

## Genetik mühendisliği ve biyolojik insektisitler

Hikmet ÖZBEK\*

### Summary

#### Genetic engineering and biological insecticides

Bacteria, fungi, and viruses that are pathogenic to insects have great potential in pest management. Some of these microorganisms have been used in the field as biological control agents, and a few of them have been developed successfully as a commercial insecticides on a large scale in various countries. Widespread commercial production of microbial insecticides awaits further studies of the biology, ecology, and pathogenicity of the agents. The virulence of these microorganisms can be increased, their host range broadened, and manufacturing processes improved by using genetic engineering techniques.

### Giriş

Kültür bitkilerinde zararlı olan böceklerle mücadelede, değişik kimyasal yapı ve formülasyonlara sahip geniş spektrumlu kimyasalların özellikle II. Dünya Savaşı'nı izleyen yıllardan başlayarak giderek artan oranda kullanılmaları, çevre kirliliği ve daha birçok sorunları da birlikte getirmiş, bu sahadaki çalışmaları, ilâçlı savaş dışında değişik yöntemlerin araştırılmasına veya var olanların geliştirilmesine yöneltmiştir. Bununla ilgili olarak son 10-15 yıldan buyana «biyolojik insektisit» adı verilen bazı bakteri, fungus ve virüs gibi mikrobiyal patojenlerin böceklerle mücadelede kullanılmasında büyük aşamalar kaydedilmiştir. Biyolojik insektisitlerin spesifik oluşları, hiçbir toksik kalıntı bırakmamaları, doğada bir defa yerleştikten sonra çok kez kendiliklerinden çoğalma ve yayılma imkânına sahip olmaları, kimyasallara olan üstünlüklerinin en önemli yanlarıdır. Ancak bunların yay-

\* Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Erzurum.

gün bir şekilde kullanılmalarını engelleyen bazı önemli faktörler vardır. Funguslar dışındakiler, böceklerle temas halinde geldiklerinde hemen faaliyet göstermemekte, bunların böceğin yiyecekleri ile birlikte sindirim sistemine ulaşmaları gerekmektedir. Ayrıca uygulama zamanı ve yerinin de çok iyi ayarlanması gerekmektedir, böcek her döneminde ve her yerde aynı hassasiyeti göstermemektedir (Miller et al., 1983).

Genlerin yapı ve fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasında son 10 yılda büyük ilerlemeler kaydedilmiş, moleküler biyolojide yeni bir dönem başlamıştır. Nathans (1979), bu dönemi «Yeni Genetik» olarak tanımlamıştır. Bu yeni bilim dalının esası rekombinant DNA tekniğidir. DNA molekülünün işlenmesi, bir hücreye aktarılabilmesi mümkün olabilmektedir. Altmışlı yılların sonunda gerçekleştirilen çok değerli bazı çalışmalar yeni teknolojinin kaynağını teşkil etmiş; kendi yapısında bulunmayan içerikteki DNA'yı kabul edilen DNA'nın da hücrede faaliyet göstermesine olanak tanıyan mutasyonla elde edilmiş *Escherichia coli* ırklarının geliştirilmesi bu konudaki en önemli aşamayı oluşturmaktadır (Abelson, 1983).

Genetik mühendisliğin biyolojik insektisitlere uygulanmasındaki başarıda; bu insektisitlerin genetik ve moleküler seviyede etki mekanizmalarının çok iyi bilinmesi, biyolojik ürün veya patojen DNA tekniklerinin rekombinasyon veya klasik yolla meydana gelen genetik manipülasyonun çok iyi uyum göstermesi gerekmektedir. Organizmanın genetik yapısının iyi incelenmesi; DNA'nın sabit ve biyolojik olarak aktif formda organizmaya etkili bir şekilde uygulama yöntemlerinin iyi bilinmesi veya bu yöntemlerin geliştirilmesi zorunludur. Diğer taraftan, spesifik olarak organizmanın küçük bir ortamda çok miktarda ve hızlı bir şekilde üretilmesi gerekmektedir (Kirschbaum, 1985).

Miller et al. (1983), böcek öldürme potansiyeline sahip doğal olarak bulunan yaklaşık 1500 kadar mikroorganizma veya mikrobiyal ürünün tesbit edildiğini belirtmektedir. Mikrobiyal insektisitlerin temelini bakteri, virüs ve funguslar oluşturmaktadır.

## Bakteriler

Bacillaceae, Micrococcaceae, Lactobacillaceae ve Pseudomonadaceae familyalarına ait 100'den fazla bakteri türünün entomopatogenik olduğu tesbit edilmiştir. *Bacillus thuringiensis*, *B. t. israelensis*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus* ve *B. popilliae* biyolojik mücadele etmeni olarak büyük önem arz etmekte ve *B. thuringiensis*'in birçok alttür ve ırklarının endüstriyel imalatı yapılmakta ve dünya çapında kullanılmaktadır (Miller et al., 1983).

*B. thuringiensis* spor oluşturmaya başladığı zaman çözünmeyen güçlü kristal toksin üretir. Bu kristal veya delta - endotoksin sporulasyon halindeki hücrelerde faz - kontras altında görülebilir ve hücre ağırlığının % 20 - 30'unu oluşturur. Keza, *B. thuringiensis*, insektisit etkiye sahip, suda eriyen, ısıdan etkilenmeyen adenine nükleotid türevi beta - exotoksin üretir. Bu madde ağız yoluyla kuşlara hafif toksiktir (Burges, 1982). Bakteriler ticari amaçla insektisit olarak hazırlanırken fermantasyona tabi tutulur ve stabilize edilmiş emulsiyon, ıslanabilir toz veya toz olarak formüle edilirler. Bunlar spor karışımı, toksin kristalleri ve dolgu maddesi ihtiva ederler. Sporların çimlenmelerini, fungus ve diğer bakterilerin bulaşmasını önlemek için sıvı formülasyonlara % 3 - 4 oranında ksilen ilâve edilir. Ruhsat almış bu şekildeki ilâçlar Lepidoptera larvalarına karşı başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Miller et al., 1983). Beta - exotoksinden arındırılmış insektisitler'in insan ve diğer omurgalılara, bitkilere ve faydalı faunaya toksik veya allerjik etki yapmadıkları tesbit edilmiştir (Burges, 1982). Diğer taraftan böceklerde bunlara karşı herhangi bir direnç meydana gelmediği gibi, kimyasal insektisitlere yüksek mukavemet oluşturan böceklerde de çapraz direnç görülmediği belirtilmektedir (Burges, 1982).

Biyolojik insektisit içerisindeki endotoksin genetik mühendisliğinin bu sahadaki temel çalışma alanı olmaktadır. Çünkü bu toksin tek bir glycoproteinden meydana gelmiştir ve temel yapısı bir gen tarafından idare edilmektedir. Tek genler kolay izole edilebilmekte, bunların yapısal ve düzenleyici bölgelerinin nükleotid dizilişleri rutin tekniklerle belirlenebilmektedir (Kirschbaum, 1985). Nükleotid diziliş sıraları ister şansa bağlı, ister belirli bir yere özgü olacak şekilde modifiye edilip genetik varyant familyaları meydana getirilebilmektedir. Bu genetik varyant, mikrobial konukçuya biyolojik aktif bir şekilde yerleştirilebilmektedir (Kirschbaum, 1985).

Kirschbaum'a göre genetik mühendisliğin devreye sokulması ile toksinin etkisi artırılabilenkte, daha geniş spektrumlu olması sağlanmakta ve üretim maliyeti düşürülebilmektedir. *B. thuringiensis*'in etkisini azaltan faktörler arasında organizmanın arazide kısa süre kalabilme gücüne sahip olması yer almaktadır.

Kristal toksinin yarı ömrü havasız kontrollü koşullarda 8 saat olmaktadır. Şimdilik buna genetik bir çözüm getirilmemekle birlikte, ticari ürünlerin formülasyonu ile ilgili temel çalışmaların yakın bir gelecekte çözüm vaat ettiği belirtilmektedir (Kirschbaum, 1985).

*B. thuringiensis*'in farklı alttürleri değişik biyolojik aktivite göstermektedir. Örneğin *B. t. kurstaki*'nin kristal toksini bazı Lepidoptera'ya toksik olmasına karşın Diptera'ya etkisiz iken *B. t. israelensis* Diptera'ya etkili, fakat Lepidoptera'ya etkisizdir (Burges, 1982; Miller et al., 1983). Her iki durumda

da kristal toksin aynı nisbi molekül ağırlığında glycoprotein protoksin'i meydana getirecek şekilde çözünebilir hale getirilebilirler. Bu protoksin'ler peptik yapısı, amino asit kompozisyonu, immünolojik cross-reaktivite ve karbonhidrat içeriği bakımından farklıdır (Miller et al., 1983). Böylece insektisit etkiye sahip bu iki kristal arasındaki konukçu kapsamı ve toksisite farkının benzer büyüklükte ve aynı orijinli protoksinlerin yapısal farklılıklarından ileri geldiği anlaşılmaktadır. Protoksin geninin uygun şekilde genetik modifikasyonu, bu genin kodladığı ürünün insektisit etkisini yeterli düzeyde artırabilmektedir (Kirschbaum, 1985).

Kristal toksinin etki mekanizması şimdiye kadar tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, kristal orta barsakta çözülebilir hale geldikten sonra, çözünebilir glycoprotein protoksine dönüşmekte, bunun da proteolytic ayrışma ile aktive edilerek daha küçük toksin moleküllerini meydana getirdiğine inanılmaktadır (Burgess, 1982; Miller, 1983). Aktif toksinin büyüklüğü kesin bilinmemektedir. Bazı koşullarda, çözülmüş kristaller kendiliğinden yavaşça bir değişmeye uğrayarak değişik ürünler meydana getirmektedir. Esas ürün protoksin veya kristalin toksisitesini oluşturan  $6-7 \times 10^4$  dalton'luk proteindir. Benzer şekilde, tripsin veya böceğin orta barsak salgısı ile saflaştırılmış protoksin de aynı ebatta aktif toksin meydana getirmektedir (Burgess, 1982; Kronstad et al., 1983). Diğer in vitro çalışmaları, muayyen koşullar seti altında kristalin çözünebilir hale gelerek yaklaşık  $1 \times 10^3$  dalton'luk bir son ürün meydana getirdiğini ve bu ürünün başlangıçtaki materyalin toksik özelliğini koruduğunu göstermektedir (Kirschbaum, 1985). Nihai toksin, büyüklüğüne bakılmaksızın orta barsak epitel hücreleri yüzeyinde faaliyet göstererek hücre uçlarının şişmesine ve böceğin beslenmesinin durmasına neden olmakta, daha sonra da epitel hücreler parçalandığı için kristalin alınmasından itibaren birkaç gün içerisinde böcek ölmektedir (Burgess, 1982). Barsak epitel hücreleri veya hemositlerin primer kültürlerini kullanarak yapılan in vitro çalışmalarında, aktif hale getirilen toksinin test kültürüne katılmasından itibaren birkaç dakika içerisinde önemli morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir (Kirschbaum, 1985).

Daha etkili ve daha geniş spektrumlu toksin'in geliştirilmesinde ilk adım, protoksin geninin izole edilmesidir. *B. t. kurstaki*, *B. t. berline* ve *B. sphaericus*'a protoksin genleri aşılansın, ayrıca bazı durumlar için genin 5 ucunu da içeren üst kısmında nükleik asit dizisi tesbit edildiği bildirilmektedir (Wong et al., 1983). Bundan sonraki aşama daha büyük protoksin geni içerisinde asıl aktif toksin için dizinin yerini tesbit etmek olacaktır. Tam protoksin gen diziliş sırası ile kısmi amino asit diziliş ve asıl toksinin molekül ağırlığı gibi bilgilere ihtiyaç vardır. Nihai toksinin ebadı ile ilgili şu andaki durum kesin olmadığı için mesele biraz daha komplike görülmektedir (Kirschbaum, 1985).

Sınırlayıcı enzimler ve exonuclease, protoksin genini birçok DNA parçalarına bölmede kullanılmaktadır. Ayrıca her genetik aşılınmış DNA parçasını taşıyan vektör ile yapısı değiştirilmiş bakteriden alınan ekstraktlar bioassay yardımı ile toksisite yönünden test edilebilmektedir. Daha küçük diziyeye kodlanmış protoksine indirgenen bir genin tekabül ettiği karşılıklı daha küçük parçalara bölünen proteinlerde toksinin gücü artmaktadır (Kirschbaum, 1985).

Toksinde yapı - fonksiyon ilişkilerinin belirlenmesi, molekülün genetik olarak yeniden düzenlenmesini mümkün kılmakta ve bu sayede toksinin optimum performansı sağlanmış olmaktadır. Değişik konukçuları olan *B. thuringiensis*'den genetik aşılanan çeşitli toksinlerin nükleotid dizilişinin tesbiti ve sonuçlanan amino asid dizilişinin incelenmesi, sabit ve değişken bölgelerin varlığını göstermektedir. Değişken bölge, biyolojik aktivite farklılıklarından kaynaklanabilir. Nükleotid ve amino asid dizilişinde farklı olan peptid bölgeleri, yüklenme ve amino asitlerin sekonder ve tersier yapılışını gösterme eyiliminde benzerlik arz etmektedirler (Kaiser and Kezdy, 1984).

Bir başka yaklaşım da, sabit (sabit) ve değişken bölgeleri geçici olarak tanımlamak için yoğun genleşilmesi ve gen sıralaması yerine, nükleik asit hibridizasyonu kullanmaktır. Bir kere bir gen, genetik olarak aşılandı ve bitiş noktası belirlendikten sonra bir serji bitişik gen boydan boya kat eden iç test ediciler hazırlanıp farklı *B. thuringiensis* ırklarından, total plasmid DNA'ya karşı hibritleştirilmede kullanılabilir, zira protoksin genleri çoğunlukla plasmid çıkışlıdır (Burges, 1982). Her test edici için hibridizasyonun şiddetini değiştirerek farklı toksin genleri arasında hangi bölgenin sabit olduğu hakkında temel bilgiler elde etmek mümkün olabilir. Kronstad et al., (1983) yaptıkları çalışmada *B. t. kurstaki* protoksin geninin 5' ucundan tek bir 732 -bp sınırlı parçasını, *B. thuringiensis*'in 9 alttürünü temsil eden insektisit özelliğe sahip ırkın hibridizasyon test edicisi olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada Lepidoptera'ya toksik olan ırkların DNA'sı ile test edici, hibritleştiği halde Diptera'ya toksik olanlarınki ile hibritleşmediği belirtilmektedir.

Toksin molekülünün hangi kısmının biyolojik aktivite için önemli olduğunu anlamak için toksin grup spesifik ajanlarla yeniden reaksiyona sokularak bioassay yapılmakta, bu yeni ajanlar, sadece amino asitleri kovalant olarak modifiye eden klasik ajanlar olmayıp monoclonal antikorları da içermektedir (Kirschbaum, 1985).

Protein ve nükleik asid sıra analizleri, toksinin gücünü ve spektrumunu arttırmada ne gibi genetik değişikliklerin gerektiği hakkında bilgi vermektedir. Belli bir yere yönlendirilmiş mutagenesis teknikler, genin spesifik

noktalarında yapılacak değişiklikler için kullanılabilir. Keza farklı toksin genlerin kısımları birleştirilerek bir toksinden daha fazla özellikleri bir araya getiren hibrit genler oluşturulabildiği gibi, beklenmeyen düzeyde fevkaledede arzu edilen özelliklere sahip yeni bir molekül meydana getirilebilmektedir (Kirschbaum, 1985).

Arzu edilen ticari özelliklere sahip toksin elde edildikten sonra yeni proteinin formüle dilip üretilmesi gerekmektedir. Genetik mühendisliğinin bu aşamada da devreye girmesi beklenmektedir. Ancak imalatla teorik olarak ikı engel ortaya çıkmakta; birincisi, kristal toksin sentezinde sadece sporlaşma başlangıcında olduğundan fermantasyon esnasında kullanılan zamanın yalnız bir kısmı ürün sentezine ayrılmaktadır, ikincisi, sporlaşma tamamlandığında hücrenin içeriği boşanmakta ve ürün sentezi durmaktadır. Toksin genin etkisinin sporlaşmanın kontrolünden çıkarılma işlemi, yapısal gen sıralamasının güçlü yapısal geliştirciler ile birleştirilerek sağlanabilmektedir. Bu şekildeki hücreler fermantasyonun bütün safhaları boyunca büyük miktarda toksin üretmektedirler (Kirschbaum, 1985). Ayrıca eğer yapısı değiştirilmiş olan konukçu sporlanmayan *B. thuringiensis* veya sporlanmayan ve büyük fermantasyon tanklarında yüksek hücre yoğunluğunda büyüyen bir başka mikrobiyal mutant ise, sürekli kültür fermantasyonu ile toksin üretimi mümkün olabilmektedir. Böylece bir sistemde halihazır uygulanan kütle fermantasyona oranla birim ünite başına verimlilik daha fazla olmakta ve maliyet daha düşük olmaktadır (Kirschbaum, 1985).

Bitki genetik mühendisliği teknolojisindeki gelişmeler, genetik olarak düzenlenmiş *B. thuringiensis* toksin geninin bitki içerisine yerleştirilebilmesi çalışmaları sürdürülmekte, böylece bitkiyi böceklerle karşı genetik yapı itibariyle dirençli yapmaya çalışılmaktadır. Ancak bu tip çalışmalarda bitkiye nakledilen genin tezahürünün o düzeyde olması gerekli ki, bitki üzerinde beslenen zararlı böcek, bitkiye zarar verecek seviyede beslenmeden öldürücü toksin dozunu alabilsin (Kirschbaum, 1985).

### Virüsler

Böcek virüsleri gen sayılarının az ve moleküler biyolojilerinin oldukça basit olmaları nedeniyle genetik mühendisliği çalışmaları için temel hedef oluşturmaktadırlar. Nükleer polyhedrosis virüsleri (NPVs) Lepidoptera takımına mensup kimı zararlı böceklerle mücadelede büyük önem taşıdıkları için bunlardan üç tanesi, ticari pestisid olarak tescil edilmiştir (Miller et al., 1982). NPVs değişik şekillerde formüle edilip uygulanabilmektedir.

Virüsler böceğin bünyesine girdikten sonra aktif hale geçer ve hastalığın ilerlemesine paralel olarak çoğalırlar. Hastalık sonucu ölen lepidopter lar-

vaları virüslerin yaprak yüzeyine ve toprağa yayılmasına neden olur ve böylece etki uzun süre devam eder. Ancak bu durum daha çok toprağa geçmiş olan virüsler için daha çok önemlidir. Yaprak yüzeyindekiler güneşin etkisi ile aktivitelerini daha çabuk kaybederler (Payne, 1982). Bu nedenle ticari virüs preparatları hazırlanırken formülasyonlarına ultraviyole ışınlarını absorbe edecek ajanlar katılmaktadır. Ticari virüsler elde edilirken larvalar kütle halinde üretilmekte, bunlar yapay olarak virüsle enfekte edilmektedirler. Bu yüzden işçilik ve zaman istemekte, ayrıca kütle halinde larva üretimini sağlayacak olanaklara ihtiyaç duyulmaktadır (Payne, 1982).

Moleküler düzeyde üzerinde en fazla çalışılan baculovirüs, *Autographa californica* nüklear polyhedrosis virüsü (AcNPV)'dür. AcNPV, silindirik nükleokapsid içersine paketlenmiş yaklaşık 128 kb çiftinde kovalant olarak çift kollu kapalı dairesel DNA genoma sahiptir (Miller et al., 1983). Bazen aberrant, yayılmış kapsid yapıları hücre kültüründe bulunmakta, bu durum, paketleme baskısının nükleokapsid içersinde birleştirilebilen DNA miktarını sınırlamadığını göstermektedir. Çeşitli nükleokapsid'ler tek bir kristal protein matrix'i içersine gömülmekte ve virüsün bu occluded formları, böcekler arasındataşınmada ve sindirim sistemine alındıktan sonra ön mideden arka barsağa geçmesinde sorumlu olmaktadır (Miller et al., 1983). Bu occluded hücre kültüründe infeksiyon yapabilmeleri için önce alkalide yarılmaları gerekmektedir. Protein kristaline gömülmemiş tek nükleokapsid de mevcuttur. Bu şekildeki occluded olmayan böcek içersinde viral enfeksiyonu yapmaktadırlar. Bunlar, hücre kültüründe veya hemocoel'e enjekte edildiklerinde yüksek düzeyde infeksiyon gösterirler (Miller et al., 1983). Böcek occluded formdaki virüsü sindirim sistemine aldığı zaman, virüs orta barsağa gelmekte, burada alkali pH ve muhtemelen protease enzimi yardımı ile aktive edilmekte ve nükleokapsid'ler serbest bırakılmaktadır (Payne, 1982; Miller et al., 1983). Bu serbest bırakılan virionlar, orta barsak epitel hücrelerine tutunur ve birleşirler. Cytoplasma ve çekirdek zarından geçerek çekirdeğe ulaşır ve burada kaplanmamış (uncoated) hale gelirler. Viral DNA'nın çoğalması başlar, yeni oluşan virüsler plasma zarından geçerek hemolymph'e ulaşır, yağ dokusu, hemocyt'ler ve hypodermis'te sekonder infeksiyon meydana getirirler. Burada larvanın kuru ağırlığının % 30'una kadar ulaşacak düzeyde inclusion cisimcikleri oluşur. Böcek genellikle enfeksiyondan itibaren 2-5 günde ölür. Ölü larvaların parçalanmaları ile bitki yüzeyine ve toprağa bol miktarda virüs dağılır (Payne, 1982; Miller et al., 1983).

Hücre kültüründe enfeksiyonu takiben viral DNA sentezi 5 saat içersinde başlamakta, 6-8 saat sonra occluded olmayan viral antijenler, yaklaşık 10 saat sonra da occluded olmayan virüsler belirmektedir. Ondört saate kadar inclusion cisimcikleri görülür. Occluded olmayan virüslerin

üretim oranı azalır, yaklaşık 48 saat sonra ise cytolosis meydana gelir (Kirschbaum, 1985).

AcNPV genom'unun sınırlayıcı endonucleas enzimleri yardımı ile haritası çıkarılmış occlusion cisimciklerinin matrix'ini şekillendiren polyhedrin dışında 19'dan fazla gen ürününün fizikî harita üzerinde yerleri belirlenmiştir (Vlak and Smith, 1982).

AcNPV'nin genetik olarak düzenlenmesi ile ilgili ilk başarılı çalışma bir virüsün polyhedrin geninin çıkarılması (deletion) şeklinde olmuştur (Smith et al., 1983). Bu işlem aşılınmış polyhedrin geninde in vitro olarak yapılmıştır. Bunun için de kültürdeki hücreler, değiştirilmiş geni içeren bir sınırlayıcı parça (restriction fragment) ile değiştirilmemiş viral genom'u co-transfecte edilmiştir. In vivo homolog rekombinasyon'un neden olduğu allel değişimi polyhedrin genindeki bir deletion sonucu viral mutant meydana getirmektedir. Polyhedrin gen, aşılama ve yabancı DNA'nın kendini göstermesi bakımından uygun bir yer oluşturmaktadır. Bu genin fonksiyonu hücre kültüründe hücre dışı virüs üretimi için gerekli değildir. Ayrıca bu gen içerisinde yapılacak herhangi bir ekleme plaque morfolojileri ile meydana çıkarılabilen occlusion - negatif virüslerin oluşmasını sağlamaktadır. Keza polyhedrin geninin tanımı kuvvetli bir promoter kontrolü altında olmaktadır. Ağırılık olarak occluded virüsün yaklaşık % 95'i polyhedrinden oluşmakta ve occluded virüs böceğin kuru ağırlığının % 30'una kadar ulaşabilmektedir (Miller et al., 1983).

AcNPV açıklama sisteminin faydası, insan beta - interferon için gen kullanılarak gösterilmiştir. Interferon gen, önce polyhedrin promoter kontrolü altında genetik aşılınmış polyhedrin geni taşıyan bakteriye yerleştirilmiştir. Bu yapı daha sonra in vivo allel değişimi suretiyle AcNPV genom'una nakledilmiştir. Seçilen rekombinantların tahmin edilen yapısı sınırlama haritalaması ile teyid edilmiştir. Modifiye edilmiş AcNPV in vitro enfekte edilmiş *Spodoptera frugiperda* hücreleri 10 mikrogram interferon/10<sup>6</sup> hücre üretmiştir. Ayrıca glycosylate edilmiş ürünün % 95'den fazlasının büyüme ortamına olgunlaşmış interferon olarak salgılandığı görülmüştür. *E. coli* beta - galactosidase'yi kodlayan genin büyük bir kısmı AcNPV polyhedrin geninin 5' ucu ile birleştirilerek rekombinat virüsler elde edilebilmektedir (Kirschbaum, 1985)e.

Böceklere karşı zararlı ve öldürücü olan protein veya peptidleri kodlayan tek genler ya yüksek seviyede yapıcı viral promoterlere veya enfeksiyonun başlangıcında gen ürününün sentezinden sorumlu promoterlerle birleştirilebilmektedir. Bu yapılar birbirine eklenebilir veya viral genom'un zorunlu olmayan bölgeleri ile yer değiştirmede kullanılabilir. Böylece önceden var olan polyhedrin gen bütün olarak bırakılmış olur. Occluded virüs oluşumu



İçin tam polyhedrin gen gereklidir. Occluded virüsler arazide virüsün infekte eden formunu oluşturmaktadır. Değişik etki mekanizmasına sahip toksik protein veya polypeptid'ler için genler taşıyan bir virüs vektörü, bu unsurları böcek içerisinde değişik hedeflere dağıtmada kullanılabilir. Çok yönlü etkiye sahip viral insektisit'ler gerçekte önem arz etmektedir. Örneğin, bir virüs düşünülebilir ki, bu virüs orta barsak epitel hücrelerinde sentezlediği bir ürünle sadece böceğin beslenmesini durdurmakla kalmaz, hemolymph içerisinde sinir zehiri etkisine sahip bir toksin salgılar. Hemolymph içerisindeki toksin konsantrasyonu öldürücü düzeye çıkıncaya kadar böceğin beslenmesi engellenmiş olur ve daha sonra böcek ölür (Kirschbaum, 1985).

## Funguslar

Böceklerde hastalık yapan (entomogenous) 500'den fazla fungus türünün var olduğu ve önemli böcek takımlarının tümünde bu funguslara duyarlı olan türlerin bulunduğu belirtilmektedir (Miller et al., 1983). Bunların çoğunun böceklerde infeksiyon yapabilmeleri için böcek sindirim sistemine alınmalarına gerek olmamaktadır (Hall and Papierok, 1982). Böcek vücuduna tutunan conidia veya zoosporlar, iklim koşulları elverişli olduğunda çimlenmekte, çim tüpü veya appressorium'dan çıkan infeksiyon ayağı ile kutikula'dan giriş yaparak hemocoel'e ulaşmaktadırlar. Hemocoel'de maya benzer hücreler meydana getirmekte, toksik maddeler salgılayarak veya mekanik olarak taçz ederek konukçunun ölümüne neden olmaktadır (Miller et al., 1983). Daha sonra bu funguslar spor oluşturur, çevreye geçer ve yeni bulaşmalara neden olurlar. Değişik fungus türleri değişik böcek gruplarında infeksiyon yaparlar. Türlerle bağlı olarak bazı türler sıvı büyüme ortamında spor veya conidia meydana getirirler, kimi türler ise çok kompleks ve oldukça pahalı bir ortama gereksinim duyarlar (Miller et al., 1983).

Funguslar, böceklerle mücadelede önemli bir potansiyel arz etmelerine karşın ticari preparatlar olarak dünyada kullanımları şimdilik sınırlıdır. Bunlar arasında en yaygın olanlar; *Beauveria bassiana*'nın conidia sporlarından hazırlanan *Boverin*, Rusya'da patates böceğine karşı kullanılırken aynı fungus Çin'de mısır kurdu mücadelesinde kullanılmakta; *Metarhizium anisoplae*, *Metaguino* ticari adıyla Brezilya'da *Mahanarva posticata* (Cercopidae : Hom.) böceğine, *Nomurae rileyi* ise kimi yörelerde *Trichoplusia ni* (Noctuidae : Lep.)'ye karşı uygulanmaktadır. *Verticillium lecanii* İngiltere'de ticari olarak üretilip başta aphidler olmak üzere birçok ser'a zararlılarının mücadelesinde geniş çapta kullanılmaktadır (Miller et al., 1983).

Fungusların insektisit olarak kullanılmalarında en büyük engel depolamaya elverişli olmamaları ve etkinliklerini göstermede iklim koşullarına çok fazla

bağlı kalmalarıdır. Bu nedenle ticari formülasyonlar oda sıcaklığında yeterince depo edilememekte; ya imalattan sonra hemen sevk edilmeleri veya donma düzeyinde depolanmaları gerekmektedir (Hall and Papierok, 1982). Bu da imalatçı, taşıyıcı ve kullanıcılar için stratejik ve ekonomik yük getirmektedir. Diğer taraftan, bu insektisitlerin etkinliği sporların çimlenmelerine bağlıdır. Bu da optimum sıcaklık ve rutubette (en az % 80) olmaktadır. Bu koşullar ise ancak bazı tropikal bölgelerde ve seralarda sağlanabilmektedir (Hall and Papierok, 1982; Miller et al., 1983). Narenciye kırmızı örümceğine karşı kullanılmakta olan *Hirsutella thompsonii*'nin bu yüzden piyasadan çekildiği bildirilmektedir (Kirschbaum, 1985). Kirschbaum, conidia sporlarının açılmaları veya spor çimlenmesinin ihtiyaç duyduğu rutubet ve sıcaklığın sağlanması yanında, depolama problemlerinin de halledildikten sonra moleküler seviyede genetik çalışmaların başlatılmasının gerektiğini belirtmektedir.

## Özet

Böceklerle mücadelede II. Dünya Savaşı'ndan itibaren giderek artan oranda kullanılan kimyasalların olumsuz etkilerinin belirgin bir şekilde ortaya çıkmasından sonra, kimyasal savaş dışındaki mücadele yöntemleri geliştirilmeye çalışılırken, özellikle son 10 yıldan bu yana böceklerde hastalık yapan bazı bakteri, fungus ve virüsler insektisit olarak kullanılmaya başlamıştır. Bunların çok büyük avantajlarına karşın, etki alanlarının sınırlı olmaları, üretimlerinin zor oluşu ve daha başka nedenlerle arzu edilen düzeyde üretilip yaygın bir şekilde kullanılmamaktadırlar. Ancak son yıllarda genetik mühendisliğinin birçok biyolojik alanlara girmesinden sonra, bu sahada da yararlanılmağa başlanmış, böylece biyolojik insektisitlerin kullanım alanları ve olanaklarının artırılması çalışmalarına girişilmiştir.

## Literatür

- Abelson, P. H., 1983. Biotechnology : An overview. *Science*, 219 : 611-613.
- Burges, H. D., 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology*, 84 : 79-117.
- Hall, R. A., B. Papierok, 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, 84 : 25-240.
- Kaiser, E. T., F. J. Kezdy, 1984. Amphiphilic secondary structure : design of peptide hormones. *Nature*, 223 : 249-255.

- Kirschbaum, J.B., 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Ann. Rev. Entomol.*, 30 : 51-70.
- Kronstad, J.W., H.E. Schnepf, H.R. Whiteley, 1983. Diversity of location for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.*, 154 : 419-428.
- Miller, L.K., A.J. Lingg, L.A. Bulla., 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science*, 219 : 715-721.
- Nathans, D., 1979. Restriction endonucleases, Simian virus 40, and the new genetics. *Science*, 206 : 903-909.
- Payne, C.C., 1982. Insect viruses as control agent. *Parasitology*, 84 : 35-77.
- Smith, G.E., M.J. Fraser, M.D. Summers 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome : Deletion mutants within the polyhedrin gene. *J. Virol.*, 46 : 584-593.
- Vlak, J.M., G.E. Smith, 1982. Orientation of the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, 41 : 1118-1121.
- Wong, H.C., H.E. Schnepf, H.R. Whiteley, 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.*, 258 : 1960-1967.