



***Pieris brassicae*'DEN İZOLE EDİLEN *Serratia ficaria*
BAKTERİSİNE AİT KİTİNAZ PROTEİNLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
VİRULANS ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Merve Almula BAKIRDÖĞEN

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gözde Büşra EROĞLU
2023
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Pieris brassicae*'DEN İZOLE EDİLEN *Serratia ficaria* BAKTERİSİNE AİT
KİTİNAZ PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
VİRULANS ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Merve Almula BAKIRDÖĞEN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gözde Büşra EROĞLU

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27 / 12 / 2023

Merve Almula BAKIRDÖĞEN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Pieris brassicae*'DEN İZOLE EDİLEN *Serratia ficaria* BAKTERİSİNE AİT KİTİNAZ PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE VİRULANS ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Merve Almula BAKIRDÖĞEN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gözde Büşra EROĞLU

Brassicaceae familyasına ait sebzelerden biri olan lahana hem sağlık değerleri hem de ekonomik değeri bakımından oldukça önemlidir. Başlıca zararlısı olan *Pieris brassica* ile mücadele için günümüzde kimyasala alternatif yeni çözüm arayışı doğmuştur. Genomda böceklerin dış iskeletlerinin ve bağırsak epitel dokusunun parçalanmasına sebep olan *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz D* genleri bulunmasıyla *Serratia ficaria* potansiyel bir biyoinsektisit ajandır. Erzurum ilinde lahana ekili alalardan toplanan *Pieris brassicae* larvalarının aniden toplu olarak öldükleri gözlemlenmiştir. Enfeksiyon sebebini anlamak üzere 16S rRNA geninin yeni nesil dizilemesi yapılmıştır. Analiz sonucunda enfeksiyon nedeninin *S. ficaria* bakterisi olduğu anlaşılmıştır. Bu tez çalışmasında, yerel ve etkili *S. ficaria* entomopatojen izolatının *kitinaz* genleri Gibson klonlama yöntemiyle çoğaltılarak *Kitinaz A*, *B* ve *D* enzimlerinin üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ardından *P. brassicae* larvalarına *kitinaz* enzimleri damlacık yedirme yöntemiyle uygulanarak larvalar enfekte edilmiştir. Ölüm oranları sırasıyla %100, %82 ve %90 olarak belirlenmiştir. En etkili enziminin *Kitinaz A* olduğu bulunmuştur. *Kitinaz A* enzimiyle yapılan doz denemesi sonucunda LD₅₀ değeri 1095,31 ng/μl ve LT₅₀ değeri 2,17 gün olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak *S. ficaria*'ya ait *kitinaz* enziminin *P. brassicae* ile mücadelede kullanılabilecek etkili bir potansiyel biyoinsektisit olduğu belirlenmiştir.

2023, 48 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pieris brassicae*, *Kitinaz* enzimi, Biyolojik kontrol, *Serratia ficaria*

ABSTRACT

MS. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CHITINASE PROTEINS OF *Serratia ficaria* BACTERIA ISOLATED FROM *Pieris brassicae* AND DETERMINATION OF THEIR VIRULENCE EFFECTS

Merve Almula BAKIRDÖĞEN

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gözde Büşra EROĞLU

Cabbage, one of the vegetables belonging to the Brassicae family, is very important in terms of both its health values and economic value. Today, a search for new alternative solutions to chemicals has emerged to control *Pieris brassicae*, which is its main pest. *Serratia ficaria* is a potential bioinsecticide agent due to the presence of *chitinase A*, *chitinase B* and *chitinase D* genes in the genome, which cause the destruction of insect exoskeletons and intestinal epithelial tissue. It was observed that *Pieris brassicae* larvae collected from cabbage cultivated fields in Erzurum province suddenly died en masse. Next-generation sequencing of the 16S rRNA gene was performed to understand the cause of infection. As a result of the analysis, it was understood that the cause of the infection was *S. ficaria* bacteria. In this thesis study, the chitinase genes of the local and effective *S. ficaria* entomopathogenic isolate were amplified by the Gibson cloning method, and the production and purification of Chitinase A, B and D enzymes were carried out. Then, chitinase enzymes were applied to *P. brassicae* larvae by droplet feeding method and the larvae were infected. Mortality rates were determined as 100%, 82% and 90%, respectively. It has been found that the most effective enzyme is Chitinase A. As a result of the dose trial with Chitinase A enzyme, the LD₅₀ value was determined as 1095.31 ng/μl and the LT₅₀ value was 2.17 days. As a result, it was determined that the chitinase enzyme of *S. ficaria* is an effective potential bioinsecticide that can be used in the fight against *P. brassicae*.

2023, 48 Page

Keywords: *Pieris brassicae*, *Serratia ficaria*, Chitinase enzyme, Biological control

TEŞEKKÜR

Erzurum Teknik Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim süresince destek, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek bana yol gösteren, yaşadığım zor süreçleri atlatarak akademik eğitimime dört elle sarılmamı sağlayan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gözde Büşra EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jürisi üyelerim sayın Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ ve Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezim süresince laboratuvar alt yapı imkanlarından faydalanmamı sağlamaları nedeniyle ETÜ Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan, bana eğitim ve araştırma sevgisini aşılayan ayrıca beni bu günlere getiren annem Hatice Zühal BAKIRDÖĞEN'e ve babam Ömer BAKIRDÖĞEN'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik eğitim sürecim boyunca tüm desteği ile yanımda olarak bana güç veren Süleyman BAKAR, Hüma Sude ÖZKAYA, Zeynep ÖZMAN, Aylin GÜLTEKİNOĞLU, Elif YILMAZ, Mehmet YILMAZ ve Merve ALYAR'a en içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Merve Almula BAKIRDÖĞEN
Aralık 2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Pieris brassicae</i> L. (Lepidoptera: Pieridae) (Büyük Lahana Kelebeği)	4
1.1.1. Biyolojisi	5
1.1.2. Zarar şekli, ekonomik önemi ve yayılışı.....	7
1.1.3. Mücadele yöntemleri ve doğal düşmanlar	8
1.2. Kitinaz Enzimi	11
1.3. Büyük Ölçekli Enzim Üretimi	17
1.3.1. Derin fermentasyon	17
1.3.2. Katı faz fermentasyonu	18
1.4. <i>Serratia ficaria</i>	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Örneklerin Elde Edilmesi	25
3.2. Enfeksiyonun Tespiti	25
3.2.1. Işık mikroskopisi	25
3.3. Bakterilerin Kültüre Edilmesi.....	25
3.3.1. gece kültürü	26
3.4. DNA İzolasyonu.....	26
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
3.6. Bakteri Kitinaz Geninin Çoğaltılması	27
3.6.1. Kitinaz genlerini çoğaltmak üzere uygun primerlerin dizaynı	27
3.6.2. Kitinaz genlerinin PZR yöntemi ile çoğaltılması	28
3.6.3. Gibson klonlama yöntemi ile kitinaz genlerinin çoğaltılması	29

3.7. Peptitlerin sentezlenmesi.....	30
3.8. His-tag yardımıyla peptidlerin saflaştırılması.....	30
3.9. Larvaların Damlacık Yedirme Yöntemi ile Enfeksiyonu	31
3.9.1. En etkili enzimin belirlenmesi	31
3.10. Doz Denemesi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1. Bulgular	33
4.1.1. Larvaların kültüre edilmesi.....	33
4.1.2. Bakterilerin kültüre edilmesi	33
4.1.3. DNA izolasyonu	34
4.1.4. 16S rRNA kısmi bölgesinin amplifikasyonu ve dizilemesi	34
4.1.5. Kitinaz genlerinin PZR ile çoğaltılması	34
4.1.6. Plazmit örneklerinin sekanslanması	35
4.1.7. Peptidlerin saflaştırılması	36
4.1.8. Virülans testi	37
4.1.9. Doz denemesi	38
4.2. Tartışma	40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
kDa	Kilodalton
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°	Derece
rcf	Dakikadaki dönüş sayısı
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı

Kısaltmalar

DNA	Deoksiriboz nükleik asit
GH	Glikosil hidrolaz
KFF	Katı faz fermentasyonu
LD	Lethal doz
LT	Lethal zaman
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNAz	Ribonükleaz
rRNA	Ribozomal RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Pieris brassicae</i> 'nin yaşam döngüsü.....	6
Şekil 1.2. <i>P. brassicae</i> larvasının yumurtadan çıkmasından itibaren kelebek olana kadar larva evreleri	7
Şekil 1.3. Kitin molekülünün formülü	12
Şekil 1.4. Kitinaz enziminin böcek bağırsağındaki etki mekanizması.	17
Şekil 1.5. <i>Serratia ficaria</i> bakteri genom haritası.....	20
Şekil 3.1. Tezde kullanılan yöntemlerin iş akışı.....	24
Şekil 3.2. Saha çalışmasında larva ve yumurta toplanması	25
Şekil 3.3. pET3-a vektörü.....	30
Şekil 4.1. Deneyde ölen ve homojenize edilen larvalar	33
Şekil 4.2. <i>S. ficaria</i> 'ya ait PZR ile çoğaltılmış kitinaz genleri.....	35
Şekil 4.3. Koloni tarama PZR sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü.	35
Şekil 4.4. His-taq ile saflaştırılmış kitinaz enzimlerinin SDS-PAGE analizi.....	37
Şekil 4.5. Saflaştırılmış Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimlerinin 3. dönem <i>P. brassicae</i> larvaları üzerinde tarama testi verileri..	38
Şekil 4.6. Saflaştırılmış Chit-A enziminin 3. dönem <i>P. brassicae</i> larvaları üzerinde doz testi verileri.....	39
Şekil 4.7. Aynı anda yumurtadan çıkan larvalar.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kimyasal insektisitler ve formülasyonları	10
Çizelge 1.2. <i>Serratia</i> 'ya ait her türün sık görülen izolasyon kaynakları	15
Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Modelleri	24
Çizelge 3.2. Vektöre spesifik primer sekansları	28
Çizelge 4.1. <i>Pieris brassicae</i> orijinli <i>S. ficaria</i> 'ya ait kitinaz A, B ve D genlerine ait nükleotid sıralarının literatürdeki sıralar ile karşılaştırma sonuçları	36
Çizelge 4.2. En etkili enzim olan Chit-A'nın LD ₅₀ değeri.	39



1. GİRİŞ

Brassicaceae (Lahanagiller) familyasında bulunan sebzeler, sağlık ve besin değeri açısından oldukça önemlidir. Özellikle bu familyadan olan lahananın ülkemiz ve Dünya tarım arazilerinde yetiştiriciliği sıklıkla yapılmaktadır. Bu nedenle hem dünya hem de ülkemiz ekonomisi için ciddi bir öneme sahiptir. Dünya genelinde lahana grubu sebzelerin yıllık üretimi yaklaşık 71.000.000 tondur. 2022 yılı TÜİK verilerine göre ülkemiz tarım arazilerinde lahana türleri 47.000 ha alanda 964.296 ton üretilmektedir (Ölmez vd 2021).

Lahanagiller tüm dünyada temel gıda maddesi olarak kabul edilmektedir. Brassicaceae veya hardal ailesi, dünya çapında dağılan yaklaşık 338 cins ve yaklaşık 3.709 türden oluşan monofiletik bir gruptur. Ekonomik açıdan önemli pek çok süs ve mahsul türünü (sebzeler veya endüstriyel ve yemeklik yağ kaynakları, yem ve çeşniler) içermektedir (Al-Shehbaz et al. 2006). Brassicaceae familyası sebzeleri dünya çapında geniş bir dağılıma sahiptir ve Antarktika hariç tüm kıtalarda bulunabilmektedir (Ramirez et al. 2006).

Brassicaceae türleri sadece insan ve hayvan tüketimi için yüksek yağ ve protein içerikleriyle tanınmakla kalmaz, aynı zamanda vitaminler, mineraller, karbonhidratlar, amino asitler ve farklı fitokimyasal grupları da içermektedirler. İçerdikleri fitokimyasallar, Brassicaceae familyası sebzelerinin bildirilen antioksidan, antikanserojenik ve kardiyovasküler koruyucu aktivitelerine katkıda bulunmaktadır (Jahangir et al. 2009).

Ülkemizde yetiştirilmekte olan lahana türleri ise bölgesel olarak farklılık göstermektedir. Karadeniz bölgesinde yoğun olarak yaprak lahana (*Brassice oleraceae* var. *acephala*) yetiştirilirken, Doğu Anadolu'da beyaz baş lahana (*Brassice oleraceae* var. *capitata*), batı ve güney bölgelerine bakıldığında sıklıkla kırmızı baş lahana (*Brassice oleraceae* var. *rubra*) yetiştirildiği görülmektedir (Bekircan 2012) .

Birçok zararlı ve hastalık etmeni gerek tarım ve ekonomi gerekse sağlık ve besin değerleri açısından oldukça önemli olan lahana türlerinin üretim, ürün kalite ve veriminde düşüşe neden olmaktadır. Bu zararlı etmenler temel olarak iki gruba ayrılarak abiyotik ve

1. GİRİŞ

biyotik etmenler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Lahana yetiştiriciliğine olumsuz etki eden biyotik etmenlerin başlıcası pest olarak adlandırılan zararlı böceklerdir. Bu familyanın en önemli zararlıları Lepidoptera takımında yer almaktadır.

Büyük lahana kelebeği, *Pieris brassicae* lahana üretimi ve ürün kalitesini çok olumsuz etkileyen ciddi bir zararlıdır. Ülkemizin yanı sıra Dünya genelinde de lahana türlerinin yanı sıra karnabahar ve brokoli zararlısı olarak kaydedilmiştir. Ayrıca şalgam, turp ve hardala da saldırmaktadır. İstila ettikleri bitkinin yaprak, dal, tohum gibi tüm kısımlarını yiyerek ekonomik açıdan ciddi zararlara neden olmaktadır (Sharma and Gupta 2009).

Büyük lahana kelebeği, istila ettiği bitkinin yapraklarının tüketebileceği kısımlarının tamamını tükettikten sonra beslenmesine devam etmek için alandaki diğer bitkilere yayılmakta ve hızlı bir şekilde alanın büyük bir kısmındaki bitkilere zarar vermektedir. Yapraklarını kaybetmiş olan lahana bitkileri gelişimleri için ihtiyaç duydukları ışık ve nem gibi hayati unsurlardan mahrum kalarak gelişimi tamamlayamamaktadır. Bunun sonucu olarak lahana türleri üretimlerinde ciddi miktarlarda yıllık ürün kayıpları meydana gelmektedir.

Hem Dünyada hem de ülkemizde büyük lahana kelebeğinin neden olduğu zararın önüne geçmek için büyük miktarda emek, zaman ve maddi güç harcanmaktadır. Lahana türlerinin yetiştirilmesinde zararlı böceklerle mücadele etmekte de diğer tarım ürünlerinde olduğu gibi kimyasal insektisitler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Pestisitler, bitkileri zararlılardan, yabancı otlardan veya hastalıklardan korumak için esas olarak tarımda kullanılan maddeler veya madde karışımlarıdır. Pestisitler, mantar öldürücüler, herbisitler, kemirgen öldürücüler ve bitki büyüme düzenleyicileri tipik örneklerdir. Pestisitlerin birçoğu sağlık ve çevre sorunları ile yakından ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle bazı pestisitlerin tarımsal kullanımı terk edilmiştir. Pestisitlere maruz kalma, ciltle temas, yutma veya soluma yoluyla olabilmektedir (Onaran vd 2000). Pestisit türü, maruz kalma süresi ve yolu ve bireysel sağlık durumu olası sağlık sonuçlarında belirleyici faktörlerdir. Bir insan veya hayvan vücudunda, pestisitler vücut yağında metabolize edilebilmekte, atılabilmekte, depolanabilmekte veya biyolojik olarak

1. GİRİŞ

birikebilmektedir. Kimyasal pestisitlerle ilişkilendirilen sayısız olumsuz sağlık etkisi, diğer etkilerin yanı sıra dermatolojik, gastrointestinal, nörolojik, kanserojen, solunum, üreme ve endokrin etkileri içermektedir. Ayrıca, pestisitlere mesleki, kazara veya kasıtlı olarak yüksek düzeyde maruz kalma, hastaneye yatış ve ölümle sonuçlanabilmektedir. Genellikle uygulanan konsantrasyonlar yasal olarak belirlenmiş güvenli seviyeleri aşmamaktadır. Bununla birlikte, bu "güvenli sınırlar" sinerjistik etkilere sahip olabilecek iki veya ikiden fazla kimyasal maddeye aynı anda maruz kalma durumunda olduğu gibi ciddi sağlık riskleri yaratabilmektedir. Yapılan çalışmalarda insanlarda anne sütü örneklerinde pestisit kalıntıları tespit edilmiştir. Bebeklerde doğum öncesi anne karnında maruz kalma ve ileri dönemdeki çocuklarda sağlık etkileri hakkında endişeler ortaya çıkmıştır (Eroğlu 2020).

Bunlara ek olarak kimyasal pestisit kullanımının sınırlandırıcı sonuçlarından bir diğeri ise zamanla gelişmiş olan dirençtir. Tarım zararlılarına özellikle de kontrolsüz uygulanan kimyasal pestisitler zaman içerisinde böceklerde direnç mekanizmasının gelişmesine neden olmuştur. Bahsedilen bu direnç gelişimi sonucu uygulanan yasal kimyasal pestisit miktarı ne yazık ki zararlıları öldürmemekte bu nedenle üreticilerin daha fazla kullanmasına neden olmaktadır. Bu durum bir kısır döngüyü doğurarak dirençle artan kimyasal pestisit uygulaması sonucu daha fazla direnç gelişimi meydana gelmektedir. Kazanılan bu direnç mekanizması yeni doğacak böcek nesline de aktırılmaktadır. Yeni doğan larvalar doğal olarak dirençle gelişerek ileri evrelerde de kimyasal pestisitlerden etkilenmemektedir (Özcan 2010).

Kimyasal ilaçların, zamanla böceklerde direnç oluşturmasıyla birlikte hedef organizmaya özgü olmadıkları için yararlı böceklerin ölmesine sebep olması artan talebe neden olarak gösterilebilir. Ayrıca uygulama sonrasında toprakta birikerek, havaya ve suya karışarak, insan sağlığının yanı sıra bitkilere ve diğer omurgalı canlılara da zarar verdiği bilinmektedir (Eroğlu 2020).

Kimyasal pestisitlerin kullanımının neden olduğu bu ciddi sağlık tehditlerinin yanı sıra iş gücü ve ekonomik yükü göz önüne alındığında, bir süredir tarımda kimyasal pestisitlerin kullanımında ciddi bir azalmayı içeren yeni bir konsepte olan acil ihtiyaç gündeme gelmiştir (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016). Tarım zararlılarını kontrol etmek

için kimyasal ürünlere alternatif olarak kullanılan çevre dostu entomopatojenik mikroorganizmalara olan talep bu doğrultuda gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde mikrobiyal biyopestisitlere olan ilgi, gıdalarda kimyasal içermeyen kalıntılara yönelik toplumsal, hükümetssel ve pazar odaklı talepler, kimyasal pestisitlere bağımlılığın azalması ve organik tarımın artan büyümesi ile dünya çapında büyük bir ivme kazanmıştır (Mascarin and Jaronski 2016).

Alternatif mücadele yöntemlerinden hem insan ve çevreye karşı zararlı etkilerinin hem de maliyetinin minimum düzeyde olması beklenmektedir. Bu nedenle son zamanlarda biyolojik insektisit geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar daha fazla önem kazanmıştır. Bu çalışmalarda zararlı böcekleri doğal şekilde hasta edecek ve ekonomik zarar eşiğinin altına düşürecek etmenler üzerinde durulmaktadır.

1.1. *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) (Büyük Lahana Kelebeği)

Pieris brassicae L.; hayvanlar (*Animalia*) alemi, eklem bacaklılar (*Arthropoda*) şubesinde yer almaktadır. Büyük Lahana Kelebeği ismiyle tanınan bu tür, böcekler (*Insecta*) sınıfındaki pul kanatlılar (*Lepidoptera*) takımına aittir ve *Pieridae* familyasının *Pieris* cinsinin içinde bulunmaktadır (Bekircan 2012).

Alem: Hayvanlar (*Animalia*) Altalem: Bilateria

Şube: Eklem bacaklılar (*Arthropoda*) Alt Şube: Hexapoda

Sınıf: Böcekler (*Insecta*) Altsınıf: Dicondylia

Üsttakım: Panorpida

Takım: Pul kanatlılar (*Lepidoptera*)

Familya: Pieridae

Altfamilya: Pierinae

Cins: *Pieris*

Tür: *Pieris brassicae*

1.1.1. Biyolojisi

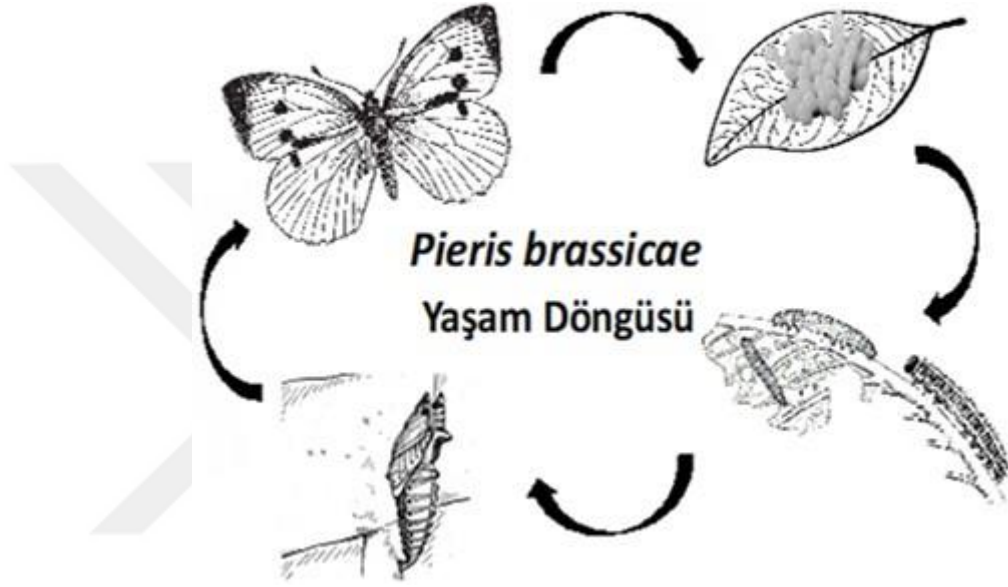
Kanatları kremimsi beyaz renktedir. Üst kanadın ön kenarının dış köşesinden itibaren aşağı kısma inen yarım daire şeklinde siyah bir leke yer almaktadır. Ek olarak dişilerde ön kanatların ortasına doğru 2 siyah yuvarlak şekilde leke vardır. Erkeklerde ise alt kanatların üzerinde küçük siyah leke vardır. Yumurtalar bırakıldıkları ilk dönemde açık sarı renkte olup, daha sonra koyulaşarak limon sarısı rengine dönüşmektedir. Yumurtalar grup olarak, birbirine paralel sıralar halinde dizili bulunmaktadır. Üzerlerinde 12 sıra çizgi yer almaktadır. Bu çizgiler yumurtanın üst ucunda birleşir. Ayrıca yumurtalar kendi aralarında enine yer alan çok sayıda çizgiler ile bağlanmıştır. Larvaların yumurtadan çıkışı yaklaşık 6-10 gün sürmektedir. Larvalar yumurtadan çıktıklarında sarımsı renklidir. Baş bölgesi koyu renk ve 1 mm uzunluğundadır. Yumurtadan çıkan larvalar koloniler halinde bitkinin yaprakları üzerinde bulunur ve yaprakları yiyerek beslenirler. Koloniler ikinci gömlek değişimi sonrasında dağılır. Ardından 4 veya 5 larva grupları şeklinde beslenmeye devam ederler. Larva olgunlaştığında 4-5 cm boyuna erişir. Yeşil-gri renkli vücut ve siyah başa sahiptir. Vücut bölgesinde uzunlamasına yer alan üç sarı renkli çizgi vardır. Karın kısmı ise sırt bölgesine kıyasla açık renklidir. Ayrıca karın bölgesinde siyah beneklere sahiptirler. Lahana keleşi pupalarının göğüs bölgesi bir yere bağlı şekilde bulunmaktadır. Pupalara boyutu 3 cm olup çok sayıda köşesi vardır. Yeşil renklidir ve üzerinde siyah-sarı lekeleri vardır (Anonim 2008).

Büyük lahana keleşleri kış mevsimini pupa dönemine girerek geçirmektedir. Ülkemizde pupa evresinden sonra ergin keleş çıkışı bölgelere ve bölgelerin iklim şartlarına göre farklılık göstermektedir. İklimi diğer bölgelere kıyasla daha ılıman olan ege bölgesinde şubat ayının son yarısında pupadan ergin çıkışı gözlenmektedir. Ege bölgesine kıyasla daha soğuk diğer bölgelerimizde erginlerin çıkışı nisan ayını bulmaktadır. Yine ergin çıkışı gibi döl sayısı da iklime bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ülkemiz iklim koşullarında ise 2-6 döl vermektedir (Anonim 2010).

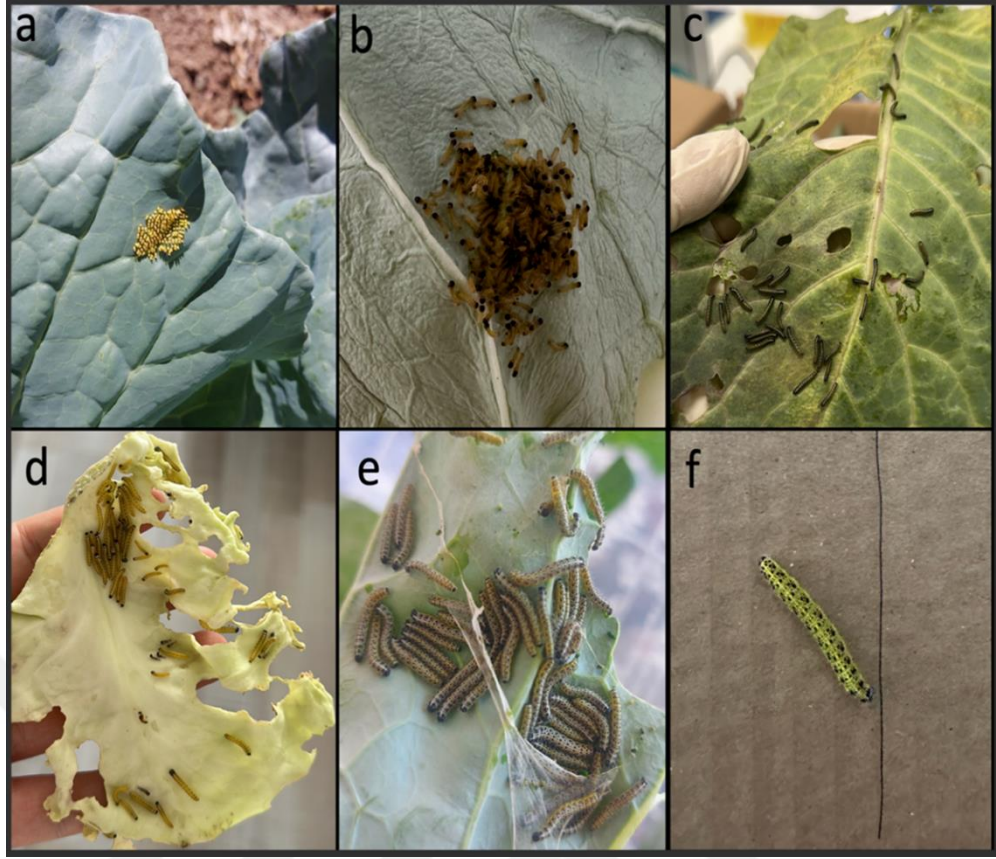
Larvalar ileri evrelerde gelişimini tamamladıktan sonra, bulundukları bitkiyi terk etmekte, çevredeki ağaç gövdeleri ya da çeşitli bitkisel atıkların üzerinde pupa olmaktadır. Büyük lahana keleşi pupaları bulundukları yerde göğüs bölgelerinden zemine tutunmaktadır. Pupa dönemini tamamlamaları ise yaklaşık 10-15 gün sürmektedir. Büyük lahana keleşlerinin hayat döngüleri larvaların yumurtadan çıkışı

1. GİRİŞ

ile başlamaktadır. Yumurtadan çıkan büyük lahana kelebeği larvaları, konak bitkinin üzerinde beslenmeye başlarlar ve 20 gün sonunda uygun yeri bularak metamorfoz sürecini geçireceği pupa evresine girmektedirler. Pupa evresindeki değişim sürecini tamamlamaları 20 gün kadar sürer. Pupa evresini tamamladıktan sonra kelebek halinde kozadan çıkmaktadırlar. Kelebek olarak ise yaklaşık 1-2 ay yaşamaktadırlar (Şekil 1.1 ve Şekil 1.2). Ergin bireyler yumurta bıraktığında yaşam döngüsü tekrar başlamaktadır (Bekircan 2012).



Şekil 1.1. *Pieris brassicae*'nin yaşam döngüsü (Papazian 2017)



Şekil 1.2. *P. brassicae* larvasının yumurtadan çıkmasından itibaren kelebek olana kadar larva evreleri. a) yumurta, b) 1.dönem, c) 2.dönem, d) 3.dönem, e) 4.dönem ve f) pupaya girmeden önceki son evre 5.dönem larva.

1.1.2. Zarar şekli, ekonomik önemi ve yayılışı

Büyük lahana kelebeği bitkilere larva evresinde zarar vermektedir. Yumurtadan çıkışlarını takip eden iki evrede larvalar bitki yapraklarında toplu şekilde yer almaktadır. Bitki yapraklarındaki damar aralarını kemirerek beslenmektedir. Sonraki larva evrelerinde ise bitkinin tamamına dağılarak beslenmeye devam etmektedirler. Bitki yapraklarının kalın damarlar dışında tamamını yerler. Larva istilası sonucunda yoğun zarara uğramış alanlardaki bitkiler çalılışmış biçimde görünmektedir (Sönmez 2015).

Larvalar beslenme sonrası bitki yapraklarını dışkıları ve yağmurun etkisiyle bu dışkıları bitkilerin ortasında birirmektedir. Bu da bitkinin cazip halde olmaması ve yenemez duruma gelmesine sebep olur. Böylece larvalar hem bitki yapraklarını kemirerek zarar verirken hem de bitkinin kirlenmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise bitkilerde ürün kayıpları yaşanmakta ve bitkinin ekonomik değeri düşmektedir.

Büyük lahana kelebeği larvaları bitkilerin yapraklarını yiyerek birincil büyük zararları oluşturmaktadır. Bununla kalmayıp aynı zamanda şalgam kırışıklık ve şalgam sarı mozaik virüsü gibi virüs hastalıklarının vektörlüğünü yaptıkları bilinmektedir (Anonim 2010).

Büyük lahana kelebeği polifag beslenme şekline sahip olması nedeniyle hem ülkemizde hem de dünya genelinde birçok sebzenin üretiminde büyük zarar ve kayıplara sebep olmaktadır. Zararlısı olduğu sebze türlerinin yıllık üretiminde yaklaşık %40 kadar ürün kayıplarına neden olduğu kaydedilmiştir (Arshad and Parvez 2007).

Büyük lahana kelebeği, dünya geneline bakıldığında İngiltere, Çin, Afrika güney sahilleri ve Şili dahil olmak üzere geniş alana yayılım göstermekte ve üretimi sınırlandırmaktadır. Larvalar aynı ekili arazide bir bitkiden diğerine geçerek yakın bölgelere hızla yayılmaktadır. Aynı zamanda ergin bireyler daha uzak alanlara topluca göç edebilmekte ve bunun sonucunda ise geniş alanlara yayılarak hızla ürünleri istila edebilmektedir (Bekircan 2012).

1.1.3. Mücadele yöntemleri ve doğal düşmanlar

Diğer tarım bitkilerinde olduğu gibi, Brassicaceae familyasına ait sebzelerin üretimlerinde verim ve kalitenin artırılması için, gübreleme, sulama gibi bazı tarım teknikleriyle beraber hem hastalıklar hem de zararlıların tespiti ve mücadelesi oldukça önemlidir.

Hem ülkemizde hem de dünya genelinde *P. brassicae* ile mücadelede birçok farklı çeşit kimyasal insektisit yaygın olarak kullanılmaktadır (Çizelge 1.1). Kimyasal pestisit kullanımı zararlılarla mücadelede her zaman başarılı olamamakta ve Brassicaceae sebzelerinin yaprakları ve çiçekleri gibi ilaca direkt temas eden kısımları tüketildiği için başlıca insan sağlığına zarar vermektedir. Ek olarak kalıntı bırakarak çevreyi kirletmekte ve hedef organizmaya yönelik olmadığı için çevrede yaşayan diğer canlıların da ölümüne neden olmaktadır (Tozlu vd 2002).

Sebzelerin belirlenen standartlar doğrultusunda son ilaçlama ile hasat zamanı arasında geçmesi gereken uygun süre üreticiler tarafından dikkate alınmamaktadır. Bunun sonucunda insan ve çevre sağlığı açısından doğru sıklık ve miktardan daha fazla kimyasal pestisit uygulaması yapılmaktadır. Kimyasal pestisitlerin uzun vadede bu yanlış kullanımının zararlının direnç mekanizmaları geliştirmesi ile sonuçlandığı bilinmektedir.

Kimyasal pestisit kalıntıları içeren bu ürünlerin piyasaya sunulması ile doğrudan insan tüketiminin sonucu olarak kronik zehirlenme vakaları başta olmak üzere başka pek çok sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu sebepler göz önüne alındığında son yıllarda sebze zararlıları ile mücadelede kimyasal pestisitlere alternatif olacak çeşitli yöntemlerin tespiti önem kazanmış ve araştırmalara ağırlık verilmiştir (Akdağcık 2010).

Pieris brassiae'nın doğal düşmanlarından biri ise *Pieris brassicae* granülovirüs olarak adlandırılan bakülovirüs ailesine ait bir virüstür. Bakülovirüsler, böceklerde hastalık oluştururlar ve böceklerin ölümlerine neden olurlar. Virüslerin etrafında yer alan protein örtüye ek farklı bir protein yapı olan inklüzyon cisimciği içine gömülü şekilde bulunmaktadır. Bakülovirüsler larvalar tarafından ağız yolu ile tüketildiğinde enfeksiyona neden olur. Omurgalı canlılarda ise enfeksiyona neden olmazlar. Konak spektrumları dardır. Larvalar tarafından virüsün ağız yoluyla tüketiminin ardından orta bağırsaktaki uygun pH ile inklüzyon yapılarından kurtularak enfeksiyonu başlatırlar. Kitin yapıdaki peritrofik membranı parçalarlar. Orta bağırsak epitelini geçtikten sonra enfeksiyon hızla tüm vücuda yayılır ve süreç kısa sürede larva ölümü ile sonuçlanmaktadır (Eroğlu 2020). *Pieris brassicae* granülovirüsü biyolojik mücadelede yüksek kullanım potansiyeline sahip olmasına ek doğa şartlarına dayanımı açısından zayıftır.

1. GİRİŞ

Çizelge 1.1. Kimyasal insektisitler ve formülasyonları (David 1978)

Etken Madde	Formülasyon	Miktar
Bromophos 360 g/l	SIVI	100 ml
Carbaryl %5	TOZ	3 kg/da
Carbaryl %50	TOZ	200 g/da
Chlorpyrifos Methyl 227 g/l	SIVI	150 ml
Diazinon 185 g/l	SIVI	200 ml/da
Dichlorvos 550 g/l	SIVI	200 ml/da
Fenitrothion %3	TOZ	3 kg/da
Fenitrothion %40	TOZ	200 g
Malathion %25	TOZ	400 g/da
Malathion %5	TOZ	3 kg/da
Malathion 190 g/l	SIVI	500 ml/da
Malathion 650 g/l	SIVI	170 ml/da

Mekanik mücadele teknikleri tarım zararlılarıyla mücadelede kimyasal mücadeleye alternatif tekniklerden biri olarak gösterilebilir. Bu yöntem büyük lahana keleşi yumurtalarının ve larvalarının alanlarda toplu şekilde bulunmasından faydalanılarak toplanıp imha edilmesi yoluyla uygulanmaktadır. Bu yöntemin yüksek iş gücü ve zorluğu nedeniyle özellikle geniş tarım arazilerinde uygulanabilirliği çok sınırlıdır. Uygulanabilirliği, hedefe yönelik olması ve kalıntı bırakmaması gibi birçok avantajları düşünüldüğünde “Biyolojik Mücadele” çevre ve sağlık açısından günümüzde en verimli mücadele yöntemidir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar ile büyük lahana keleşinin yumurta, larva ve pupa dönemlerinde çok sayıda paraziti, parazitoidleri ve patojenleri olduğu keşfedilmiştir. Böylece biyolojik mücadele yöntemleri ile ilgili çalışmalara yönelim artmıştır.

Biyolojik Mücadele, zararlıların bazı bitkiler ve diğer canlı organizmaların yardımı ile ilgili zararlının ekonomik zarar eşliğinin altında tutulmasıdır (Öztemiz 2008).

1. GİRİŞ

Larva, pupa ve yumurta parazitoidleri, nematodlar, bazı mikrosporadia ve entomopatojenik bakteriler büyük lahana kelebeği ile mücadelede halihazırda kullanılan ve kullanılma potansiyeli olan biyolojik mücadele ajanlarıdır. Şimdiye dek *Cotesia rubecula*, *Cotesia glomeratus*, *C. nothus*, *Exorista larvarum*, *Exorista segregata*, *Allothrombium* sp, *A. glomeratus*, *Chrysoperla carnea*, *Chelonus oculator*, *Pontia dablidice*, *Phryxe vulgaris*, *Hyposoter didymator*, *Hyposoter ebeninus* türleri larva parazitoidleri olarak literatürde tanımlanmıştır (Bekircan 2012).

P. brassicae'ya karşı etkili *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* türü funguslara ait lipaz, proteaz ve kitinaz aktiviteleri tespit edilmiştir (Dhawan and Joshi 2017).

Steinernema carpocapsae türü ise entomopatojenik nematot olarak literatürde araştırmada yer almakta ve büyük lahana kelebeği ile mücadelede potansiyel biyoinsektisit olarak tanımlanmaktadır (Kasi et al. 2021).

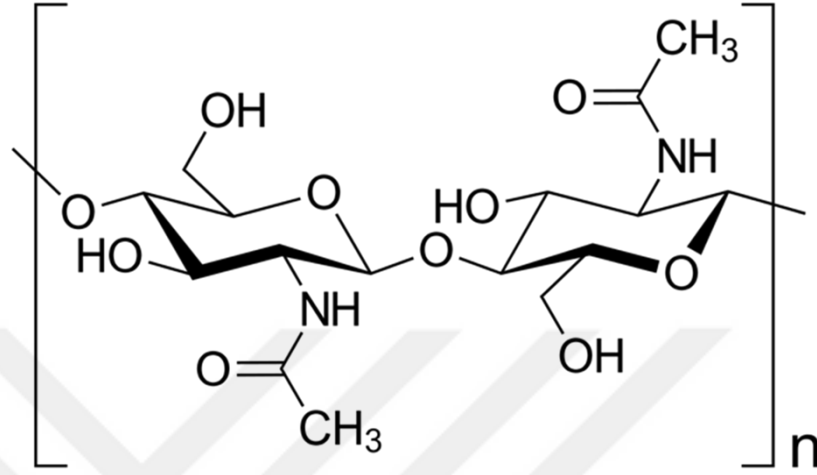
Büyük lahana kelebeğine karşı kullanılma potansiyeli tespit edilmiş ve hastalık oluşturduğu bilinen entomopatojenik bakteri türleri de mevcuttur (Yaman ve Demirbağ 2000). Bunlar; *Bacillus* spp. suşları, *Micrococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Xanthomonas campestris* türleridir (Sewak et. al. 2021)

1.2. Kitinaz Enzimi

Kitin, birçok canlı organizma tarafından üretilen önemli bir doğal polisakkarittir ve selülozdan sonra en bol bulunan ikinci karbon polimeri olarak kabul edilir. Eklembacaklıların dış iskeletinde, mantar hücre duvarlarında ve yengeçler, karidesler, ıstakozlar, diatomlar, nematodlar, kabuklular ve diğer omurgasızlar gibi diğer birçok canlı organizmada bulunan ve esas olarak güçlendirme ve takviye maddesi olarak görevli yapısal bir polimerdir (Williams et al. 2022). Ayrıca böcek bağırsakları peritrofik membran olarak adlandırılan koruyucu bir zarla kaplıdır. Kitin ise birçok böceğin bağırsağını kaplayan koruyucu kılıf olan peritrofik zarın ana bileşenidir. Bu membran, böceklerdeki bağırsak epitelini hem fiziksel hasar hem de patojenlere karşı koruyan bir bariyer görevi görmektedir. Böceklerin orta bağırsağının epitel dokusu onlar için

1. GİRİŞ

hayatidir. Böcek beslenmesi, peritrofik membran tarafından korunmaktadır. Bu bariyer kitinazlar tarafından kolayca parçalanabilir. Bu bariyerdeki bozulma nedeniyle böcek beslenmesi durdurulabilmekte ve epitel savunulamaz hale gelebilmektedir. Bu durumun sonucu çoğunlukla böceklerde ölümdür (Bahar vd 2012).



Şekil 1.3. Kitin molekülünün formülü (Sreeraman et al. 2016)

Kitinazlar, yukarıda bahsedilen çeşitli canlılar tarafından üretilen her yerde bulunan bir polimer olan kitinin parçalanmasını katalize etmektedir. Tıpta, tarımda, gıda ve ilaç endüstrilerinde ve çevre yönetiminde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Endüstriyel olarak faydalı ürünlerin üretimi için kitinin parçalanmasındaki ve mantar patojenleri ile böcek zararlılarının kontrolündeki rolleri, onları bu tür amaçlar için ilgi çekici kılmaktadır (Kumar et al. 2022). Kitinaz enzimi kitinin monomerlerine hidrolizini kataliz etmektedir. Kitinazlar, kristalin polisakkaritlerin parçalanmasında oynadıkları anahtar rollerden dolayı faydalı pratik uygulamalara sahip enzimler arasındadır. Protein mühendisliği çalışmaları için cazip kılan ilginç özelliklere sahiptirler ve araştırmacılar arasında giderek artan bir ilgi görmektedirler. Kitinazlar, selülozdan sonra bol miktarda bulunan ve mantar hücre duvarlarının, böceklerin dış iskeleti ve bağırsak duvarının yapısal çerçevesinin ana bileşeni olan kitin (C₈H₁₃O₅N)_n'deki β -1 $\rightarrow$ 4-bağlarının bozunmasını kataliz etmektedir. Bu enzimler, *Metarhizium anisopliae* gibi mantarlar, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* ve *Serratia* cinsi bakteriler tarafından doğal olarak sentezlenmektedir (Oyeleye and Normi 2018). Bir dizi saprofitik bakteri ve mantarın yanı sıra mikoparazitik ve entomopatojenik mantarlar, farklı roller oynayan kitinazlar üretmektedir. Kitinolitik enzimler, bitki patojenlerinin ve böcek zararlılarının biyolojik kontrolüne önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Kitinaz

enzimi günümüzde biyoteknolojik olarak önem kazanmaya başlamıştır. Son yıllarda, kitin parçalayıcı enzimler, insan sağlığı ile ilgili araştırmalarda yüksek maliyetli, düşük hacimli ürünler oluşturmaktadır. Ayrıca kitinazlar tarımda bitki patojeni mantarları ve böcekleri kontrol etmek için oldukça yüksek potansiyele sahiptir. Kitinazların özellikle tarım için yüksek hacimli, düşük maliyetli bir ürün olarak kullanılabilmesindeki başarı, makul bir maliyetle oldukça aktif preparasyonların üretimine bağlıdır. Bu nedenle, kitinolitik enzimlerin uygulamalarda, örneğin biyokontrol uygulamalarında, konak-patojen etkileşimi, kitinin parçalanmasının farklı mekanizmaları ve değişen özgülüklere sahip yeni enzimlerin tanımlanması, onları yakın gelecekte çeşitli ticari uygulamaları için daha yararlı hale getirebilir.

Bacillus, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* ve *Aeromonas* cinsi bakteriler sıklıkla toprakta bulunur ve kitin atıklarının geri dönüşümü için potansiyel olarak uygun enzim kaynaklarıdır. Kitinolitik bakterilerin çeşitliliği zengindir ve farklı kitinazlar için keşfedilmemiş birkaç kültürlenebilir kaynak olasılığı mevcuttur (Aggarwal et al. 2015).

Doğada üç farklı kitin kristal formu bulunur,

- (i) Güçlü hidrojen bağına ve antiparalel zincirlere sahip en bol bulunan ek olarak daha kompakt olan **α -Kitin**,
- (ii) Moleküller arası zayıf paralel zincirlere sahip nadir ve gevşek bir şekilde paketlenmiş olan **β -Kitin**
- (iii) Son olarak paralel ve antiparalel zincirlerin bir karışımına sahip **γ -Kitin**.

Ayrıca kitinolitik enzimler, glikosil hidrolaz (GH) aileleri 18, 19 ve 20 olarak sınıflandırılmaktadır (Yaman ve Demirbağ 2000). Bakteriyel kitinazların boyutları 20 ila 60 kDa arasında değişmektedir. GH 18 kitinaz ailesi, bakteriler, mantarlar ve böceklerde karakterize edilmiştir. Bunlar, gelişimsel işlevler veya savunma mekanizmaları olarak kitini parçalamak için birden fazla çeşitli kitinaz enzimlerinin sinerjistik olarak salgılandığı oldukça verimli bir kitin hidroliz mekanizması geliştirmiştir. Bu sinerjistik özellik, özellikle dört adede kadar kitinolitik enzim üreten *Serratia marcescens*'te deneysel olarak kanıtlanmıştır. Bakteriyel kitinazlar, A ve B alt ailelerine ayrılmaktadır. Bu gruplar, yalnızca A alt ailesinde bulunan bir kitin yerleştirme alanının varlığında

farklılık göstermektedir. GH 18 ailesine ait kitinazları üreten bakteriler, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Chromobacterium* ve *Yersinia* cinslerini içermektedir. Çoğu kitinaz enzimi yine A, B ve C olmak üzere üç alt aileye ayrılan GH 18 ailesine girmektedir. A alt ailesi, katalitik alanda $\alpha + \beta$ ekleme alanını içerirken, B ve C alt ailelerinde bu alan yoktur (Oyelele and Normi 2018). *S. marcescens* gibi bazı *Serratia* türleri tarafından sentezlenen o kitinaz enzimlerinden bir diğeri Kitinaz D'dir. Kitinaz D de GH 18 ailesine aittir. Kitinaz D diğr kitinaz enzimleri gibi tarımsal biyolojik ve çevresel uygulamalar için kullanılma potansiyeline sahiptir (Vainkuntapu et al. 2016).

Kitinazlar 3 enzim kompleksi ihtiva etmektedir. Bunlar endokitinazlar, ekzokitinazlar ve kitobiazlardır. Bu 3 grupta sınıflandırılan kitinazların kitin ve kitin türevlerini parçaladıkları bilinmektedir. Endokitinazlar kitin polimerlerini içten parçalamaktadır. Ekzokitinazlar ise kitobiozu bir uçtan salarak işlev görmektedirler. Beta-Nasetil glikozaminidaz N-asetil glikozamin monomerlerini kitinden çıkarır ve kitobiaz da kitobiozu N-asetil glikozamine hidroliz etmektedir. Kitinazlar çok sayıda mikroorganizma türleri tarafından sentezlenmektedir (Kuzu 2008).

Serratia türü bakteriler tarafından üretilen kitinazlar, en etkili kitinazlardır. Bu türün birkaç suşunun, Chit-A, Chit-B, Chit-C1, Chit-C2 (Chit-C1 üzerinde proteolizin sonucu), CBP21 (varsayılan kitin bağlayıcı protein) ve Chit-D (transglikosile edici kitinaz) gibi GH 18'e ait farklı tipte kitinazlar ürettiği bilinmektedir (Dawid 1978). *Serratia* türleri pek çok farklı kaynaktan izole edilmektedir. Çizelge 1.2'de *Serratia* türlerine ait izolasyon kaynakları gösterilmektedir. *Serratia* türleri içinde konak spektrumunu en geniş olan *Serratia marcescens*'tir (Williams 2022).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2. *Serratia*’ya ait her türün sık görülen izolasyon kaynakları

Türler	İzolasyon Kaynakları				
					
<i>S. ficaria</i>		✓		✓	
<i>S. entomophila</i>		✓			
<i>S. rubidaea</i>		✓		✓	
<i>S. proteamaculans</i>		✓		✓	✓
<i>S. liquefaciens</i>		✓		✓	✓
<i>S. marcescens</i>	✓	✓	✓	✓	
<i>S. grimesii</i>					✓
<i>S. odorifera</i>					
<i>S. plymuthica</i>	✓				
<i>S. fonticola</i>	✓				

Kitin insanlarda ve bitkilerde bulunmamaktadır. Şimdiye dek memelilerin kitini sentezlediği ya da onu bir besin maddesi olarak metabolize ettiği bilinmemektedir. Buna karşın insan genomu GH 18 ailesi üyeleri olarak sınıflandırılan proteinler için kanıtlanmış sekiz geni kodlamaktadır. Protein ailesi, kitinazların yanı sıra kitolektinler olarak adlandırılan homolog proteinleri de içerir. Bunlar hidrolitik enzim aktivitesi için gereken bir protonu veren, ancak oligosakarit bağlanmasında ve genel üç boyutlu yapıda yer alan yüksek oranda korunmuş rezidüleri koruyan anahtar aktif bölge glutamat rezidülerinden yoksundur. İnsan genomu tarafından kodlanan GH 18 proteinlerinden üçü enzimatik aktivite göstermiştir. Bunlar: asparajine bağlı glikoproteinlerin lizozomal parçalanmasında aktif olan di-N-asetilkitobiaz; aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilen ve Gaucher hastalığı olan hastaların kan serumunda oldukça yüksek düzeyde yükselen veziküler ve salgılanan bir protein olan kitotriosidaz; çoğunlukla gastrointestinal sistem ve akciğerde eksprese edilen asidik memeli kitinaz (AMCase) ve yakın zamanda astımın aeroallerjen modelinde Th2 yardımcı hücreler tarafından indüklendiği gösterilmiştir. Üç insan geni (OVGP1, CHI3L1 ve CHI3L2), iltihaplanma ve/veya gelişme sırasında doku yeniden şekillenmesinde rol oynaması muhtemel kitolektinleri kodlar. OVGP1 geni, östrojene yanıt olarak yumurta kanalı epitel hücreleri tarafından salgılanan büyük bir glikoproteini kodlar. İnsan GH 18 proteinlerinin çoğunun biyolojik fonksiyonları henüz tanımlanmamıştır. Buna rağmen, memeli proteinleriyle ilgili son veriler, bunların mantarlara veya diğer patojenlere karşı savunmada,

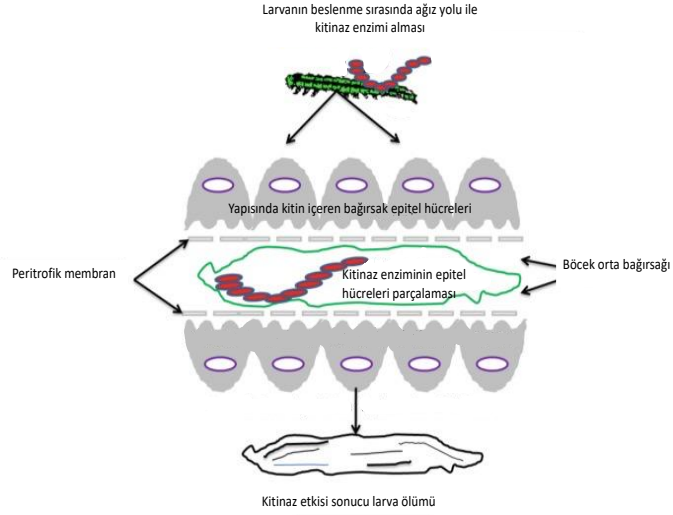
1. GİRİŞ

iltihaplanma ve yeniden şekillenme süreçlerinde öne çıkan rollerine işaret etmektedir (Aggarwal et al. 2015).

GH 18 ailesi virüslerden, bakterilerden, mantarlardan ve hayvanlardan elde edilen kitinazların yanı sıra bitkilerden elde edilen sınıf III ve V'i de içerir. GH 19 kitinazlar çoğunlukla bitkilerde (sınıf I, II ve IV), nematodlarda ve bazı bakterilerde tanımlanır. Kitin üretmeyen bazı bakteri türleri ve bitkiler, çözünmeyen kitinin metabolize edilebilir besin kaynaklarına dönüştürülmesi ve patojenlere karşı savunma için sırasıyla kitinazlar kullanır (Dikbaş vd 2023).

Bahsedildiği üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimlerden biri olan Kitinaz, böceklerin vücut duvarlarında, peritrofik matrislerinde, tükürük bezlerinde, soluk borusunda, yumurta kabuklarında ve kas bağlanma noktalarında bulunan kitini parçalayabilir. Kitinin bazı mikroorganizmalar ve kitinolitik enzimler tarafından parçalanması, dış yüzeylerinde polimer içeren patojen ve haşerelerde ciddi zararlara ve hatta ölüme neden olmaktadır. Bu bağlamda, kitinolitik mikroorganizmalar ve enzimler, tarımda biyokontrol ajanları ve patojen düşürücü olarak hasat sonrası zararlıların kontrolünde ve diğer birçok biyoteknolojik uygulamada oldukça yüksek potansiyele sahiptir (Chavan and Deshpande 2013).

Kitinazlar, kitin içermeyen bitkiler, bakteriler, virüsler ve omurgalıları gibi çeşitli organizmalarda ve ayrıca mantarlar, böcekler ve kabuklular gibi kitin içeren organizmalarda eksprese edilmektedir. Bu organizmalar onları çeşitli fizyolojik işlevler için üretmektedir. Bakteriler, doğada kitin bozunmasında önemli ölçüde yer alır, büyük ölçüde biyojeokimyasal geri dönüşüme katkıda bulunur ve ekosistemde karbon ve nitrojen arasındaki dengeyi korumaktadır. Bakterilerde kitinaz üretimi, özellikle entomopatojenik bakteri türlerinde virülansın göstergesi olabilir. Kitin içeren konakçılarda patogenez sırasında veya kitinli atıkların hidrolizi sırasında birden fazla çeşitli kitinazlar salgılayarak kitinden tek karbon ve enerji kaynağı olarak yararlanmaktadır (Dikbaş vd 2023).



Şekil 1.4. Kitinaz enziminin böcek bağırsağındaki etki mekanizması. Referans görsel değiştirilerek hazırlanmıştır (Dukare et al. 2021).

1.3. Büyük Ölçekli Enzim Üretimi

Enzimler, katalitik açıdan aktif proteinlerdir. Deterjan endüstrisi, nişastanın dönüştürülmesi, yakıt alkol üretimi, tekstil uygulamaları, gıda ve yiyecek endüstrileri, katı ve sıvı yağ işlenmesi, organik sentezler, kağıt ve kağıt hamuru üretimi ve benzeri birçok alanda endüstriyel kullanımları hızlı şekilde artmaktadır. Enzim kaynakları, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi canlılardır. Enzimlerin ticari amaçla büyük ölçekte üretilmesinde biyoreaktörler kullanılmaktadır. Fakat, ticari uygulamaların başlıca endüstriyel enzim kaynakları mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların ürettikleri enzim miktarı, bitki ve hayvan kaynaklarına kıyasla daha yüksek olması nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir. Günümüzde mikroorganizmalardan enzim üretimi, derin fermentasyon ve katı faz fermentasyon prosesleri uygulanarak başarılı şekilde gerçekleştirilmektedir (Özlem ve Dursun 2022).

1.3.1. Derin fermentasyon

Enzim üretimi, kapalı biyoreaktörlerde (fermentör) derin kültür fermentasyonu olarak adlandırılan yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Derin kültür fermentasyonu ile mikroorganizmalar, enzim üretimini optimize edecek şekilde tasarlanmış tanklar kullanılarak (biyoreaktör/fermentör) çoğaltılmakta ve çoğalma ortamlarına enzim salgılamaktadır. Biyoreaktörler, mikroorganizmanın gelişmesi ve çoğalabilmesi için uygun ortamı sağlamak amacı ile içerisinde mikroorganizmaların ihtiyaç duydukları

1. GİRİŞ

besin maddelerini bulunduran besiyerleri ile doldurulmaktadır. İlk olarak mikroorganizmalar tohum kültür olarak bilinen ve üretim ölçeğine göre daha küçük ölçekteki biyoreaktörlerde çoğaltılmaktadır. Daha sonra yeterli çoğalmayı gösterdiklerinde ise asıl üretimin gerçekleşeceği büyük ölçekli biyoreaktörlere transfer edilmektedirler. Fermentasyonda mikroorganizmaları etkileyecek, sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen miktarı gibi parametreler ciddi bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. İyi karıştırılıp havalandırılan biyoreaktörlerde optimal koşullar sağlandığında çoğalmakta ve fermentasyon sıvısına ürettikleri enzimi salgılamaktadır (Dursun ve Gülşen 2019).

1.3.2. Katı faz fermentasyonu

Katı faz fermentasyonu (KFF), sıvı ortam olmadığı durumda fiziksel olarak destekler ve besin bileşikleri için kaynak olarak kullanılarak çözünür nitelikte olmayan materyal üzerinde gerçekleştirilen fermentasyon işlemidir. KFF'in katı substratı mikroorganizmaların gelişim ve metabolizmasını desteklemek için yeterli oranda nem içeriğine sahiptir. Katı faz fermentasyon yöntemi, sıvı faza kıyasla düşük nem içeriği nedeniyle maya ve küfler gibi bazı sınırlı sayıda mikroorganizma tarafından gerçekleştirilebilir. Buna ek olarak birkaç bakterilerin gelişimi için de KFF'nin kullanılabildiği kaydedilmiştir. Japonya'da KFF endüstriyel enzimleri ticari olarak üreten ülkelerin arasında ilk sırada yer almaktadır. KFF teknolojisi gıda, yem, ilaç ve tarım sanayi ürünlerinin üretilmesindeki ekonomik potansiyeli oldukça yüksektir (Raimbault 1998).

KFF'nin uygulanması için gerekli olan koşullar ve bu prosesin özellikleri literatürde ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir. KFF yöntemi uygulanırken kullanılan katı materyalin geniş yüzey alanı sağlaması ve mikroorganizmanın gelişimine elverişli olması, gözenekli yapısı ile de biyokimyasal olayların yüksek hızlarda gerçekleşmesi için yeteri miktarda suyu absorbe edebilmesi şarttır. Ek olarak fermentasyon ortamı düşük basınç ile havalandırılmalıdır. Substratlar yapışma eğilimi olmayan ve küçük lifler içerecek şekilde seçilmelidir. Substratta mikrobiyal aktiviteyi inhibe edebilecek maddeler ile kontamine olmayacak, karbonhidrat kaynağı (selüloz, nişasta, şeker), azot kaynağı

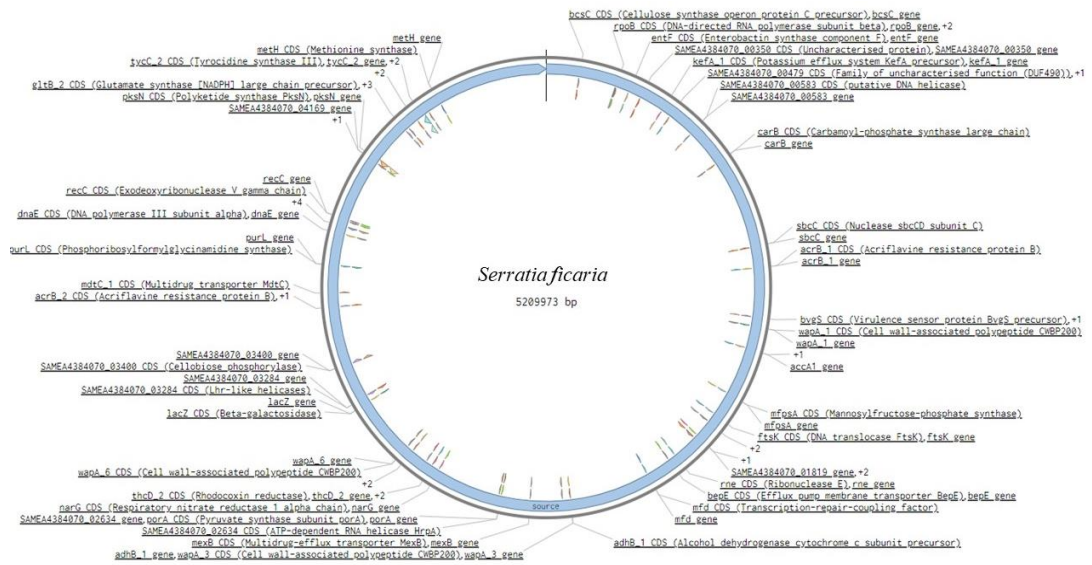
(amonyak, üre, peptit) ve mineraller gibi besin maddelerini bulundurmalıdır (Konak vd 2012).

1.4. *Serratia ficaria*

Serratia kelimesi ilk kez 19. yüzyılın başlarında İtalya'da bir il olarak tanımlanmıştır. *Serratia* türleri *Enterobacteriaceae* familyasına ait gram negatif proteobakteriler olarak bilinmektedir. *Serratia marcescens* oldukça yaygın ve popüler olmasına rağmen *Serratia ficaria* ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Birçok *Serratia* türünün konakçısı insan olarak bilinse de bazı *Serratia* türleri böcekleri enfekte etmektedir. Konakçısı böcek olan *Serratia ficaria* türünün ilk olarak incir ve incir arıları arasındaki tozlaşma ve yumurtlama döngüsü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu türün her yerde varolabilen doğası nedeniyle çok sayıda çevresel nişte bulunduğu bildirilmiştir (Williams 2022).

S. ficaria'nın komple genom dizilemesi yapılmış olup, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bulunmaktadır (ulaşım numarası: LT906479). Genomda böceklerin dış iskeletlerinin ve bağırsak epitel dokusunun parçalanmasına sebep olan *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz D* genleri olmak üzere 3 adet *kitinaz* geni ve 7 adet *kitobiaz* geni bulunmaktadır. Bu nedenle *S. ficaria* türü potansiyel biyoinsektisit ajanı olarak bilinmektedir (Vaughan et al. 2022).

1. GİRİŞ



Şekil 1.5. *Serratia ficaria* bakteri genom haritası. NCBI veri tabanı LT906479 ulaşım numaralı genomun haritası benchlingde hazırlanmıştır.

2020 yılında yayınan bir çalışmada *Serratia vespertilionis* suşu *Serratia ficaria*'nın heterotipi olarak tanımlanmıştır. Önceki çalışmalarda *Serratia vespertilionis* suşunun *Serratia ficaria* bakterisi ile 16S rRNA gen sekans karşılaştırması yapılarak %99,5 benzerlik tespit edilmiştir. Daha sonra *Serratia vespertilionis* bakteri DNA'sının NextSeq 500 cihazı kullanılarak tam genom dizilimi yapılmıştır. Bunun sonucunda *S. ficaria* kromozomal DNA'sının LT906479 genom verileriyle karşılaştırıldığında yalnızca iki genom arasında birkaç farklılık kanıtlanmıştır. Ayrıca dijital DNA-DNA hibridizasyon hesaplaması sonucunda iki suşun yakından ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Sonuç olarak yapılan çalışma ve hesaplamaların ışığında *Serratia vespertilionis*'in *Serratia ficaria*'nın heterotipik sinonimi olarak kabul edilmesi önerilmiştir (García-Fraile et al. 2020).

Önceki yapılan çalışmalar *Serratia* türü bakterilerin *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia minor* gibi bitki patojenlerinin büyümesini farklı ekin tarlalarında baskıladığını göstermektedir. Başka bir çalışmada sera koşullarında *S. marcescens* kitinaz genini ifade eden rekombinant *Escherichia coli*'nin fasulyede *S. rolfisii* ve pamukta *R. solani*'nin neden olduğu hastalık insidansını azaltmada etkili olduğu bulunmuştur. Lamine ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışma sonucunda çekirge kontrolü için *S. marcescens* kitinaz kullanımını önermiştir (Funkhouser and Aronson 2007).

Serratia entomophila ve *S. proteamaculan*, *Costelytra zealandica* (White)'nın patojenleridir. Böcek tarafından ağız yolu ile alınmalarından hemen sonra ön bağırsakta kolonize olarak konakçının beslenmesinin kesilmesine neden olmaktadır. Enfeksiyonun ilerleyen evrelerinde alt bağırsağı da kolonize ederler ve son evrelerinde hemokole penetre olarak genel sepsisemiye neden olmaktadır. Sonucunda ise böcek açlık ve/veya genel sepsisemi nedeniyle ölmektedir.

Şimdiye kadar *Serratia* bakterisi orijinli üretilmiş ticari tek biyoinsektisit, Yeni Zelanda'da üretilmektedir. *C. zealandica*'nın kontrolü için *Serratia entomophila* (Invade®) bakterisinin yüksek yoğunluklu kültürünü içermektedir. Invade®, diğer toprak mikroorganizmalarıyla rekabet edebilen ve doğada uygulama sonrası hedef zararlı popülasyonunda bir hastalık döngüsünü başlatacak kadar uzun süre canlılığını koruyabilen bakterilerin toprağa verilmesiyle uygulanmaktadır. Yüksek yoğunluklu *S. entomophila* kültürleri, toplu fermentasyon yoluyla *in vitro* olarak üretilmektedir, sıvı formdaki Invade® ürünü depolama sırasında hücre ölümünü önlemek için soğutma altında tutulması gerekmektedir. Bu durumun önüne geçilmesi için 2001 yılında granül formdaki yeni bir formülasyon geliştirilmiştir. *S. entomophila*'nın yeni granüler formülasyonu, buzdolabında depolama ve taşıma ile uzman uygulama makinelerine olan ihtiyacı azaltarak, sıvı Invade® formülasyonuna uygulanan kısıtlamaların üstesinden gelinmiştir (Johnson et al. 2001).

Bu yüksek lisans tezinde hem Dünyada hem de ülkemizde önemli bir tarım zararlısı olan büyük lahana kelebeğinde doğal olarak enfeksiyon oluşturan yerel bir bakteri türünün izolasyonu ve başta ışık mikroskopisi kullanarak moleküler çalışmalarla karakterizasyonunun yapılması, ardından bakteri izolatına ait üç kitinaz geninin çoğaltılması ve enzimlerin sentezlenerek büyük lahana kelebeğine karşı virülans etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Özgen ve arkadaşları (2013), yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus thrungiensis*'in virülansını arttırmak için *S. marcescens* kitinaz B ve C genlerini kullanmışlardır. Rekombinant olarak ürettikleri *B. thrungiensis*'in *Galleria mellonella* larvaları ve *Drosophila melanogaster* erginleri üzerindeki virülansının yabani tipe göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Özgen vd 2013).

Danışmazoğlu ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada ise *Helicoverpa armigera*'dan izole edilen *S. marcescens* kitinaz A, B ve C genlerinin *Malacosoma neustria* ve *H. armigera* larvaları üzerindeki virülans etkilerini araştırmıştır. En yüksek mortalite *M. neustria* için kitinaz A'nın (%80), *H. armigera* için ise kitinaz C'nin (%66) olduğunu bulmuştur (Danışmazoğlu vd 2015).

Singh ve arkadaşları (2016) tarafından yapılmış çalışmada ise *Paenibacillus* sp. D1 suşunun, *Helicoverpa armigera* tarım zararlısı ile mücadelede başarısı incelenmiştir. Yüksek kitinaz ürettiği bilinen bu bakterinin hem kendinin hem de kitinaz enziminin larvaların beslenme hızını ve vücut ağırlığını azaltan güçlü bir beslenme önleyici olduğu görülmüştür (Singh et al. 2016).

Korany ve arkadaşları (2019) Mısır, Siwa Oasis'teki acı sudan alınan örnekteki *Aeromonas hydrophila* bakteri izolatının ürettiği ham kitinazların bal mumu güvesi olan *Galleria mellonella* larvalarına uygulanması sonucu larva ve pupalarda ölümüne neden olduğu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışma sonucunda yetişkinlerin ortaya çıkma oranında ve doğurganlığında önemli ölçüde bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (Korany et al. 2019).

Mahmood ve arkadaşları (2020) yaptıkları bir çalışmada *Xenorhabdus nematophila* bakterisinin kitinaz A geni klonlanarak üretilip saflaştırılmış ve Kitinaz A enzimi önemli bir tarım zararlısı olan *Helicoverpa armigera* larvalarına ağız yoluyla uygulanmıştır. Uygulama sonucu kitinazın larvalar üzerinde toksik etkileri olduğu görülmüştür. Larvaların büyüme ve gelişmesinde gerileme olduğu ve ağırlıklarının kontrole kıyasla 9 kat azaldığı kaydedilmiştir (Mahmood et al. 2020).

Abulikemu ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *H. armigera*'dan izole edilen *S. marcescens* bakterisinin kitinaz C enziminin *G. mellonella* larvaları üzerindeki virölans etkisini test etmiş ve %50 böcek öldürücü etkisi olduğu tespit edilmiştir (Abulikemu et al. 2021).

Tao ve arkadaşları (2022) Çin'de yapmış oldukları bir çalışmada fıstık tarlasından toplanan doğal olarak enfekte *Anomala corpulenta* kurtçuklarında *S. marcescens* TC-1 suşu tanımlanmıştır. Bu suşun kitinaz aktivitesi ve virölans etkisi incelenmiştir. *A. corpulenta*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* ve *Bombyx mori*'nin olduğu beş tarım zararlısına karşı virölans etkisi olduğu gösterilmiştir (Tao et al 2022).

Son olarak Baranek ve arkadaşları (2023), Polonya'da bulunan bir tropikal seradan izole eden etmiş oldukları *Bacillus thuringiensis* bakterisine ait üç suşun (BG11, BG12 ve BG15) kitinaz A ve B genleri içerdiği görmüşlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda ekonomik açıdan zararlı iki böcek türü olan *Cydia pomonella* ve *Spodoptera exigua*'ya karşı her üç suşun da böcek öldürücü etkisi olduğu ancak BG12 ve BG15 suşlarının etkisinin daha yüksek olduğu kaydetmişlerdir (Baranek et al. 2023).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında (YÜTAM) yapılmıştır. Yapılmış olan yöntemlerin iş akışı aşağıda verilmektedir (Şekil 3.1).



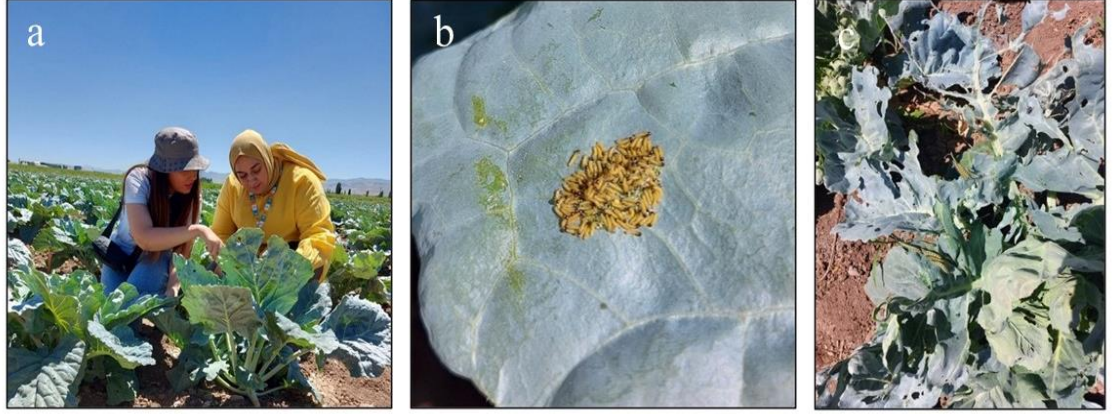
Şekil 3.1. Tezde kullanılan yöntemlerin iş akışı

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri

Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-rad Chemidoc MP İmaging
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Mikrobiyolojik Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
PZR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Işık Mikroskobu	Leica DM750
Mini Santrifüj	WiseSpin
Mikroplaka okuyucu	Thermo Fisher Scientific µDrop™
Otoklav	WiseSpin

3.1. Örneklerin Elde Edilmesi

300 adet *P. brassicae* larvası ve 7 adet yumurta paketi, Erzurum ili, Pasinler ilçesinde yer alan karalahana ekili alanlardan 2022 yılı Temmuz-Ağustos aylarında toplanarak larvaların yaşamasına elverişli uygun kaplar içerisinde laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.2). Aynı gün larva sayısı, tarih ve lokalite bilgileri not edilmiştir.



Şekil 3.2. a) Saha çalışmasında larva ve yumurta toplanması. b) Bitki yaprakları üzerinde yer alan 1.dönem larvalar. c) Larvalar tarafından zarar görmüş lahana bitkisi.

3.2. Enfeksiyonun Tespiti

3.2.1. Işık mikroskobisi

Larvalar araziden toplandıktan bir süre sonra toplu ölümler, pembe renkli dışkılama ve gelişim gerilikleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle kendiliğinden ölen larvalar ependorf tüplerine alınarak 250µl dH₂O eklenerek homojenizatör ile parçalanmıştır. Işık mikroskobu (Leica DM750) ile incelemede bakteri varlığı tespit edilmiştir.

3.3. Bakterilerin Kültüre Edilmesi

Bakteri varlığı ve türünün kesin olarak anlaşılması amacıyla Nutrient agar besiyeri bulunan petrilere homojenize edilmiş larvalardan alınan örnekler kullanılarak çizgi ekim yapılmıştır. Petriler 28°C olan inkübatöre alınarak 4 gün inkübe edilmiş ve bakteri gelişimi gözlenmiştir.

3.3.1. Gece kültürü

Bakteri türünün anlaşılması için petride yetişen kültürden alınan sürüntü 3 ml Nutrient Broth besiyeri içeren 15 ml'lik steril falkon tüplerine alınmıştır. Kontaminasyon ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla sürüntü içermeyen fakat besiyeri içeren bir kontrol tüpü de hazırlanmıştır. Her iki tüp de 28°C'ye ayarlı karıştırıcı inkübatörde gece boyu inkübe edilmiştir.

3.4. DNA İzolasyonu

Bakteri tür tespiti amacıyla yapılacak sekanslama için bakteriyel DNA izolasyonu yapılmıştır. Gece kültüründen alınan bakteriler Ecopure genomic DNA izolasyon kiti (Ecotech Biotechnology cat. No: E1075) kullanılarak yapılmıştır. Kit protokolü şu şekildedir; 1 ml bakteri kültürü, 1,5 ml'lik steril bir tüpe aktarılmıştır ve bakteriler, oda sıcaklığında 3 dakika boyunca mikrosantrifüjde 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınmış ve pelet, 200 µl resüspansiyon tamponu eklenerek vortekslenmiştir. 200 µl lizis tamponu ve 20 µl RNaz-A ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. 20 µl Proteinaz-K eklenerek ters çevrilerek karışması sağlanmış ve 55°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. 400 µl binding tamponu eklenmiş ve kolona aktarılmıştır. Mikrosantrifüjde oda sıcaklığında 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildikten sonra üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklenmiş ve aynı koşullar altında tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Kolon, temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve membranının merkezine 35 µl elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak masa üstü mikrosantrifüjde maksimum hızda 30 saniye santrifüj edilerek µDrop ile miktarı ve saflığı belirlenmiştir.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA izolasyonunun tamamlanmasının ardından konvansiyonel PZR tekniği kullanılarak DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmalarında evrensel 16S rRNA primerleri 27F (İleri: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (Geri: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') kullanılmıştır. PZR reaksiyonları, toplam hacim 50 µl olacak şekilde hesaplanarak gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonları 98°C'de 30

saniye, her biri 35 döngü olacak şekilde 94°C’ de 10 saniye, 55°C’de 1,5 dakika, 72°C’de 15 saniye ve son döngüyü takiben son uzama reaksiyonu 72°C’de 15 dakika olacak şekilde tamamlanmıştır. Elde edilen PZR ürünü % 1’lik etidyum bromür (EtBr) eklenmiş olan agaroz jelde yürütülerek UV jel görüntüleme cihazında varlığı belirlenmiştir. PZR ürünü Illumina Miseq yeni nesil baz dizi analizi yapılması için Intergen, Ankara firmasına gönderilmiştir. Tür tespiti amacıyla tamamlanan dizi analiz sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzü kullanılarak GenBank’ta bulunan verilerle karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.6. Bakteri Kitinaz Geninin Çoğaltılması

3.6.1. Kitinaz genlerini çoğaltmak üzere uygun primerlerin dizaynı

Bakteriye ait *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz D* genlerinin klonlaması için PZR yöntemi ile çoğaltılması gerekmektedir. Bu amaçla genlere spesifik primerlerin tasarlanmasına ihtiyaç duyulmuştur. Her üç gene de uygun primerler *S. ficaria* genomundaki kitinaz genleri referans alınarak *in silico* olarak Primer3 programında (<https://primer3.ut.ee/>) tasarlanmış ve Oligomer, Ankara firmasına sentez ettirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Vektöre spesifik primer sekansları

Primer	Sıra(5'-3')
<i>kitinaz D</i>	
<u>AGAAGGAGATATACATATGAGCACCCATAATATTATCAATGC</u>	
İleri	pET_3a overlap sekans
<i>kitinaz D</i>	
<u>TAGTTATTGCTCAGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGGACGGTCGGTTGCCAC</u>	
AGG	
Geri	pET_3a overlap sekans
<i>kitinaz A</i>	
<u>AGAAGGAGATATACATATGCGCAAACCTTAATAAACCGCTG</u>	
İleri	pET_3a overlap sekans
<i>kitinaz A</i>	
<u>TAGTTATTGCTCAGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGTTGAACGCCGGCGCCG</u>	
TTGCC	
Geri	pET_3a overlap sekans
<i>kitinaz B</i>	
<u>AGAAGGAGATATACATATGTCTACACGTAAAGCCGTTATTGG</u>	
İleri	pET_3a overlap sekans
<i>kitinaz B</i>	
<u>TAGTTATTGCTCAGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGGGCCGCGCGGCCACC</u>	
TTC	
Geri	pET_3a overlap sekans

3.6.2.Kitinaz genlerinin PZR yöntemi ile çoğaltılması

S. ficaria bakterilerinden izole edilen DNA'lar *Kitinaz A*, *Kitinaz B* ve *Kitinaz D* genleri için yukarıda belirtildiği gibi ayrı ayrı tasarlanan primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. Her primer ayrı ayrı tüplerde reaksiyona alınmış ve genlerin çoğaltılması sağlanmıştır. 12,5µl PZR mixi, 1µl forward primer, 1µl reverse primer, 9,5µl dH₂O ve 1µl DNA örneği eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra PZR reaksiyonu önceki adımda verildiği şekilde uygun programda PZR cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bitiminden sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak bantların varlığı gözlemlenmiş ve dizi analizine gönderilmiştir.

3.6.3. Gibson klonlama yöntemi ile kitinaz genlerinin çoğaltılması

PZR ile çoğaltılan *Kitinaz A*, *Kitinaz B* ve *Kitinaz D* gen bölgelerinin klonlama vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, “NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit” (cat. no: E5520S) kullanılmıştır. Kit içerisinde DNA uçlarının birleştirilmesi için gerekli olan enzim karışımı ve transformasyon basamağında kullanılan alıcı hücreler bulunmaktadır. Vektör ve klonlanacak hedef sekans ayrıca elde edilmiştir.

İfade çalışmalarında kullanılan vektör pET-3a’ dır. pET-3a vektörü, T7 promotor bölgesi içeren ve bakteriyel gen ifadesine imkan veren bir vektördür. Vektörün elde edilmesi için, vektörün iki ucuna spesifik olacak şekilde tasarlanan bir çift primer kullanılarak, PZR yardımıyla vektör amplifiye edilmiştir. Elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra manyetik beadler kullanılarak PZR pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedef bölge ve vektör PZR ürünleri elde edildikten sonra enzim karışımı ile hedef plazmit yapısı elde edilmiştir. Enzim karışımı 10 µl (vektör 50 ng, hedef bölge 1:3 oranında vektör:insört) ve 10 µl su olmak üzeri toplam hacim 20 µl’dir. Elde edilen karışım, 50°C’de 15 dakika inkübe edilerek buza aktarılmıştır. Alıcı hücreler -80°C derin dondurucudan buza aktarılıp ve 10 dakika bekletildikten sonra 2 µl plazmit ürünü eklenmiştir. 20 dakika buzun üzerinde bekletilen karışım 42°C’de 30 saniye ısı şokuna maruz bırakılarak transformasyon gerçekleştirilmiştir ve tekrar buza alınmıştır. Transformasyon ürünlerinin üzerine 950 µl 37°C’ye ısıtılmış SOC sıvısı aktararak 220 rpm 37°C’de 1 saat çalkalanmıştır. Bakteri büyüme solüsyonundan 50 µl’lik örnekler alınarak 50 mg/ml amfisilin içerecek şekilde hazırlanmış LB Agar petrilere yayılmıştır. Örnekler 37°C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Takip eden günde agar üzerinde gözlenen koloniler, steril pipet ucu yardımıyla, antibiyotik içeren sıvı ortama aktararak, 37°C 220 rpm’de 1 gece çalkalayıcıda bırakılmıştır. Sonraki günde büyüme gözlenen tüpler koloni PZR’ı için takip eden çalışmalara alınmıştır. Sıvı ortamda büyüme gösteren koloni örneklerinin, hedeflenen insört’ü taşıyıp taşımadığının anlaşılması için, hedef özgü primer çiftleri ve büyüme sıvısından alınan 1 µl’lik örnekler ile koloni PZR gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %1 Agaroz Jel ile görselleştirilmiş ve pozitif sonuç veren kolonilere ait sıvı büyüme örneklerinden Plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmit DNA izolasyonu için NEB Monarch Plasmid Mini Prep Kiti kullanılmıştır (Kat. No: T1010S). 1-5 ml arası büyüme ürünleri 800 g 1 dakika santrifüj

solüsyonları ile bağlanmayan diğer peptit ürünleri uzaklaştırılmıştır. Son aşamada imidazol bakımından zengin bir çözeltinin kolona aktarılmasıyla bağlı proteinler kolondan elüe edilmiştir. Elde edilen peptid ürününün konsantrasyonu μ Drop ile ölçülmüştür. Kitinaz bantlarını görselleştirmek için SDS-PAGE jel (%10 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid) elektroforezi yapılmış ve daha sonra bantları Coomassie brilliant mavi boya kullanılarak görüntülenmiştir.

3.9. Larvaların Damlacık Yedirme Yöntemi ile Enfeksiyonu

3.9.1. En etkili enzimin belirlenmesi

Sentzlenen Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimlerinin *P. brassicae* larvalarının en etkili mortaliteye sahip olanının tespiti amacıyla her enzim için 10'ar adet 3. dönem larvaları kullanılmıştır. Bu çalışma için Erzurum'da kara lahana ekili olan alanlardan *P. brassicae* larvaları toplanmış ve iklim odasında kültüre alınmıştır (16:8 ışık/karanlık, %60 nem ve 25°C) Doğal alanlarından toplanan larvaların herhangi bir enfeksiyon etmenine sahip olmasına karşın en az 2 jenerasyon kültür döngüsü yapıldıktan sonra elde edilen larvalar çalışmada kullanılmıştır. Tarama testi için yaklaşık 16 saat aç bırakılan larvalara, droplet solüsyonu (gıda boyası + %10 süktroz) ile karıştırılmış olan 1000 ng/ μ l Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimleri larvalara yedirilmiştir. Larvaların kitinaz enzimlerini almasının hızlandırılması için %10'luk süktroz ve süspansiyonun larvalar tarafından alındığının anlaşılması için de %1'lik kırmızı gıda boyası eklenmiştir. 10 adet larva kontrol grubu olarak deneye dahil edilmiştir. Kontrol larvalarına ise, 5 μ l su ile %10'luk süktroz ve süspansiyonun larvalar tarafından alındığının anlaşılması için de %1'lik kırmızı gıda boyası verilmiştir. Süspansiyon her bir larvaya 1 μ l'lik küçük damlacıklar şeklinde yedirilmiştir. Kitinaz enzimlerinin konsantrasyonunun larvalar tarafından alınması binoküler mikroskop altında larvaların kırmızı renk kazanmasıyla da tespit edilmiştir. Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimleri ile muamele edilen larvalar taze ve temiz lahana yaprakları ile beslenerek 25 ml'lik plastik kaplara tek tek yerleştirilmiştir. Larvalar 25°C'de, 16:8 ışık:karanlık periyodunda ve %60 nem ortamındaki iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır. Larva ölümlerinin olup olmadığı 10 gün boyunca her gün takip edilmiştir. Deneme süresince ölüm oranları kaydedilerek en etkili kitinaz enzimi belirlenmiştir.

3.10. Doz Denemesi

Doz denemeleri için bir önceki uygulamada en etkili olarak belirlenen kitinaz enziminin beş farklı dozu kullanılarak larvalara damlacık yedirme yöntemi ile verilmiştir. Bu amaçla belirlenip uygulanan dozlar; 3.000 ng/μl, 2.000 ng/μl, 1.000 ng/μl, 500 ng/μl ve 250 ng/μl'dir. Her doz grubu için 10'ar adet 3.dönem larvaya uygulama yapılmıştır. Uygulama öncesi larvalar 16 saat aç bırakılmıştır. En etkili enzimin seçiminde uygulandığı şekilde 10 adet kontrol grubuna da uygulama yapılarak deneye dahil edilmiştir. Uygulama sonrası larvalardaki ölüm sayıları 10 gün boyunca her gün takip edilmiştir. Deneme sonlandırıldıktan sonra ölüm oranları kaydedilerek en etkili kitinaz enzimi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre SPSS programı kullanılarak LD₅₀ ve LT₅₀ değerleri belirlenmiş, mortalite grafikleri ise Graph-Prism programında çizilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

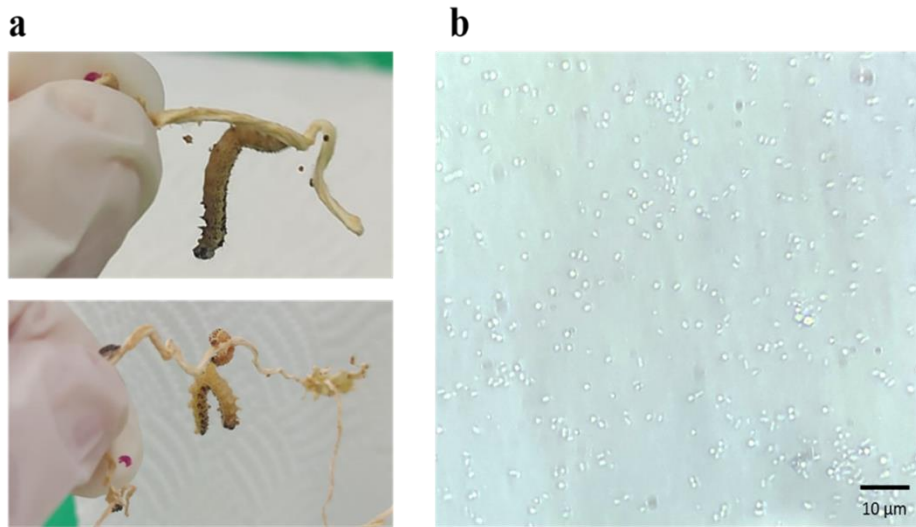
4.1. Bulgular

4.1.1. Larvaların kültüre edilmesi

Saha çalışmalarında yumurta paketlerinden toplanan sağlıklı larvalar ve yeni doğan larvalar iklim odasında (%60 nem, 16:8 aydınlık: karanlık, 28°C) beyaz lahana yapraklarıyla beslenmiştir. Larvaların çoğunda büyüme geriliği ve pembe dışkı gözlenmiş ve beş gün sonra tüm larvaların vücutları sıvılaşarak ölmeye başlamışlardır (Şekil 4a). Bu toplu ölümlerin nedenini araştırmak amacıyla rastgele seçilen üç larva, 250 µl dH₂O ile karıştırılmış ve slayt-lamel preparatı ile ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda çubuk şeklinde bakteriler gözlemlenmiştir (Şekil 4b).

4.1.2. Bakterilerin kültüre edilmesi

Ölen larvalar homojenize edildikten sonra mikroskop altında incelendiğinde bakteri varlığından şüphelenilmiş ve örnekler Nutrient Agar besiyeri bulunan petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. İnkübasyon sonrasında petrilere hızlı ve yoğun şekilde bakteri gelişimi görülmüştür.



Şekil 4.1. a) Laboratuvar ortamında kendiliğinden ölen larvaların fotoğrafıdır. b) Homojenize edilmiş larvaların 1.000X ışık mikroskop görüntüsüdür.

4.1.3. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu yapmak için izolasyondan bir gün önce petrilere alınan bakteri sürüntüsü Nutrient broth bulunan 15 ml'lik falkon tüpüne alınıp gece kültürüne bırakılmıştır. Kontaminasyon ihtimaline karşı bir adet bakteri sürüntüsü içermeyen fakat besiyeri içeren falkon tüpü kontrol olarak hazırlanıp aynı şartlarda inkübe edilmiştir. Çalkalayıcı inkübatörde bir gece büyümeleri beklenmiş ve 16 saat dolmadan bakteriler DNA izolasyonuna alınmıştır. Bakteri sürüntüsü içeren tüpte gelişim gözlenmiş, kontrol tüpünde ise kontaminasyon oluşmamış, besiyerinin berraklığını koruduğu görülmüştür. DNA izolasyonunun ardından saflık ve kontaminasyon tayini için µDrop cihazı ile ölçüm yapılmıştır. DNA saflığı ve konsantrasyonu PZR yönteminde kullanmak için uygun bulunmuştur. Daha sonra DNA %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüşülerek kontrol edilmiştir.

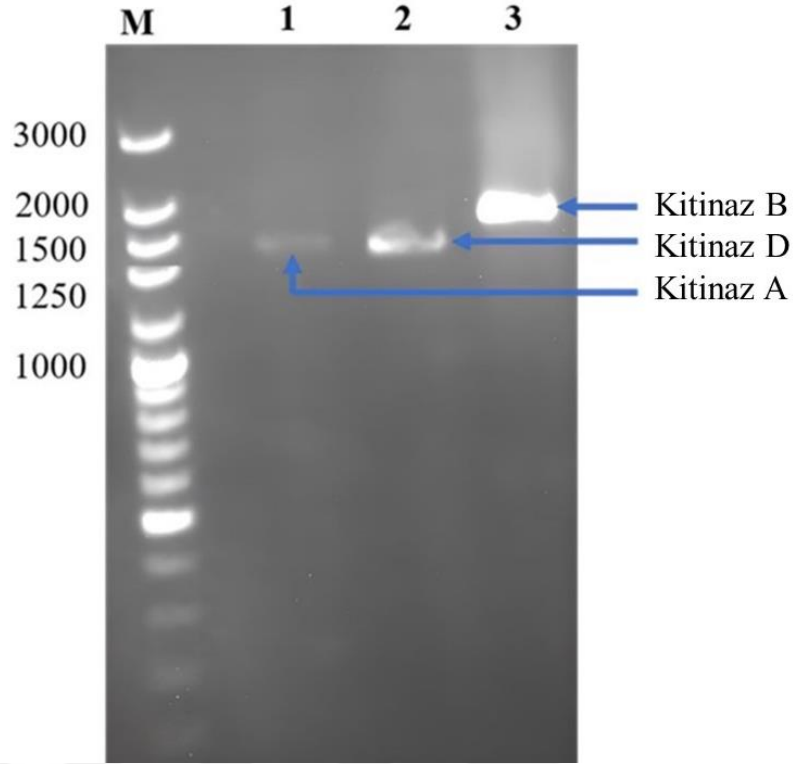
4.1.4. 16S rRNA kısmi bölgesinin amplifikasyonu ve dizilemesi

Bakterinin moleküler tanımlanması için 16S rRNA evrensel kısmi gen (1535 bp) bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. 16S rRNA bölgesi sekans analizi sonucunda *S. ficaria* ile %99,87 oranında benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bakterinin 16S rRNA dizisi verileri NCBI'ya kaydedilmiştir (Erişim numarası: OQ600706).

4.1.5. Kitinaz genlerinin PZR ile çoğaltılması

S. ficaria bakterisine ait kitinaz A, kitinaz B ve kitinaz D genleri NCBI veritabanında tespit edilmiştir. Bu genler uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri elde edildikten sonra %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

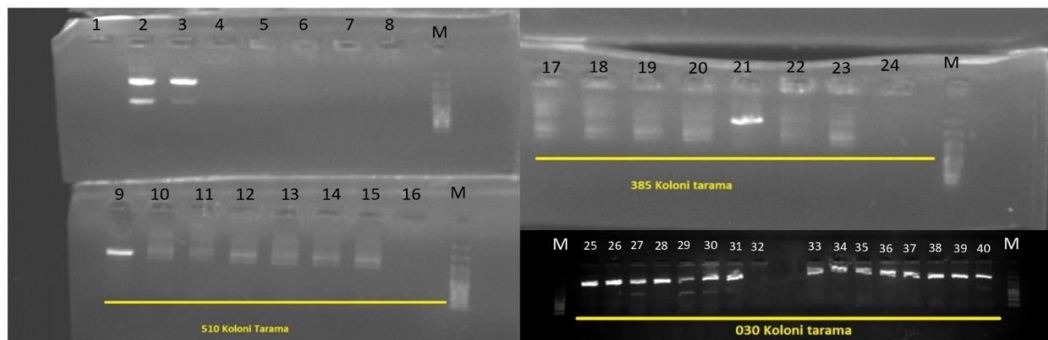
kitinaz A (1.692 bp), kitinaz B (1.500 bp) ve kitinaz D (1.446 bp) bölgeleri, spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *S. ficaria*'ya ait PZR ile çoğaltılmış kitinaz genleridir. M: marker, 1: Kitinaz B, 2: Kitinaz D ve 3: Kitinaz A'ya aittir.

4.1.6. Plazmit örneklerinin sekanslanması

Petrilerde oluşan koloniler seçilerek gece kültürüne alınmıştır. Bu koloniler ile kitinaz genlerine ait spesifik primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi sonrasında bant gözlenen kolonilerden izole edilen ve konsantrasyonu belirlenen plazmit örnekleri, peptid sentezi basamağından önce sekanslamaya gönderilmiş ve hedef dizinin plazmit içerisine doğru olarak yerleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.3).



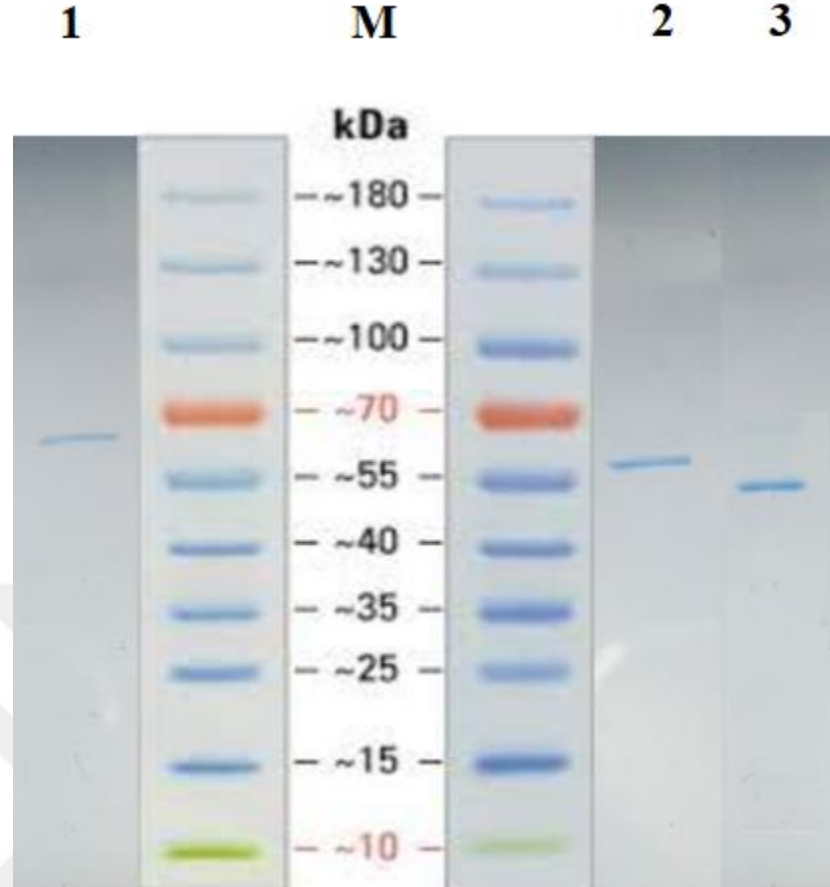
Şekil 4.3. Koloni tarama PZR sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.1.7. Peptidlerin saflaştırılması

Dizi analizi sonucunda *S. ficaria* genomu veri tabanındaki tam genomu ve tüm kitinaz bölgeleri ile %100 benzerlik göstermiştir. *kitinaz A*, *kitinaz B* ve *kitinaz D* bölgeleri, sırasıyla OQ674223, OQ674222 ve OQ674224 numaralarıyla NCBI veri tabanında kayıtlıdır. His-taq ile saflaştırılmış kitinaz enzimleri %10 SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Elektroforez sonucunda Coomassie Brilliant Blue ile boyanmıştır. Jelde beklendiği gibi sırasıyla 62, 56 ve 53 kDa boyutlarında Chit-A, Chit-B ve Chit-D gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Çizelge 4.1. *Pieris brassicae* orijinli *S. ficaria*'ya ait kitinaz A, B ve D genlerine ait nükleotid sıralarının literatürdeki sıralar ile karşılaştırma sonuçları.

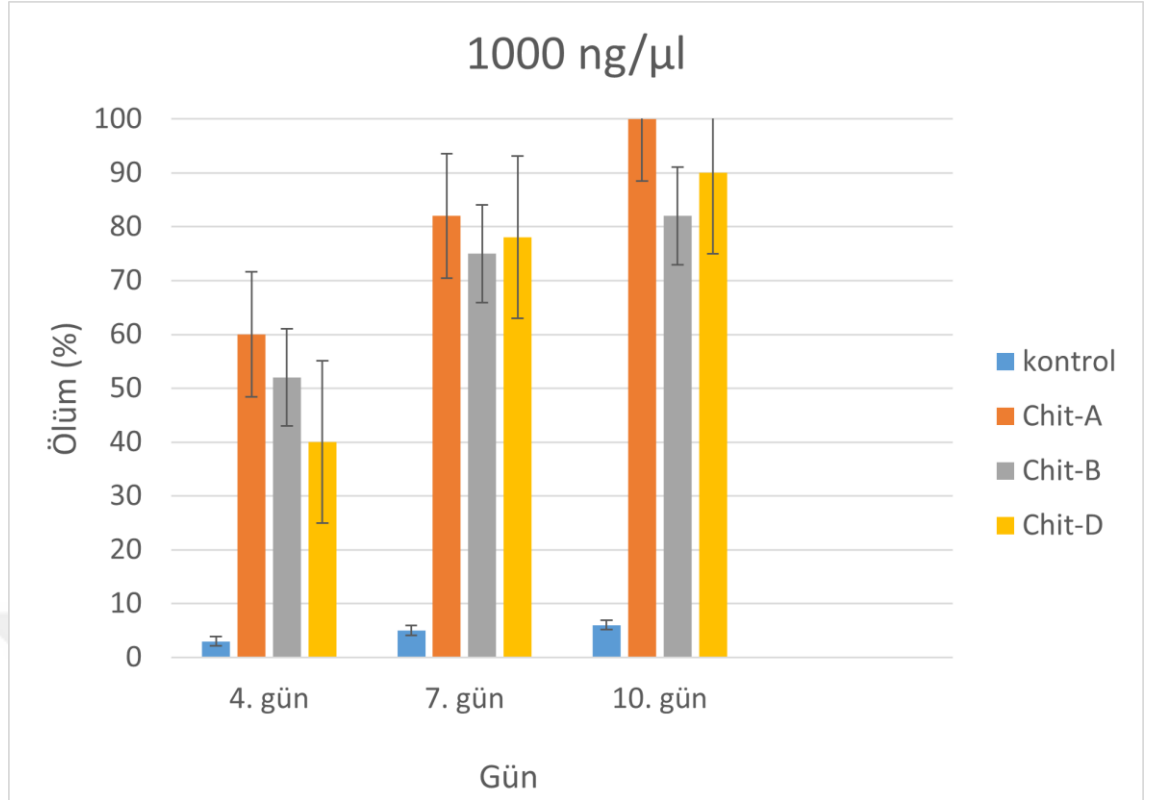
Erişim numarası	Adı	Benzerlik
CP032738.1	<i>Serratia sp.</i> (1D1416) <i>Chi A</i>	%99,82
CP074347.1	<i>S. entomophila</i> 626 suşu <i>Chi A</i>	%93,74
CP032738.1	<i>Serratia sp.</i> (1D1416) <i>Chi B</i>	%99,87
CP082787.1	<i>S. entemophila</i> A1 suşu <i>Chi B</i>	%91,91
CP032738.1	<i>Serratia sp.</i> (1D1416) <i>Chi D</i>	%99,86
CP082787.1	<i>S. entemophila</i> A1 suşu <i>Chi D</i>	%90,46



Şekil 4.4. His-taq ile saflaştırılmış kitinaz enzimlerinin SDS-PAGE analizi. Bant 1: Chit-D (53 kDa); bant 2: Chit-B, (56 kDa) ve bant 3: Chit-A (62 kDa). M, Protein marker (Thermo Scientific).

4.1.8. Virölans testi

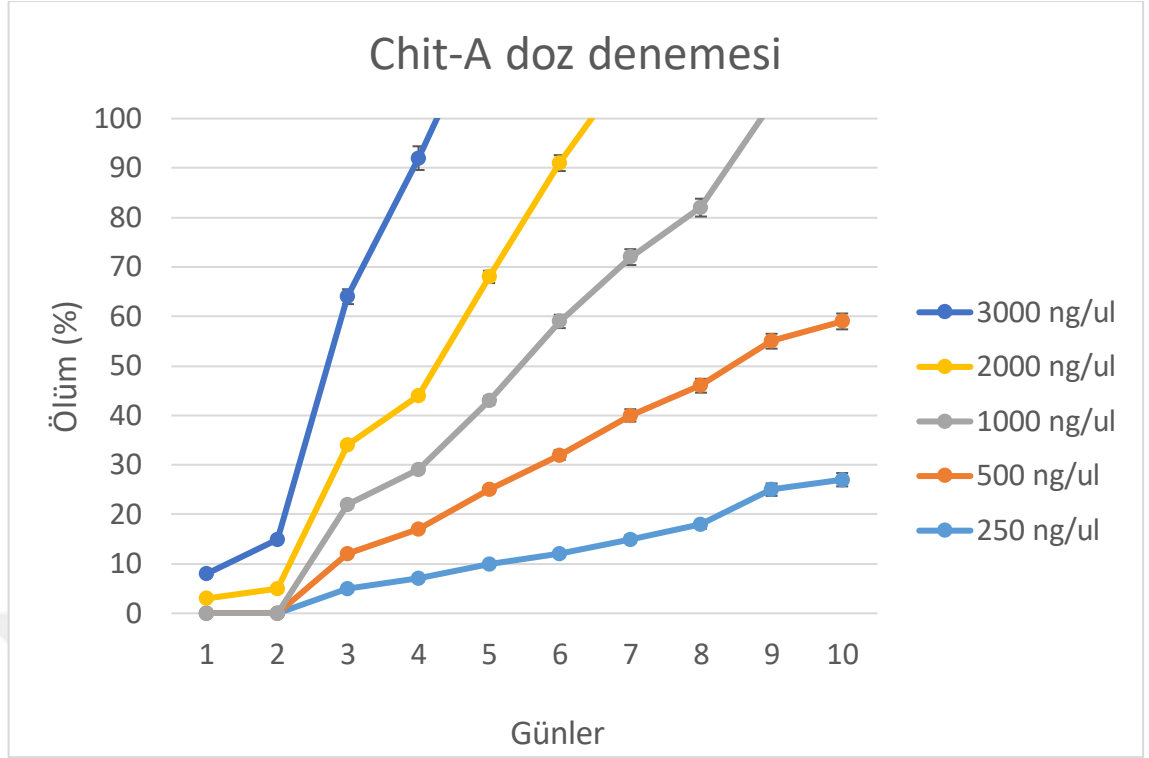
Kitinaz enzimlerinin 3. dönem larvalardaki virölans ve mortalite etkinliğini belirlemek amacıyla damlacık besleme yöntemiyle 1.000 ng/µl saf protein verilmiştir. 10 gün boyunca günlük olarak temiz lahana ile beslenmeye devam edilen larvalarda ölüm oranları gözlemlenmiştir. Biyotest sonunda Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimlerinin larvalardaki ölüm oranları sırasıyla %100, %82 ve %90 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Saflaştırılmış Chit-A, Chit-B ve Chit-D enzimlerinin 3. dönem *P. brassicae* larvaları üzerinde tarama testi verileri.

4.1.9. Doz denemesi

Bu süre sonunda virülansı en yüksek enzimin Chit-A olduğu belirlendiğinden bu enzimle doz denemeleri yapılmıştır. 3. dönem larvaların 5 farklı dozda Chit-A enzimi ile beslenmesi sonucunda 10. günün sonunda en yüksek dozda (3.000 ng/μl) %100 mortalite gözlenmiştir (Şekil 4.5). LD₅₀ değeri 1.095.31 ng/μl'dir (Çizelge 4.2). 3.000 ng/μl konsantrasyonunda Chit-A'nın *P. brassica* larvalarının yarısını (LT₅₀) 2,17 günde (1,97 – 2,88) öldürdüğü tespit edilmiştir. Kitinaz uygulaması sonrasında kitinaz grubu ile kontrol grubuna ait rastgele birer larva seçilerek yan yana konumlandırılmış ve tek karede fotoğraflandırılmıştır. Böylece kitinaz uygulaması sonrası larvada gelişim geriliği açıkça görülebilmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Saflaştırılmış Chit-A enziminin 3. dönem *P. brassicae* larvaları üzerinde doz testi verileri.

Çizelge 4.2. En etkili enzim olan Chit-A'nın LD50 değeri

Kitinaz	LD ₅₀ (ng)	Slope±SE	df	X ²
Chit-A	1095.31	2.543±0.058	2	0.578



Şekil 4.7. Aynı anda yumurtadan çıkan iki larva. A) kontrol grubuna ait, b) kitinaz uygulaması yapılmış larva.

4.2. Tartışma

Son yıllarda kimyasal pestisit kullanımının artması ve kontrolsüzce kullanılan bu kimyasalların ekosistem üzerindeki ciddi olumsuz etkileri canlılara ve doğaya büyük zararlar vermektedir. Bu nedenle pest dediğimiz tarım zararlısı böceklerle mücadele kullanılmak üzere kimyasal pestisitler gibi etkili olmasının yanı sıra çevreye ve canlılara zarar vermeyecek alternatif çözüm arayışı başlamıştır. Böylece bilim insanları yeni biyolojik mücadele ajanları bulmak üzere araştırmalara yoğunlaşmıştır. Araştırmalar umut vadeden, kimyasal pestisitlerin yerine kullanılabilecek potansiyel biyopestisitler keşfetmektedir.

Biyopestisitler üç ana grupta incelenmektedir. Bunlar; mikrobiyal pestisitler, bitkisel pestisitler ve biyokimyasal pestisitlerdir. Kimyasal pestisitlerin yerine biyopestisitlerin kullanımının çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Biyopestisitler doğası gereği geleneksel pestisitlere kıyasla çok daha zararsızdır. Geleneksel pestisitler geniş spektrumludur. Bu nedenle kuşlar, böcekler ve memeliler gibi birçok canlıyı olumsuz olarak etkilemektedir. Bunun aksine biyopestisitlerin spekturumu çok dardır ve büyük çoğunlukla yalnızca hedef zararlıyı doğrudan etkiler. Biyopestisitlerin geneline bakıldığında küçük miktarları etkilidir. Bu sayede daha düşük maruziyet sağlanarak geleneksel pestisitlerin neden olduğu kirlilik ve kalıntı sorunu da önlenmiş olur (Yarsan ve Çevik 2007).

Biyopestisitlerden olan mikrobiyal biyopestisitler virüs, bakteri, fungus, protozoa veya nematod gibi canlı mikroorganizmaların kendilerini veya bu mikroorganizmaların üretmiş oldukları çeşitli protein ve ürünlerini içerebilmektedir. Mikroorganizma ürünleri arasında başlıca *Serratia marcescens* olmak üzere çok sayıda bakteri türleri ve bazı fungus türleri tarafından üretilen kitinaz enzimi yer almaktadır. Mikroorganizma ve bitki gibi canlıların kendi ürünleri olan enzimler veya metabolitler günümüzde zararlı böcekler ile mücadelede alternatif bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır (Huang and Chen 2008). Bakteriyel kitinazların biyokimyasal özellikleri, kitinazları kodlayan genler, katalitik mekanizmaları ve üç boyutlu yapıları üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe çoğalmaktadır (Watanabe et al. 1997). Bakteriyel kitinaz çalışmaları ise sıklıkla *Serratia* cinsi bakterilerle yapılmaktadır. Literatürde birden fazla kitinaz genine sahip bakteri örnekleri görülmektedir. *Bacillus circulans* WL-12 suşu kitinaz A, C ve D genlerine

(Alam et al. 1996), *Serratia marcescens* 2170 suşu *kitinaz* A, B ve C1 genlerinin üçüne de sahiptir (Suzuki et al. 2002).

Bahsedilen mikroorganizmalar ve ürünlerin tek başlarına veya farklı ürünlerle kombinasyon halinde kullanımının kimyasal pestisitlerin çevre ve canlılar üzerindeki zararlı etkilerini ve pestisitlere karşı gelişen direnç problemini çözebilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Sulaiman 2020).

P. brassicae larvaları ülkemizde hem kış hem de yaz aylarında çeşitli bölgelerde ve iklimde yaşayabilen, oldukça aktif bir tarım zararlısıdır. Ayrıca dişi birey bir yaprak üzerine çok sayıda yumurta bıraktığı için larvalar bitkiyi kısa sürede koloni halinde istila ederek bitki yaprakları ile beslenir. Mücadelesinde günümüze kadar kimyasal ürünler kullanılmıştır. *P. brassicae* zararlısından izole edilen ve organik biyopestisit haline getirilerek ticarileştirilen bir ürün henüz bulunmamaktadır (Kasi et al. 2021).

Serratia cinsinin en bilinen türü olan *S. marcescens* konak spektrumu geniştir. İnsanlarda, bitkilerde, böceklerde ve suda görülmektedir. Diğer *Serratia* türleri arasında *S. entomophila*, *S. rubidaea*, *S. proteamaculans*, *Serratia liquefaciens* ve *S. ficaria* böcek patojenleri olarak bilinmektedir (Williams et al. 2022). Bugüne kadar *Serratia* türünden tarım zararlılarına karşı üretilen formülasyon ile ilgili literatürdeki tek çalışma, *S. entomophila* bakterisinin *Costelytra zealandica*'ya karşı geliştirilen sıvı ve granül formülasyonunu içermektedir. *Serratia* türlerinin biyolojik mücadelede kullanımı genellikle kitinazlarla ilgilidir (Townsend et al. 2004).

Literatür özetlerinde bahsedildiği üzere kitinaz enziminin entomopatojenik kullanımına yönelik çalışmalar *S. marcescens* türleri ile sınırlı olup farklı konakçılar üzerindeki etkisi nispeten düşüktür. Bu tez çalışmasında ilk kez *S. ficaria*'dan izole edilen kitinazların moleküler özellikleri belirlenmiştir. Bakterinin, kendi konakçısı *P. brassicae* üzerindeki virülans etkisi tespit edilmiştir. *S. ficaria*'nın NCBI veri tabnındaki genom haritası incelenmiştir. *Kitinaz* A, B ve D olmak üzere kitinaz enzimine ait üç gene sahip olduğu görülmüştür. *P. brassicae*'ya karşı en etkili enzimi tespit etmek üzere tarama testi yapılmıştır. Tarama testi sonuçları, *P. brassicae* larvaları üzerinde %100 ölüm oranıyla en etkili kitinazın, *Kitinaz* A olduğunu göstermiştir. *Kitinaz* uygulaması sonrasında larvalarda kontrol grubuna kıyasla gelişim geriliği görülmüştür. Ardından Doz tarama testi yapılarak *Kitinaz* A enziminin en etkili dozu belirlenmiştir. Doz deneyinde *Kitinaz*

A enziminin larvalara 5 farklı dozda uygulanmasından 10 gün sonra larvaların yarısını öldüren konsantrasyon olan LD₅₀ değeri 1095,31 ng/μl olarak belirlenmiştir.

Özgen vd (2013) yapmış oldukları çalışmada *Bacillus thuringiensis*'in virülansını arttırmak için *S. marcescens*'e ait kitinaz B ve C genlerini kullanmışlardır. Rekombinant olarak ürettikleri *B. thuringiensis*'in *Galleria mellonella* larvaları ve *Drosophila melanogaster* erginleri üzerindeki virülansının yabani tipe göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Özgen vd 2013).

Danışmazoğlu vd (2015) *S. marcescens*'ten eksprese edilen kitinaz A, B ve C enzimlerinin *Helicoverpa armigera* ve *Malacosoma neustria* larvalarına karşı virülans etkilerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek ölüm oranına sahip enzimlerin; *M. neustria* için kitinaz C (%66) ve *H. armigera* için kitinaz A (%80) olduğu tespit edilmiştir (Danışmazoğlu vd 2015).

Abulikemu et al. (2021) tarafından yılında yapılan çalışmada, *Serratia marcescens* bakterisine ait Kitinaz C enziminin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kitinaz uygulaması sonrası larvalar 14 gün takip edilmiş ve sonucunda popülasyonun yarısını öldüren dozun 2095,064 ng/μl olduğu kaydedilmiştir. *S. ficaria* genomundaki kitinaz A geninin blast analizi yapıldığında *S. marcescens*, *S. entomophila*, *S. ureilytica* ve *Serratia nematodphilia* genomlarındaki kitinaz A genine %90-100 benzer olduğu belirlenmiştir (Abulikemu et al. 2021).

Bu sonuç, izole edilmiş olan *S. ficaria*'ya ait kitinaz A geninin *Serratia* türünde ortolog olduğunu düşündürmektedir. Yapılan tez çalışmasında en etkili bulunan kitinaz olan Kitinaz A'nın 10 gün içerisinde popülasyonun yarısını öldüren konsantrasyonun 1095,31 ng/μl olduğu tespit edilmiştir. Literatürden anlaşılaacağı üzere kitinaz enziminin entomopatojenik kullanımına yönelik çalışmalar *S. marcescens* türleri ile sınırlı olup farklı konakçılar üzerindeki etkisi nispeten düşüktür. Kitinaz enzimi üzerine yapılmış diğer çalışmalarla kıyaslandığında doğal olarak enfekte olan *Pieris brassicae*'den izole edilmiş *Serratia ficaria*'ya ait kitinaz enziminin daha kısa sürede çok daha az konsantrasyonda etkili olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kitinazların virülansta önemli bir rolü vardır ve çoğunlukla belirli bir sürecin parçasıdır. Bu durumda, peritrofik membranın vb. bozulması yoluyla patojenlerin girişini sağlayabilirler. Bu nedenle ilave laboratuvar deneyleri ve araştırmalar yapılması sürecin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada literatürden farklı olarak ilk kez *S. ficaria* bakterisinin kitinaz geni kullanılarak kitinaz enzimi üretilmiş ve tarım zararlısı olan *P. brassicae* larvalarına karşı virülans etkisi incelenmiştir. Ülkemizde boyut olarak en büyük lahanalar Erzurum ilinde yetiştirilmektedir. Gerek ülkemizde gerekse Erzurum ilinde lahana yetiştiriciliği ekonomik açıdan öneme sahiptir. Ayrıca lahana besin değerleri yönünden çok besleyici ve sağlıklı bir sebzedir. *P. brassicae* ise bu sebzenin en önemli zararlısıdır ve yıl içinde üretimi etkileyen etmenlerin başında gelmektedir. Buna rağmen bu zararlıya karşı mücadele için kullanılacak kimyasal pestisit dışında alternatif ve çevreye karşı duyarlı pestisit yok denecek kadar azdır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler *S. ficaria*'nın Chit-A enziminin *P. brassicae* larvalarının biyolojik kontrolü için umut verici olduğunu göstermektedir. Böylece, Chit-A enziminin büyük ölçekli üretimi ve *P. brassicae*'ya karşı biyolojik bir preparat haline getirilmesi için araştırmalara devam edilebilir. Bakteriyel kitinazların insektisit amaçlı kullanımı için aynı ortamı paylaşan diğer zararlılar ve faydalı böcekler üzerinde ileri biyotestlerin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abulikemu, S., Yesilyurt, A., Gencer, D., Usta, M. and Nalcacioglu, R. 2021. Comparison of the potential activities of viral and bacterial chitinases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31, 91.
- Aggarwal, C., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B. and Khan, M. 2015. Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. *BioControl*, 60(5), 631-640.
- Akdağcık, Z. 2010. Çukurova bölgesi Cruciferae üretim alanlarında zararlı olan lepidopter türlerin popülasyon gelişmeleri, predatör ve parazitoitlerinin belirlenmesi ve *Pieris brassicae* (L.)'nin bazı biyolojik özellikleri ile mücadelesi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, 83, Adana.
- Alam, M.M., Mizutani, M., Isono, T., Nikaidou, N. and Watanabe, T. 1996. Three chitinase genes (chiA, chiC and chiD) comprise the chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12. *J Ferment Bioeng*, 82, 28–36.
- Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A. and Kellogg, E. A. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259, 89-120.
- Anonim, 2008. Web Sitesi: <https://megep.meb.gov.tr>, Erişim Tarihi: 15.10.2023.
- Anonim, 2010. Web Sitesi: <https://kutuphane.tarimorman.gov.tr>, Erişim Tarihi: 15.10.2023.
- Arshad A. and Parvez Q. R. 2007. Developmental response of cabbage butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) on different cole crops under laboratory and field condition. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6: 1241-1245.
- Bahar, A. A., Sezen, K., Demirbağ, Z. and Nalçacıoğlu, R. 2012. The relationship between insecticidal effects and chitinase activities of Coleopteran-originated entomopathogens and their chitinolytic profile. *Annals of Microbiology*, 62(2), 647-653.
- Baranek, J., Pluskota, M., Rusin, M., Konecka, E., Kaznowski, A. and Wiland-Szymańska, J. 2023. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from tropical greenhouses towards *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua* larvae. *BioControl*, 68(1), 39-48.
- Bekircan, Ç. 2012. Büyük lahana kelebeği (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera: Pieridae)'nde yeni bir mikrosporidium (protista) türünün karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 62, Trabzon.

- Chavan, S. B. and Deshpande, M. V. 2013. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnology Progress*, 29(4), 833-846.
- Danişmazoğlu, M., Demir, I., Sezen, K., Muratoğlu, H. and Nalcacioglu, R. 2015. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, chiB, chiC) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish Journal Of Biology*, 39,78-87.
- David, W. A. L. 1978. The granulosis virus of *Pieris brassicae* (L.) and its relationship with its host. *Advances in Virus Research*, 22, 111-161.
- Dhawan, M. and Joshi, N. 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 522-529.
- Dikbaş, N., Ucar, S., Tozlu, G., Özer, T. Ö. and Kotan, R. 2023. The effect of immobilized chitinase enzyme on the biocontrol of *Sitophilus zeamais*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(2), 170-177.
- Dukare, A. S., Paul, S., Asha, A. D., Nivetha, N., Aggarwal, C. and Divekar, P. 2021. Role of bacterial and fungal chitinases in integrated management of pest and diseases of agro-horticultural crops. *Microbes for Sustainable Insect Pest Management: Hydrolytic Enzyme & Secondary Metabolite 2*, 33-57.
- Dursun, N. ve Gülşen, H. 2019. Biyohidrojen Üretim Yöntemleri ve Biyohidrojen Üretiminde Biyoreaktörlerin Kullanımı. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(1), 66-75.
- Eroğlu, G. B. 2020. *Heliothis* (Yeşilkurt), (Lepidoptera: Noctuidae) türlerinin viral patojenlerinin araştırılması. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 138, Trabzon.
- Funkhouser, J. D. and Aronson, N. N. 2007. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1-16.
- García-Fraile, P., Spröer, C., Chesneau, O., Criscuolo, A., Lang, E. and Clermont, D. 2020. *Serratia vespertilionis* is a later heterotypic synonym of *Serratia ficaria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1961-1962.
- Huang, C. J. and Chen, C. Y. 2008. Synergistic interactions between chitinase ChiCW and fungicides against plant fungal pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 784-787.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H. and Verpoorte, R. 2009. Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 31-43.

- Johnson, V. W., Pearson, J. and Jackson, T. A. 2001. Formulation of *Serratia entomophila* for biological control of grass grub. *New Zealand Plant Protection*, 54, 125-127.
- Kasi, I. K., Singh, M., Waiba, K. M., Monika, S., Waseem, M. A., Archie, D. and Gilhotra, H. 2021. Bio-efficacy of entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* against the Cabbage butterfly (*Pieris brassicae* [L.]) under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 1-7.
- Konak, Ü. İ., Karakaş, B., Certel, M. ve Fundagül, E. R. E. M. 2012. Katı faz fermentasyon yöntemi ile enzim üretimi. *Akademik Gıda*, 10(3), 84-92.
- Korany, S. M., Mansour, A. N., El-Hendawy, H. H., Kobisi, A. N. A. and Aly, H. H. 2019. Entomopathogenic efficacy of the chitinolytic bacteria: *Aeromonas hydrophila* isolated from Siwa Oasis, Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29, 1-10.
- Kumar, M., Chakdar, H., Pandiyan, K., Thapa, S., Shahid, M., Singh, A., Srivastava, A. K. and Saxena, A. K. 2022. Bacterial chitinases: genetics, engineering and applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 252.
- Kuzu, S. B. 2008. Kitinaz üreten bacillus izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Byoteknoloji Anabilim Dalı, 93, Adana.
- Mahmood, S., Kumar, M., Kumari, P., Mahapatro, G. K., Banerjee, N. and Sarin, N. B. 2020. Novel insecticidal chitinase from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 394-401.
- Mascarin, G. M. and Jaronski, S. T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1-26.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. and Hens, L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4, 148.
- Onaran, H., Ünlenen, L. A. ve Doğan, A. 2000. Patates araştırma enstitüsü müdürlüğü patates tarımı, sorunları ve çözüm yolları, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 88, Niğde.
- Oyeleye, A. and Normi, Y. M. 2018. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, 38(4).
- Ölmez, M., Sertkaya, E., Büyük, M. ve Alaserhat, İ. 2021. Bitlis, Muş ve Van illeri lahanada ekim alanlarındaki zararlı ve faydalı böcek türleri, önemli zararlı ve faydalı türün popülasyon değişiminin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (31), 256-267.

- Özcan, N. 2010. *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae)'nın bir mikrosporidium patojeninin karakterizasyonu ve varlığı. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 47, Trabzon.
- Özgen A., Sezen K., Demir I., Demirbag Z. and Nalcacioglu R. 2013. Molecular characterization of chitinase genes from a local isolate of *Serratia marcescens* and their contribution to the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains. *Current Microbiology* 67, 499-504.
- Öztemiz, S. C. 2008. Organik tarımda biyolojik Mücadele. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 2008(2), 19-27.
- Papazian, S. 2017. Black mustard and the butterfly effect: metabolomics of plant-insect interactions under multiple stress conditions. Doctoral Dissertation, Umeå University, Umeå Plant Science Centre, Fysiologisk Botanik, 70, Sweden.
- Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3)1-15.
- Ramirez, D., Abellán-Victorio, A., Beretta, V., Camargo, A. and Moreno, D. A. 2020. Functional ingredients from Brassicaceae species: Overview and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1998.
- Sewak, N. and Singh, S. N. 2021. Efficacy of native isolates of entomopathogenic bacterium against cabbage butterfly (*Pieris brassicae* linn.). *Journal of Entomological Research*, 45(2), 214-223.
- Sharma, A. and Gupta, R. 2009. Biological activity of some plant extracts against *Pieris brassicae* (Linn.). *Journal of Biopesticides*, 2(1), 26-31.
- Singh, A. K., Singh, A. and Joshi, P. 2016. Combined application of chitinolytic bacterium *Paenibacillus* sp. D1 with low doses of chemical pesticides for better control of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Pest Management*, 62(3), 222-227.
- Sönmez, F., 2005. Kültür bitkilerinde zarar yapan hastalık ve zararlıların tanınması ve mücadelesi. T.C. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü, 2005, Samsun.
- Sreeraman, N., Sathish Gandhi, V. C., Subash, A. and Marimuthu, N. 2016. Experimental study of biopolymer nano composite for engineering applications. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 5, 186-189.
- Sulaiman, A. 2020. Viral ve bakteriyel kitinazların insektisidal aktivitelerinin karşılaştırılması; kitinazın viral infektiviteye etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 65, Trabzon.

- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. and Watanabe, T. 2002. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(5), 1075-1083.
- Tao, A., Wang, T., Pang, F., Zheng, X., Ayra-Pardo, C., Huang, S. and Li, D. 2022. Characterization of a novel chitinolytic *Serratia marcescens* strain TC-1 with broad insecticidal spectrum. *AMB Express*, 12(1), 1-13.
- Tepe, Ö. ve Dursun, A. Y. 2022. Biyoreaktörde *Bacillus pumilus* ile pektinaz enzimlerinin üretimi ve karıştırma ve hava akış hızının etkisinin incelenmesi. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(1), 239-252.
- Townsend R.J., Jackson T.A., Ferguson C.M., Proffitt J.R., Slay M.W.A., Swaminathan J. and Johnson V.W. 2004. Establishment of *Serratia entomophila* after application of a new formulation for grass grub control. *New Zealand Plant Protection*. 57, 310-313.
- Tozlu, G., Gültekin, L., Hayat, R. ve Güçlü, Ş. 2002. Erzurum'da lahanada zarar yapan böcek türlerinin doğal düşmanları üzerinde çalışmalar. Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi 4-7 Eylül, Atatürk Üniveristesi, Bildiri Özetleri Kitabı, 227-235, Erzurum.
- Vaikuntapu, P. R., Rambabu, S., Madhuprakash, J. and Podile, A. R. 2016. A new chitinase-D from a plant growth promoting *Serratia marcescens* GPS5 for enzymatic conversion of chitin. *Bioresource Technology*, 220, 200–207.
- Vaughan, A. L., Altermann, E., Glare, T. R. and Hurst, M. R. 2022. Genome sequence of the entomopathogenic *Serratia entomophila* isolate 626 and characterisation of the species specific itaconate degradation pathway. *BMC Genomics*, 23(1), 1-22.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. and Regue, M., 1997. Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of Bacteriology*, 179, 7111-7117.
- Williams, D. J., Grimont, P. A., Cazares, A., Grimont, F., Ageron, E., Pettigrew, K. A. and Coulthurst, S. J. 2022. The genus *Serratia* revisited by genomics. *Nature Communications*, 13(1), 5195.
- Yaman, M. and Demirbag, Z. 2000. Studies of bacteria as potential microbial control agents of the large white butterfly, *Pieris brassicae* (Linnaeus)(Lepidoptera: Pieridae). *African Entomology*, 8(1), 145-149.
- Yarsan, E. and Çevik, A. 2007. Biopesticides for vector control. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 64(1), 61-70.