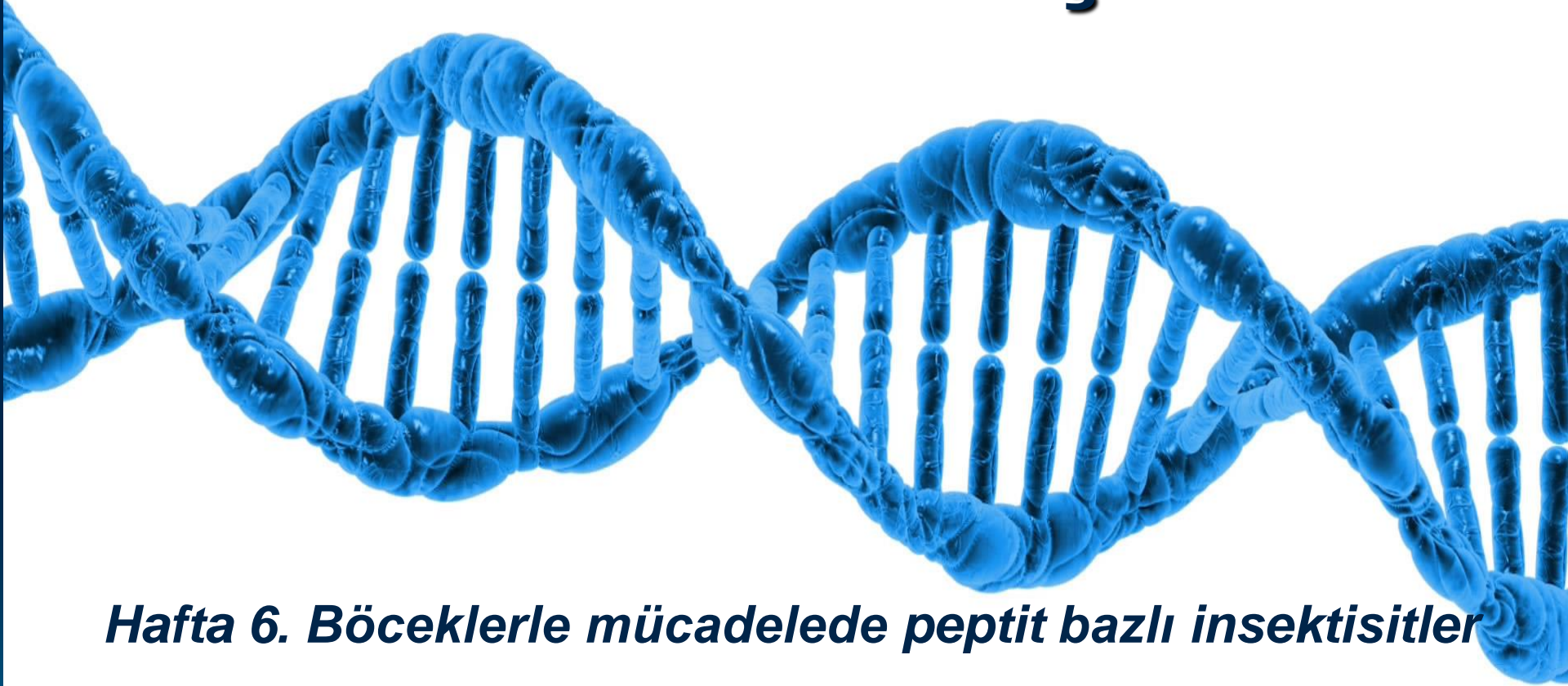


ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



Hafta 6. Böceklerle mücadelede peptit bazlı insektisitler

Umut Toprak, Ph.D

Peptit/Protein Nedir?

Peptitler amino asitlerin birbirine bağlanmasıyla oluşan kısa polimerlerdir. Temel fark peptitlerin kısa, proteinlerin ise uzun olmasıdır.

Bütün canlılar gibi böcekler ya da böceklerin düşmanı olan akrep, örümcek ve çıyanlar da pek çok peptit ve protein üretmektedir. Canlıların sinir sistemleri tarafından üretilen ve nöropeptitler olarak adlandırılan peptitler nörofizyolojik ve biyokimyasal iç mekanizmaların yürütülmesi adına hayati önem taşırken, canlıların zehir salgı bezlerinden üretilip dışarı salgıladıkları venom peptitleri de savunma ve düşmanı paralyze etme gibi görevlere sahiptir. İşte bu peptitlerin yapay koşullarda üretilmesiyle böceklere uygulanarak fizyolojilerinin bozulması ve ilgili biyokimyasal reaksiyonların sekteye uğratılması ve nihai olarak ölüm oluşturulması “Peptit bazlı insektisitlerin” bitki koruma terminolojisine girişinin önünü açmıştır.

Peptit Bazlı Insektisitler

1. *Bacillus thuringiensis* kökenli toksin insektisitler
2. Örümcek & akrep kökenli toksin insektisitler
3. Viral genom kökenli peptit insektisitler & Rekombinant Bakulovirüsler
4. Bakteriyel kökenli enzim türevi insektisitler

1. *Bacillus thuringiensis* kökenli toksin insektisitler

- *Bacillus thuringiensis* (Bt), gram+, aerob, spor oluşturan ve kristal yapıda parasporal (spordan farklı olarak hücre içinde aynı anda oluşur) bir kısım üreten bir bakteridir.
- Çoğunlukla Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera takımlarında pek çok ölü veya kurumuş böcekten izole edilerek uzun yıllardan beri biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır.
- Bt ırkları tarafından üretilen protein toksinleri biyoinspektisit olarak Bt'nin yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.
- Tarımda Bt toksinlerinin önemi, zararlı böceklerle savaşmada kültür bitkileri içerisine Bt toksin genlerinin yerleştirilmesine izin veren rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ile daha da önem kazanmıştır.

Bacillus thuringiensis

- *B. thuringiensis* sporulasyon sırasında sporun yanı sıra kristal yapıda birçok toksin üretebilmektedir. Bunlar α , β , γ exotoksin, VIP toksinleri, ve delta endotoksin olarak bilinmektedir.
- α , γ exotoksinler çok önemli proteinler olmamakla birlikte β exotoksinleri (thuringiensin) bazı Bt ırkları tarafından üreme sırasında oluşturulur. Bu toksinin (β) memelilere zehirliliği oldukça yüksektir (LD50=10 mg/kg). Avrupa'da ve USA'da ticari olarak üretilen Bt'nin bunlardan biri olması istenmekte ve ruhsatlandırma aşamasında üzerinde önemle durulmaktadır.
- Şu an ticarileştirilen toksinleri delta endotoksinler oluşturmaktadır.
- Delta endotoksin bakteri sporulasyonu sırasında kristal olarak depo edilir ve tüm *B. thuringiensis* ırklarında görülür ancak insektisit özellikleri farklılık gösterir.
- Kimyasal açıdan bakıldığında endotoksinler yüksek moleküllü proteinlerdir.
- Bu proteinler kristalin "cry" takısını başa alarak sayı ve harfle isimlendirilirler Endotoksinin yapısı konukçu spektrumunu belirler.

Tarihçesi

- Japon bakteriyologlar 1901 yılında hastalıklı ipek böceği (*Bombyx mori* L.) larvalarından spor oluşturan bir bakteri izole ederek bunun “satta” hastalığının nedeni olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu bakteri türünün *Bacillus satta* olarak tanımı yine japon bilim adamlarınca yapılmıştır.
- Alman biyolog Ernst Berliner, un güvesi (*Ephestia kuehniella* Zell.) larvasından bir patojen izole ederek bunu *B.thuringiensis* olarak tanımlamıştır. Daha sonraki yıllarda *B.thuringiensis* ile *B.satta*’nın aynı tür olduğu anlaşılmıştır.
- 1930 yılında, *B.thuringiensis* tarımda ilk defa Mısır koçan kurdu mücadelesinde Macaristan’da kullanılmıştır. Daha başarılı sonuçlar ise II. Dünya savaşından sonra USA ve Avrupa’da lahanada *Pieris* türlerinin mücadelesinden alınmıştır.
- Bu alandaki en büyük gelişme ise 1970 yılında Howard Dulmage’nin *B.t var kurstaki*’nin virulent HD-1 irkının keşfedilmesiyle yaşanmıştır.
- 1976 yılında Sivrisinek ve 1983 yılında Coleopterlere etkili *B.thuringiensis* irklarının bulunması ile yeni bir dönem açılmıştır.
- Tüm biyolojik preparatlar içerisinde *B. thuringiensis* delta endotoksin en fazla satılan grubu oluşturmaktadır.

Bt ırklarının sahip oldukları endotoksin türleri ve konukçu spektrumları:

Endotoksin	Konukçu
Cry I	Lepidoptera
Cry II	Lepidoptera ve Diptera
Cry III	Coleoptera
Cry IV	Diptera

Alt bölümler CryI: CryIA, CryIB, CryIC

CryIA: CryIA(a), CryIB(b), CryIA(c) gibi

A,B,C protein yapılarında önemli farklılıkları;

a,b,c ise yapıdaki küçük farklılıkları göstermek için kullanılır.

Bt Konukçu İlişkisi

Etki spektrumu;

- Endotoksin tipine göre belirlenir
- Çoğu zaman ergin ve yumurtaya etkisi yoktur.
- Kontakt ve buhar etkisi yoktur.
- İnsan, faydalı organizmalar, suda yaşayan organizma, balık ve kuşlara olumsuz etkisi yoktur.
- 1-4 günde kristal toksin çevrede bozular.
- Özellikle dayanıklılık probleminin görüldüğü yerlerde ve ilaç kullanımının azaltılması için uygundur.
- Toksikolojik test masrafları düşüktür ve 1 yıl içinde tamamlanır.

Etki Şekli:

- Bt mide zehiridir ve etkili olabilmesi için ağız yoluyla alınması gerekir.
- Çevre koşulları larvanın beslenmesini teşvik edecek şekilde uygun olmalıdır.
- Tüm generasyonların iç içe girdiği durumlarda zararlı böceğin popülasyonunu baskı altına almak zordur.
- Bt'nin insektisit etkisi delta endotoksinden kaynaklanmaktadır. Bu kristaller suda çözünmezler; alkali ortamlarda ve belirli enzimlere karşı stabiliteyi kaybederler, böceğin bitki ile beslenmesi sonucunda alınır ve orta bağırsağa geçerek biyolojik aktivite gösterirler.
- Başlangıçta kristaller alkali yapıda olan midede çözünürler ve midedeki epitel hücreler tarafından salgılanan proteazlar tarafından toksin aktive edilir, mide duvarına doğru hareket ederek epitel hücre çeperindeki reseptörlere bağlanırlar. Epitel hücreleri toksin tarafından zarar görerek şişer, yarılr ve böylece delikler oluşarak osmotik denge bozulur. Sonuçta mide duvarı tamamen fonksiyonunu kaybeder. Farklı Bt toksinleri mide çeperindeki epitel hücrelerindeki farklı proteinleri bağlama durumundadır. Bu durum bize kısmende olsa Bt nin ne kadar konukçuya özelleştiğini göstermektedir.
- Bu işlemler sırasında midede bakteri sporları çimlenmeye başlar ve hem bakteri sporları hem de mide sıvısı vücut boşluğuna geçerek septisemiye (kan zehirlenmesine) neden olur.
- Bütün bu moleküler ve mikroskopik düzeyde olaylar gelişirken böcekte dışarıdan da gözlenebilen değişiklikler olmaktadır.
- Alınan doza bağlı olarak birkaç dakikadan birkaç saate kadarlık bir süre içerisinde larva beslenmeden kesilir, sindirim sisteminin paralize olmasına rağmen, larvanın açlıktan veya kan zehirlenmesinden ölümü 3-5 gün içerisinde olur, bu süre böcek türüne ve larva dönemine göre değişir.

Bt ve Direnç?

- Böceklerdeki reseptör proteinleri ile Bt toksinleri arasındaki bağlanma kabiliyetinin değişmesi Bt direncinin temel mekanizması olarak düşünülmektedir.
- Bt'ye böceklerde oluşan direncin en genel mekanizması larva orta barsağının rebellumlarında bulunan hedef bölgelere (reseptör proteinlere) toksinlerin bağlanma miktarlarında meydana gelen azalmalardır.
- Pek çok böcek popülasyonunda farklı düzeylerde Bt direnci olduğu laboratuvar çalışmaları ile belirlenmiştir.

Bt direncinin görüldüğü başlıca türler;

Plodia interpunctella (Lep: Pyralidae),

Ephestia cautella (Lep: Pyralidae),

Leptinotarsa decemlineata (Col: Chrysomelidae),

Chrysomela scripta (Col: Chrysomelidae),

Trichoplusia ni (Lep: Noctuidae),

Spodoptera littoralis (Lep: Noctuidae),

S. exigua (Lep: Noctuidae),

Heliothis virescens (Lep: Noctuidae),

Ostrinia nubilalis (Lep: Pyralidae)

Culex quinquefasciatus (Dip: Culicidae)'dir.

Etkinliği

Bt nin aktivitesini ve tesirliğini ölçmek için 4 farklı yaklaşım vardır.

- 1. CFU (Koloni Forming Unit):** Bu yöntem endotoksinlerin durumuna bakılmaksızın canlı sporların sayımına dayanır. Bu yöntemdeki mantık bir spor her zaman bir protein kristali içerir. Bu metod 1960'lı yıllarda kullanılmıştır. Üretimin kalitesini ölçmesi açısından metod fazla güvenilir değildir.
- 2. IU (International Unit):** Spor-kristal kompleksinin insektisit etkisi standart bioassayla saptanır. Örneđin etkinliği bilinen standart örnekle karşılaştırılarak aşağıdaki formülle belirlenir.

$$\text{IU/mg örnek} = \text{LC}_{50} \text{ standart} / \text{LC}_{50} \text{ Örnek} \times \text{IU/mg standart}$$

- Bt kurstaki* (kullanılan Uluslararası standart ırkı HD1-S-1980 olup) nin etkinliği 16.000 IU/mg olarak tarafsız kuruluşlarca belirlenmiş ve tüm dünyanın kabul ettiği bir değerdir.
- Bt kurstaki* de IU biossayi için *Trichoplusia ni* nin 3. dönem larvaları kullanılmaktadır.
- Bt israelensis* bioassaylerinde *Aedes aegypti*,
- Bt tenebrionis*'de ise *Leptinotarsa decemlineata* kullanılır.

- 3. Toksin içeriği (%w/w):** Delta-endotoksinlerin analitik yolla tesbiti için uluslararası bir standart mevcut değildir. Bu nedenle sonuçlar kullanılan yöntemle göre farklılık gösterebilmektedir.

- 4. IEC (Ion Exchange Chromatography):** Bu yöntem farklı endotoksinleri birbirinden ayırmaz, toplam endotoksini verir. Burada standart olarak kullanılan madde ise saflaştırılmış parasporal kristaldir.

Biyoteknolojik Olarak Bt Üretimi

Obligat parazit olmadıklarından dolayı suni ortamda yetiştirilebilirler, üretilebilirler.

Ticari üretim 5 farklı aşamada gerçekleşir;

1. Başlangıç Kültürü: Soya, balık proteini, nişasta, maya ekstratı ve iz elementler kullanılarak hazırlanan ortamda bakteri sporlarının çimlenmesi ve optimum hücre büyümesi sağlanır.

2. Hücre büyümesi: Hücre çoğalmasının olması için buradaki fermentasyon koşullarının daha önceki ortama yakın olması gerekir. En yüksek hücre yoğunluğunun elde edildiği prefermenterden, hücrelerin hepsi inokulum kaynağı olarak fermentere aktarılır.

3. Üretim: Sporulasyon ve endotoksin sentezi 30.000-100.000 litrelik fermenterlerde gerçekleştirilir. Sterilizasyon, sıcaklık, oksijen temini ve çalkalama koşulları fermenterde çok iyi kontrol edilmelidir. Fermantasyonun sonuna doğru mevcut besin ortamı bittiğinde, hücre büyümesi durur. Bakteri hücresi içerisinde spor+kristal oluşur. Yaşlı hücre parçalanarak spor ve kristali serbest bırakır. Verim 10⁸-10¹⁰ spor/ml fermantasyon sıvısı düzeyindedir.

4. Hasat: Fermantasyon sıvısı konsantre hale getirilir (santrifüjle) ve saklanır (kuru hava). Fermantasyon çözültüsü Bt sporu, protein kristali, hücre parçacıkları ve çözülmeyen ortam kalıntılarını içerir. Santrifuj edilerek bu parçacıklar yoğunlaştırılır ve çözültü sıcak havayla temas edilerek aktif madde (toksin) elde edilir. Üst kısmı ise atılır.

5. Formülasyon ve Paketleme: İnert maddeler ilave edilerek öğütülür ve ıslanabilir toz formülasyonu (WP) elde edilir. Alternatif olarak çözültü sulu akıcı formülasyon şeklinde de olabilir.

2. Örümcek & akrep kökenli toksin insektisitler

- Hedeflenen Böceklerle ilişki içerisinde olan çıyan, akrep, örümcek ya da diğer parazitoid böcekler gibi çeşitli canlılardan elde edilen spesifik nöroksinlerin böcek öldürücü etkisi dikkate alınarak saflaştırılmaları ya da kitle üretimine olanak verecek şekilde rekombinant olarak üretilmelerine dayalı toksinlerdir.
- Bu nörotoksinler temelde sinir ve kas sistemini hedeflemekte ve çoğunlukla tek başlarına oral olarak aktif olmayıp çeşitli diğer taşıyıcı moleküller ile birlikte hedef sisteme taşınabilmektedir.
- En fazla dikkati çeken nörotoksinler örümceklerden izole edilmiş olup yaklaşık 10 milyon biyoaktif örümcek toksini olduğu bunların da yaklaşık 0.5-1.5 milyonunun böcekler üzerinde etkiye sahip olduğu tahmin edilmektedir.
- Bazı nörotoksinler için databaseler oluşturulmuştur (Örnek: ArachnoServer 2.0): (www.arachnoserver.org)
- İlk ticari örümcek nörotoksin bazlı insektisit 2019 yılında ABD’de markete sunulmuştur.
- Nörotoksin konsepti böceklerde öldürücü etkinliği olan rekombinant patojen organizma genomlarına eklenerek te kullanılma potansiyeline sahiptir (Bakınız akrep toksini kodlayan rekombinant bakulovirüsler)

3. Entomopatojen kökenli peptit insektisitler

Baculovirüsler?

- Günümüze kadar hiçbir baculovirüs arthropod olmayan bir konukçudan izole edilmemiştir. Bunlar Crustacea ve akarlardan da izole edilmelerine rağmen genellikle böceklerden izole edilmiştir. Bu özellik ise, baculovirüslerin insan ve çevre için güvenilir olmasının dolaylı bir kanıtı olarak düşünülebilir.
- Baculovirüsler, çubuk şeklinde capsid'leri içeren çift iplikli dairesel DNA yapısındadırlar. Genellikle konukçu hücrelerin çekirdeğinde oluşurlar. Baculovirüsün virionları protein benzeri partiküller içinde bulunur böylece genellikle çok yüzeyli polyhedral oluşumlar meydana getirirler. Protein tabakası çevredeki fiziksel ve kimyasal olumsuz koşullara karşı koruma sağlar konukçu hücrenin dışında da yaşamını sürdürmesini temin eder. Bu durum "occlusion body" olarak da isimlendirilmektedir. Bu oluşum virus partiküllerinin biyoinspektisit olarak kullanılması için büyük bir avantaj sağlamaktadır.
- Baculovirüsler böceğin sindirim sisteminden enfeksiyon başlatıp diğer doku ve organları istila ederek böceğin ölümüne neden olur.
- Baculovirüsler ile hastalanmış böcekler başlangıçta beyaz ve sonradan koyu renk alır. Bazı türler bitkilerin en üst kısımlarına tırmanır, burada kalır ve kendini yaprak ve dala asılı bırakır ve bu duruma lepidopter solgunluğu adı verilir.
- Virus enfeksiyonu genellikle 3-8 gün sonra ölümle sonuçlanır.

Böceklerde ülser hastalığı?

İNSAN

BÖCEK

Organizma:

Helicobacter

?



Kodlanan:

Metalloproteaz

?

Hedef Yeri:

*İnsan midesindeki
mukozal tabakayı
oluşturan musin proteinleri*

*Böcek midesindeki
peritrofik matriksini
oluşturan musin proteinleri*

Musin proteinini parçalayan metalloproteaz aranıyor!

MTDLTIPIPVLDAPSYINSGNLYYALHHYKEPIPFVIKAGSVVTLSTNHQCTILVYNNRNLTEETIENMTGETTLNIEVD
SVVFNMMIVSNPDDKYRVTYSIDGEYEPLTRIDMGNNEYSEGVNENLSYVFEKGWIQLLVLPQIDLKHLNGMIANDKDL
DELNDYSSIIIEFYNELTDNFVRKYFAKADNNGAGGGYYGKYTMGESNPSMRRFYLTSPKFNWGCLHEIAHSFDAYFTW
NYAHADIREVWTNIMP~~DD~~YYQYLNFTTEEEYLTKSWKLDGQRDTLFMEIKALFGVVPFNEWYLRDRLVFLTSLFFKFGHKKL
LTALFTEMRQQLTNGTFDSCSFKTMELIMTIFDRNNMDIVHINRLVGINELDPLVTLNIKYNMQNSVFVDFMIKPNVVN
FELIDSDLGIQRNVELTFKNANPTDLIGAHYSLVKNKHTLESTFTNTTSQFTTNVSLGAYKFFVYVTGNSTRYYCDADY
VVFGETEPHTALTITPLLKPVLYNEIFNIRGLGDHLVAVLKINYQDEYVYFYPI SNNPHVYFPNNVYYSINIKNHKFFEY
FGRDNEIDILEYKFPVLYGQEIIVLYHREIGRLISSFHTTNPNTFTITRMGVRQNNTNQSTRIVEKILQFCLFVTERYPN
LIASPYVQNEVYLSTYYLLPQDQNNLIPQILDPLPDTQVTSITLMGTDYTNLVRINEKEGVLQLRTFDNSAPGVEIMVNL
VRDQEPINLLIHADTVVKESEYLVALKYNDVLQIVMNNIANTRFIVINGLLEQSNDDTVFYRWINGTFDKISDKSSND
LGPLLWAMGILFFIVIVLLIIIIKIASP SKKQVITKEKPKPKVIKSIK

Enhancin

AcMNPV

Enhancini Yok!

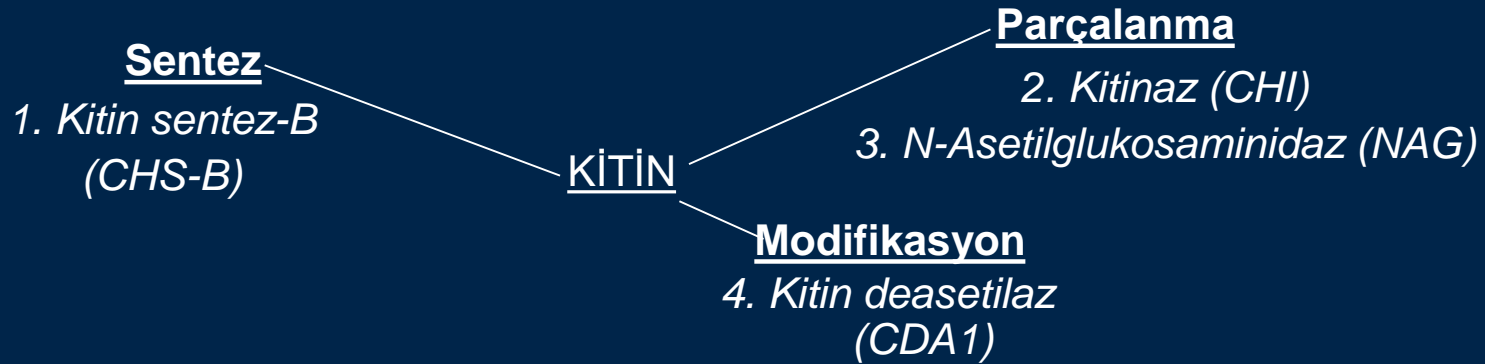
MacoNPV-A

Enhancini Var!

AcMNPV-Maco enh

Enhancini AcMNPV genomuna ekledik!

Kitin deasetilasyonu ve Viral Etkinlik



Kitindeasetilaz aktivitesinin gösterimi

4. Bakteriyeel kökenli enzim türevi insektisitler

- Böceklerin temel yapıtaşını kitin ve çeşitli proteinler oluşturur.
- Pek çok mikroorganizma kitini ve proteinleri parçalayan kitinaz, N-Asetilglukosaminidaz ve proteazlar üretmektedir.
- Bu enzimlerin böcekler üzerinde gelişimi bozucu, durdurucu veya ölüme yol açabilen etkileri olduğu ispatlanmıştır.
- Bu enzimlerin konvansiyonel metotlar ya da klonlanarak rekombinant üretim teknikleri ile üretilmesi mümkündür.
- Enzimlerin basitçe formülasyonu ile biyopestisit olarak kullanılma potansiyelleri yüksek olarak değerlendirilmekte ancak maliyetin minimize edilebilmesi için ekonomik üretim tekniklerine ihtiyaç bulunmaktadır.