J., 2000. Lack of toxicity to adults of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* endotoxin preparations, **Journal of Economic Entomology**, **93**: 1076-1079.
153. Prasad M. R. N., Chinoy N. J., Kadam K. M., 1972. Changes in succinate dehydrogenase levels in rat epididymis under normal and altered physiological conditions, **Fertility and Sterility**, **23**:86-190.
154. Ignoffo C. M., Dropkin V. H., 1977. Deleterious effect of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis* on species of soil inhabiting, myceliophagous, and plant parasitic nematodes. **Journal of Kansas Entomological Society**, **50**:394-398.
155. Bone L. W., Bottjer K. P., Gill S. S., 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Experimental Parasitology**, **60**: 314-322.
156. Cantwell, G. E., Knox, D. A., Lehnert, T., Michael, A. S., 1966. Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies treated with certain biological insecticides, **Journal of Invertebrate Pathology**, **8**: 228-233.
157. Sharma, C. B. S. R., Sahu, R. K., 1977. A preliminary study on the responses of root meristems to exotoxin from *Bacillus thuringiensis* a constituent of a microbial insecticide, Thuricide. **Mutation Research**, **46**: 19-26.
158. Meretoja, T., Carlberg, G., Gripenberg, U., Linnainmaa, K., Sorsa, M., 1977. Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin I. Mammalian tests. **Hereditas**, **85**: 105-112.
159. Bishop, A. H., Robinson, C. V., 2014. *Bacillus thuringiensis* HD-1 Cry⁻: development of a safe, non-insecticidal simulant for *Bacillus anthracis*, **Journal of Applied Microbiology**, **117**: 654-662.
160. Tsai, S. F., Yang, C., Liu, B. L., Hwang, J. S., Ho, S. P., 2006. Role of oxidative stress in thuringiensin-induced pulmonary toxicity, **Toxicology and Applied Pharmacology**, **216**: 347-353.

161. De Barjac, H., Lecadet, M. M., 1975. Elimination de l'exotoxine thermostable de *B. thuringiensis* apres ingestion chez la Souris. **C. R. Acad. Sci.**, **286**: 677-679.
162. Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Kasatiya, S., 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. **Letters in Applied Microbiology**, **21**: 103-105.
163. Bishop, A. H., Johnson, C., Perani, M., 1999. The safety of *Bacillus thuringiensis* to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **15**: 375-380.
164. Devidas, P., Rehberger, A.L., 1992. The effects of exotoxin (Thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. **Plant and Soil**, **145**: 115-120.
165. Normand, R. D., 1985. Synergism between β -Exotoxin and *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* (HD-1) in Gypsy Moth, *Lyrnantria dispar*. **Jornual of Invertebrate pathology**, **48**: 146-151.
166. Shoushtari, R.V., Modarres, S.S., Zamani, N.A., 2011. Study on β -exotoxin (thurigiensin) effect on biology and growth parameters of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) on common bean. 2011. Researches Of The First International Conference, Babylon and Razi Universities, s. 6.
167. Herbert, D. A., Harper J. D., 1984. Bioassay of a β -Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* against *Heliothis zea* Larvae. **Jornual of Invertebrate pathology**, **20**: 46-50.
168. Kim, T. Y., Gregory, B. G., Ignoffo, C. M., 1972. The β -Exotoxins of *Bacillus thuringiensis* III. Effects on in viwo Synthesis of Macromolecules in an Insect System. **Jornual of Invertebrate pathology**, **20**: 46-50.
169. Lewis, L.C., Mohd, B.M., 1982. Comparative Effects of Spore-Crystal Complexes and Thermostable Exotoxins of Six Subspecies of *Bacillus thuringiensis* on *Ostrinia nubilis* (Lepidoptera: *Pyralidae*). **Jornual of Invertebrate pathology**, **41**: 336-340.
170. Prystas, M., Kaldova, L., Sorm, F., 1976. Alternative synthesis of exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Col1. Czech. Chem. Commun.** **41**: 1426-1447.
171. Schmid, E., Benz, G., 1969. Oral and parenteral toxicity of *Bacillus thuringiensis* "Exo-toxin" and its inactivation in larvae of *Galleria mellonella*. **Experientia**, **25**: 96-98.

172. Šebesta K., Horska K., Vankova J., 1969a. Isolation and properties of the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae* Auct. **Coll. Czech. Chem. Commun.**, **34**: 891.
173. Šebesta K., Horska K., Vankova J., 1969b. Inhibition of de novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Coll. Czech. Chem. Commun.**, **34**, 1786.
174. Horska, K., Sebesta K., Kaldova L., 1976. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by derivatives and analogues of thuringiensin. **Coll. Czech. Chem. Commun.**, **41**: 3837.
175. Iandolo, J. J., Powell, R. L., Bulla, Jr. L. A., 1976. Dormant spores of *Bacillus thuringiensis* contain an inhibitor of RNA polymerase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **69**: 237.
176. Lipa J. J., 1985. Progress in biological control of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) in Eastern Europe, **Bulletin E. P. P. O.**, **15**: 207-211.
177. Siegel J. P., 2001. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*. Based Insecticides, **Journal of Invertebrate Pathology**, **77**: 13-21.
178. Mwamburi L.A., Laing M. D., Miller R., 2009. Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of house fly larvae and adults in poultry houses. **Poultry Science**, **88**: 2307-2314.
179. Veloorvalappil, N. J., Smitha, R. B., Benjamin S., 2013. An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*, **Advances in Microbiology**, **3**: 462-472.
180. WHO, 1999. Guideline specification for bacterial larvicides for public health use, Report of the WHO informal consultation, Geneva.
181. Arango J. A., Romero M., Orduz S., 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombiawith insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), **Journal of Applied Microbiology**, **92**: 466-474.
182. Beebee T., Korner A., Bond R.P., 1972. Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerases by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei, **Biochemical Journal**, **127(4)**: 619-624.
183. Hitchings D. L., 1967. *Bacillus thuringiensis*: a reproduction inhibitor for Southern armyworm. **Journal of Economic Entomology**, **60**: 596-597.

184. de Barjac, H., Burgerjon, A., Bonnefoi, A., 1966. The production of heat-stable toxin by nine serotypes of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebrate Pathol.**, **8**: 537-538.
185. Kim, Y. T., Huang, H. T., 1970. The β -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* I. Isolation and 602 Characterization. **Journal of Invertebrate Pathology**, **15**: 100-108.
186. Tsun, H.Y., Liu, C.M., Tzeng, Y.M., 1999. Recovery and purification of thuringiensin from the fermentation broth of *Bacillus thuringiensis*. **Bioseparation**, **7**: 309–16.
187. Tzeng, Y.M., Liu, B.L., Huang, S.S., Liu, C.M., Tsun, H.Y., 2001. Method of purifying thuringiensin. US Patent 6,268,183B1.
188. Gohar, M., Perchat, S., 2001. Sample Preparation for β -Exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, **Analytical Biochemistry**, **298**: 112-117.
189. Mechals B. J., Beyer O., 1963. Production and assay of extracellular toxins by *Bacillus thuringiensis*. **Developments in industrial microbiology**, **4**: 142-147.
190. Bubenschikova, S. N., Kagramanova, V. K., Baratova, L. A., Danilova, E. B., Kruglyak, E. B., 1983. Determination of heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis* by high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of Invertebrate Pathology**, **42**: 344–347.
191. Campbell D.P., Dieball D.E., Brackett J.M., 1987. Rapid HPLC assay for the exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, **35**:156-158.
192. De Rijk, T. C., Van Dam, R. C. J., Zomer, P., 2013. Development and validation of a confirmative LC-MS/MS method for the determination of β -exotoxin Thuringiensin in plant protection products and selected greenhouse crops, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **405**: 1631-1639.
193. Yan, X., Gai, Y Liang, L., Liu, G., Tan, H., 2007. A gene encoding alanine racemase is involved in spore germination in *Bacillus thuringiensis*. **Arch Microbiol**, **187**: 371–378.
194. Martin, P.A.W., 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. **Am Entomol** **40**, 85–90.

195. Glare, T.R., O'Callaghan, M., 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety p. 350p. New York: John Wiley & Sons, LTD.
196. Sanchez-Soto, A.I., Saavedra-Gonzalez, G.I., Ibarra, J.E., Salcedo-Hernandez, R., Barboza-Corona, J.E., Del Rincon-Castro, M.C., 2015. Detection of β -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Letters in Applied Microbiology**, **61**: 562-567.
197. Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annu Rev Entomol**, **37**: 615–636.
198. Bravo, A., G., I., Porta, H., Garcia-Gomez, B.I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberon, M., 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* cry toxins insecticidal activity. **Microb Biotechnol**, **6**: 17–26.
199. Rowe, G.E., Margaritis, A., 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **Crit Rev Biotechnol**, **6**: 87–127.
200. Argôlo-Filho, R.C., Loguercio, L.L., 2014. *Bacillus thuringiensis* is an Environmental Pathogen and Host-Specificity Has Developed as an Adaptation to Human-Generated Ecological Niches. **Insects**, **5**: 62-91.
201. Hall, I.M., Hunter, D.K., Arakawa, K.Y., 1971. The Effect of the β -Exotoxin Fraction of *Bacillus thuringiensis* on the Citrus Red Mite, Division of Biological Control. **Jornual of Invertebrate pathology**, **18**: 359-362.
202. Noel, G.R., 1990. Evaluation of thuringiensin for control of *Heterodera glycines* on soybean. **J Nematol**, **22**: 763–766.
203. Tsai, S. F., Liao, J. W., Wang, S. C., 1998, Acute oral and pulmonary toxicity of thuringiensin in rats, **Journal of the Chinese Chemical Society**, **24**: 203-211.
204. Tsai, S. F., Stelzer, H. D., Hedrich, H. J., Hackbarth, H., 2003. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? **Laboratory Animals**, **37**: 314-327.
205. Tan, P., Fuchs, S.Y., Chen, A., Wu, K., Gomez, C., Ronai, Z., Pan, Z.Q., 1999. Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I κ B α . **Molecular Cell**, **3**: 527-533.
206. Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., Sanchis, V., 2004. Occurrence and Linkage Between Secreted Insecticidal Toxins in Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, **47(1)**: 501–507.

207. Yılmaz S., Karabörklü S., Azizoğlu U, Ayvaz A., Akbulut M., Yıldız A., 2013. Toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolates on the larval stages of pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* at different temperatures, **Turk J Agric For**, 37: 163-172



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Mehmet Erdem ÖZER

Uyruğu: Türkiye (T.C)

Doğum Tarihi ve Yeri: 13.04.1988 - Malatya

Medeni Durum: Bekar

e-mail: ozer246@gmail.com

Yazışma Adresi: Paşaköşkü Mah., İsmetpaşa Cad., Yılmaz Apt., No: 33/5

Merkez / MALATYA

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji	2018
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme	2014
Lise	Malatya Lisesi, Malatya	2005

YABANCI DİL

İngilizce