

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2021-YL-000

Xenorhabdus szentirmaii ve *X. nematophila*
BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN
AKARİSİDAL MADDENİN TANIMLANMASI VE
Tetranychus urticae, *Phytoseiulus persimilis* ve
Neoseiulus californicus ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Gamze İNCEDAYI

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gamze İncedayı tarafından hazırlanan “*Xenorhabdus szentirmaii* ve *X. nematophila* Bakterileri Tarafından Üretilen Akarisidal Maddelerin Tanımlanması ve *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus persimilis* ve *Neoseiulus californicus* Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı tez, 23.02.2021 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan:	Prof.Dr.İbrahim ÇAKMAK	Aydın Adnan Menderes Üniv.	
Üye:	Prof.Dr. Selçuk HAZIR	Aydın Adnan Menderes Üniv.	
Üye:	Prof. Dr. İsmail KASAP	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü



T.C.

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

23/02/2021

Gamze İNCEDAYI



ÖZET

***Xenorhabdus szentirmaii* VE *X. nematophila* BAKTERİLERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN AKARİSİDAL MADDENİN TANIMLANMASI VE *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus persimilis* VE *Neoseiulus californicus* ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gamze İNCEDAYI

Yüksek Lisans Tezi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. İbrahim ÇAKMAK

2021, 45 sayfa

Bu çalışmada *Xenorhabdus szentirmaii* ve *X. nematophila* bakterileri tarafından üretildiği bilinen biyoaktif akarısidal maddenin tanımlanması ve *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus persimilis* ve *Neoseiulus californicus* araştırılmıştır. *Xenorhabdus nematophila*'nın mutant suşları ile yapılan deneyler, PKS ve NRPS sistemleriyle sentezlenen Xenocoumacin maddesinin biyoaktif akarisit bileşik olduğunu göstermiştir. Akarısidal aktivitenin görüldüğü pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşa ait süpernatant ile yapılan uygulamadan 7 gün sonra akarların ölüm oranı %100 olmuştur. Aynı süpernatant, avcı akarlar *P. persimilis* ve *N. californicus* üzerinde 7. gününün sonunda %36'dan daha az ölüm meydana getirmiştir. Öte yandan, *X. szentirmaii*'nin 15 mutant suşu ve 13 HPLC-MS fraksiyonu ile yürütülen çalışmalarda, %50'den daha az akarısidal aktivite saptanmıştır. Bu nedenle *X. szentirmaii* türünde akarısidal aktiviteden sorumlu madde tespit edilememiştir. Xenocoumacin XAD resin ekstraktının 2, 5 ve 7 gün sonunda LC₅₀ değerleri sırasıyla 0,060, 0,026, 0,021 mg/ml ve LC₉₀ değerleri 0,301, 0,071, 0,055 mg/ml olarak hesaplanmıştır. MRC-5 insan akciğer fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmaları Xenocoumacin ekstraktına ait IC₅₀ değerinin 17.71 µg/ml olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler *X. nematophila* bakterilerince üretilen Xenocoumacin maddesinin potansiyel olarak *T. urticae*'nin mücadelesinde biyo-akarisit olarak kullanılabileceğini, ancak Xenocoumacin'in tarla denemelerindeki etkinliği ve bitkiler üzerindeki fitotoksitesinin ileriki çalışmalarda belirlenmesinde fayda olacağını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akarısidal bileşik, *Tetranychus urticae*, *Xenorhabdus*, biyolojik mücadele, avcı akar

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ACARICIDAL COMPOUND PRODUCED BY *Xenorhabdus szentirmaii* AND *X. nematophila* BACTERIA AND THEIR EFFECT ON *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus persimilis* AND *Neoseiulus californicus*

Gamze İNCEDAYI

M. Sc.Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK

2021, 45 pages

In this study, the identification of bioactive acaricidal substance known to be produced by *Xenorhabdus szentirmaii* and *X. nematophila* bacteria and their effects on *Tetranychus urticae*, *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* were investigated. Experiments with mutant strains of *X. nematophila* showed that Xenocoumacin synthesized by PKS and NRPS enzyme systems was the bioactive acaricidal compound. The mortality rate of the supernatant of pCEP_kan_XNC1_1711 mutant strain showing acaricidal activity was 100% on *T. urticae* at 7 days after the application (dpa). The same supernatant caused less than 36% mortality on the predatory mites, *P. persimilis* and *N. californicus*, at 7 dpa. On the other hand, 15 mutant strains and 13 HPLC-MS fractions of *X. szentirmaii* exhibited less than 50% acaricidal activity. Therefore, the substance responsible for acaricidal activity in *X. szentirmaii* could not be identified. The LC₅₀ and LC₉₀ values of Xenocoumacin XAD resin extract for 2, 5 and 7 dpa were calculated as 0.060, 0.026, 0.021 and 0.301, 0.071, 0.055 mg/ml, respectively. Cytotoxicity studies performed on MRC-5 human lung fibroblast cell line showed that IC₅₀ value of Xenocoumacin extract was 17.71 µg/ml. The data of this study showed that Xenocoumacin could potentially be used as bio-acaricide in the control of *T. urticae*, however, the efficacy of Xenocoumacin in the field experiment and its phytotoxicity need to be assessed in future.

Key Words: Acaricidal compound, *Tetranychus urticae*, *Xenorhabdus*, biological control, predatory mites.

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, tüm bilgi ve tecrübe birikimlerini paylaşan ve tez aşamam boyunca sabırla yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. İbrahim ÇAKMAK' a,

Bakteri süpernatantlarının elde edilmesi için tüm imkanlarıyla laboratuvarlarını çalışmalarına açan, bilgi ve deneyimleriyle her türlü yardım ve desteğini sağlayan Değerli hocam Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a,

Çalışmalarında kullandığım bakteri süpernatantlarını elde ederek benden yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen Arş. Gör. Dr. Derya ULUĞ ve Dr. Harun ÇİMEN'e,

Xenorhabdus szentirmaii ve *X. nematophila* türlerinde akarisidal etki gösteren biyoaktif maddenin belirlenmesi için ΔHfq , $\Delta Pptase$ ve promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşları oluşturarak tarafımıza gönderen Prof. Dr. Helge B. BODE ve ekibine,

Akarisidal madde ile ilgili sitotoksisite çalışmalarını yürüten Öğr. Gör. Dr. Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL'e,

Tez çalışmam boyunca yardımlarıyla bana destek olan değerli arkadaşım Durmuş ÖNER'e, manevi destekleri için değerli arkadaşlarım Mehmet KAYA, Gülten ÖZŞİRVAN, Bilge ÇOŞKUN, Canan ERDEM, Özlem YETİŞ'e,

Tez projesini ve beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK (1170172)'a,

Maddi ve manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen ve sabır gösteren, her zaman aldığım kararlarda yanımda duran ve beni destekleyen aileme, teşekkürü bir borç bilirim.

Gamze İNCEDAYI

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	2
BİLİMSEL ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI	4
ÖZET.....	2
ABSTRACT.....	4
ÖNSÖZ	6
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	10
ÇİZELGELER DİZİNİ	12
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	8
3.1. Bitki Üretimi	8
3.2. Akarların Üretimi	8
3.2.1. <i>Tetranychus urticae</i> Üretimi	8
3.2.2. Avcı Akar Üretimi.....	9
3.3. Akarisidal Biyoaktif Maddenin Tanımlanması	10
3.4. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun <i>Tetranychus urticae</i> 'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkisi	17
3.4.1. Petri Denemeleri.....	17
3.4.2. Saksı Denemeleri.....	18
3.5. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun Avcı Akarlar Üzerindeki Toksisitesi	20
3.6. Biyoaktif Akarisidal Madde Ekstraktının <i>Tetranychus urticae</i> 'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkileri.....	21
3.7. Sitotoksisite Deneyleri	22
3.8. İstatiksel Analizler.....	23
4. BULGULAR.....	24

4.1. Akarisidal Biyoaktif Maddenin Tanımlanması	24
4.2. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun <i>Tetranychus urticae</i> 'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkisi.....	28
4.2.1. Petri Denemeleri.....	28
4.2.2. Saksı Denemeleri.....	29
4.3. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun Avcı Akarlar Üzerindeki Toksisitesi.....	30
4.4. Xenocoumacin ekstraktının <i>Tetranychus urticae</i> 'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkileri	31
4.5. Sitotoksisite Deneylei.....	33
5 . TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kırmızı örümcek erginleri.....	1
Şekil 1.2. Kırmızı örümceklerin yaprakta meydana getirdiği zarar	2
Şekil 1.3. Kırmızı örümceklerin bitkide meydana getirdiği ağ tabakası	2
Şekil 3.1. İklim odasında yetiştirilen fasulye bitkileri.....	8
Şekil 3.2. <i>Tetranychus urticae</i> ile bulaştırılmış fasulye bitkileri.....	9
Şekil 3.3. Avcı akarların kitle üretimi	10
Şekil 3.4. Prof. Dr. Selçuk Hazır Goethe Üniversitesi'nde Prof. Dr. Helge Bode ile HPLC-MS fraksiyonları elde etmek için çalışırken	11
Şekil 3.5. Hfq-RNA kompleks oluşumu ve Hfq bağlanma yüzleri. (A) Hfq, sRNA'ları ve mRNA'ları benzer afinite ile bağlar. Hfq üçlü kompleksi oluşturmadan önce mRNA veya sRNA'yı önce bağlayabilir. (B) Hfq-AU ₅ G (PDB ID: 1KQ1) ve Hfq-polyA (PDB ID: 1HK9) kristal yapıları üst üste bindirilmiştir. AU ₅ G proksimal yüzü bağlar ve polyA, homoheksamerin distalini bağlar (Bode vd., 2015).....	12
Şekil 3.6. Bir PPTase ile post-translasyonel fosfopantatenilazasyonun genel reaksiyon şeması. PPTase burada, tipik bir NRPS modülü tarafından sergilenen <i>holo</i> -taşıyıcı proteini (CP) üretmek için, PPant parçasını Coenzim A'dan <i>apo</i> -CP üzerindeki korunmuş serine aktarır. C, yoğunlaşma; A, adenilasyon; CP, taşıyıcı protein domainleri; 3', 5'-PAP, 3',5'- fosfoadonezin fosfat (Bode vd., 2015)	13
Şekil 3.7. Promotor Değiştirme Yöntemi. Doğal promotorunun değiştirilmesi istenen gen bölgesinin ilk 300-600 baz çiftlik bölgesi PCR ile çoğaltılır ve pCEP plazmitine klonlanır. Hedeflenen gen bölgesini taşıyan plazmit <i>E. coli</i> S17-1 λpir bakterisine elektroporasyon işlemi ile aktarılır. Plazmiti doğru bir şekilde aldığı saptanan <i>E. coli</i> bakterileri taşıdıkları plazmitleri konjugasyon aracılığıyla hedef geni taşıyan ve promotor değişikliği yapılmak istenen bakteriye aktarır. Promotor değişikliği gerçekleşen bakteriler pCEP plazmitinin taşıdığı kanamisin antibiyotik direnç geni sayesinde seçici besi ortamı kullanılarak kolaylıkla saptanır. Promotor değişikliği sonucunda doğal promotor (gri ok) yerine indüklenebilir promotor (siyah ok) yerleştirilmiş olur. Yeni promotor sıkı bir	

şekilde kontrol edilebilir ve indükleyici (arabinoz) olmadan aktivite göstermez. Buna bağlı olarak hedef gen bölgesi eksprese olmaz ve ilgili metabolit üretilmez. İndükleyici varlığında ise istenen gen normalden fazla eksprese olur ve ilgili metabolit yabancı tipe göre daha fazla üretilir (Bode vd., 2015).	14
Şekil 3.8. Çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanmış petrilere	16
Şekil 3.9. Kültürden petrilere kırmızı örümceklerin aktarılması	17
Şekil 3.10. Denemelerde kullanılan saksılar	18
Şekil 3.11. Kırmızı örümceklerin saksılardaki fasulye yapraklarına transferi	19
Şekil 3.12. Bakteri süpernatantı püskürtülen yapraklar	19
Şekil 3.13. Avcı akarların ergin dişi dönemi için hazırlanan petrilere	20
Şekil 3.14. <i>Tetranychus urticae</i> 'nin farklı biyolojik dönemlerinin firçalandığı avcı akar petrilere	21
Şekil 4.1. <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> HPLC-MS fraksiyonlarının <i>Tetranychus urticae</i> 'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri	28
Şekil 4.2. Petri denemelerinde <i>Xenorhabdus nematophila</i> (pCEP_kan_XNC1_1711) mutansusunun ürettiği sekonder metabolit Xenocoumacin'in <i>Tetranychus urticae</i> 'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri A) Uygulamadan 2 gün sonra, B) Uygulamadan 5 gün sonra, C) Uygulamadan 7 gün sonra	29
Şekil 4.3. Saksı denemelerinde <i>Xenorhabdus nematophila</i> (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant susunun ürettiği Xenocoumacin'in <i>Tetranychus urticae</i> 'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri	30
Şekil 4.4. <i>Xenorhabdus nematophila</i> (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant susunun ürettiği Xenocoumacin'in avcı akarlar <i>Phytoseiulus persimilis</i> ve <i>Neoseiulus californicus</i> 'un ergin dişileri üzerindeki toksisitesi A) Uygulamadan 2 gün sonra, B) Uygulamadan 5 gün sonra, C) Uygulamadan 7 gün sonra	31
Şekil 4.5. Xenocoumacin'in <i>Tetranychus urticae</i> 'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Xenorhabdus nematophila</i> 'nın promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşları ve kontrol ettikleri sekonder metabolitler	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> 'nin promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşları ve kontrol ettikleri sekonder metabolitler	15
Çizelge 4.1. <i>Xenorhabdus nematophila</i> 'nın promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarının ürettiği süpernatantların <i>Tetranychus urticae</i> 'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri	25
Çizelge 4.2. <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> 'nin promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarının ürettiği süpernatantların <i>Tetranychus urticae</i> 'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri	26
Çizelge 4.3. Farklı Xenocoumacin dilasyonlarının <i>Tetranychus urticae</i> ergin dişileri üzerindeki etkisi	32
Çizelge 4.4. Farklı Xenocoumacin dilasyonlarının <i>Tetranychus urticae</i> ergin dişileri üzerindeki etkisi	32

1. GİRİŞ

Tetranychus urticae Koch, bitki ile beslenen akarların en önemli ve yaygın zararlı türlerinden biridir. *T. urticae*, çok çeşitli bitki türlerinde (>1100 tür) bitki hücrelerinin içeriğini aspire etmek için sokucu-emici ağız kısımlarını kullanmaktadır (Migeon ve Dorkeld, 2020). Dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde özellikle seralarda, süs bitkilerinde ve mısır, pamuk vb. gibi tarlada yetiştirilen mahsullerde yetiştirilen çeşitli meyve ve sebzelere saldırılmaktadır (Ilias vd., 2014). *T. urticae*, bitkilerin yaprak, meyve ve sapsarı üzerinde emgi yaparak zarar oluşturmaktadır (Şekil 1.1 ve Şekil 1.2).



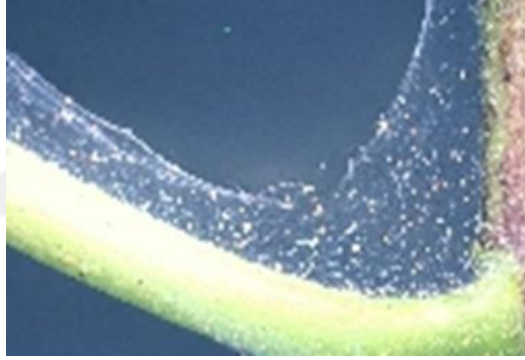
Şekil 1.1. Kırmızı örümcek erginleri

Tetranychus urticae'nin yapraklarda beslenmesi sonucu bitkide klorofil sentezi engellenmekte, klorofil kaybından dolayı sarılık ve nekrotik kahverengi lekeler oluşmaktadır (Kulkarni vd., 2008). Ayrıca akarın yapraklarda beslenmesi ve oluşturduğu ağlar nedeniyle bitki renginde solgunluk oluşmaktadır (Lahai vd., 2003) (Şekil 1.3). Özümlenmenin gerilediği bu yapraklar sararıp kuruyarak zamanından önce dökülmektedir. Kırmızı örümceğin zararının devam etmesi meyve deformasyonuna ve bitki büyümesinin engellenmesine neden olmaktadır (Jeppson vd., 1975).

Ürün veriminde %40-60 oranında azalma ve popülasyonun çok yüksek olduğu durumlarda ise tamamen ürün kaybı meydana gelmektedir (Hussey ve Scopes, 1985; Anonim, 2011).



Şekil 1.2. Kırmızı örümceklerin yaprakta meydana getirdiği zarar



Şekil 1.3. Kırmızı örümceklerin bitkide meydana getirdiği ağ tabakası

Tetranychus urticae'yi kontrol etmek için çeşitli kimyasal ilaçlar kullanılmaktadır ancak *T. urticae*, kısa yaşam döngüsüne ve yüksek üreme gücüne sahip olduğu için çeşitli insektisitlere ve akarisitlere kısa zamanda direnç geliştirmektedir (Cagatay vd., 2018). Bu zararlıya karşı kullanılan pestisitler aynı zamanda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu zararlının kimyasal mücadelesine alternatif olarak biyolojik mücadele çalışmaları birçok ülkede yürütülmüştür ve sonuç olarak avcı akarlar *Phytoseiulus persimilis* ve *Neoseiulus californicus* (Phytoseiidae) en yaygın kullanılan türleridir (Cakmak vd., 2005; 2009). Avcı akarlar dışında patojen olarak bakteri, fungus, virüs, riketsia, protozoa ve nematodların da akarlar üzerinde hastalık oluşturdukları bildirilmektedir (Poinar ve Poinar, 1998). Son zamanlarda, bazı bakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin böcekler ve akarlar üzerinde öldürücü etkiye sahip oldukları bildirilmektedir (Seo vd., 2012; Dhanasekaran ve Thangaraj, 2014). Son araştırmalar, *Xenorhabdus* cinsindeki bazı bakteri türlerinin antibakteriyel, antifungal, nematisidal ve insektisidal özelliklere

sahip sekonder bileşikler ürettiğini bildirmiştir (Bode, 2009; Dreyer vd., 2018). Bu yeni bileşikler, insektisitler ve akarisitler de dahil olmak üzere yeni nesil pestisitlere dönüşme potansiyeline sahiptir.

Xenorhabdus spp. Morganellaceae familyasına (Adeolu vd., 2016) ait hareketli, Gram-negatif bakterilerdir ve Steinernematidae familyasındaki entomopatojen nematodlarla (EPN'ler) simbiyotik ilişkilidir (Forst vd., 1997). Nematod/bakteri kompleksi, bakterilerin bir böcek hemosolünden diğerine infektif juvenil (IJ) evredeki nematodlar tarafından taşındığı karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bakteriyel hücreler, IJ'lerin bağırsağında özel bir kese içinde tutulur. IJ'ler böcek konukçularına ağızdan, anüsten veya spirakıl aracılığıyla girip hemosöle nüfuz ettiklerinde, bakteri hücrelerini hemolinfe salarlar (Hazir vd., 2003). Yüksek derecede virulent olan bu bakteriler ürettikleri insektisidal toksinler ve enzimler sayesinde konukçu böceği 24-48 saat içinde septisemi nedeniyle öldürürler. Ayrıca bakteriler ürettikleri antimikrobiyal sekonder metabolitler ile kadavrayı diğer organizmaların istilasından korurlar (Kaya ve Gaugler, 1993; Reimer vd., 2009; Gualtieri vd., 2009; Houard vd., 2013; Fuchs vd., 2014). Bu *Xenorhabdus* bileşiklerinden bazıları, zararlı ve hastalıkların mücadelesinde potansiyel uygulamalara sahiptir (Bode, 2009; Dreyer vd., 2018).

Daha önce yürütülen çalışmalarda *Xenorhabdus* bakterileri tarafından üretilen sekonder metabolitlerin etkinliği *Luciaphorus perniciosus* (Bussaman vd., 2006, 2012), *Rhizoglyphus robini* (Nermut vd., 2019) ve *T. urticae* (Eroglu vd., 2019, Cevizci vd., 2020) gibi tarımsal açıdan önemli akar türlerine karşı değerlendirmiştir. Ayrıca Cevizci vd.(2020), *T. urticae* ile karşılaştırıldığında, avcı akarlar *N. californicus* ve *P. persimilis*'in yumurta ve hareketli dönemlerinin, *X. nematophila* ve *X. szentirmaii* metabolitlerinden çok daha az etkilendiğini bildirmiştir. Bunun olası nedeni olarak bakteriyel metabolitlerin akarlara giriş yolunun dorsal ve ventralde deri yoluyla olduğunu ve avcı akarların uzun bacaklarıyla akarisle muamele edilmiş yüzeylerle daha az temas etmelerinden dolayı olabileceğini bildirmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalar, bazı *Xenorhabdus*'lardan elde edilen sekonder metabolitlerin akarları öldürmede etkili olduğunu ortaya koysa da hiçbiri akarisit aktiviteden sorumlu biyoaktif maddenin ne olduğunu tanımlamamıştır. Bu nedenle, çalışmamızın bir bölümü bakteriler tarafından üretilen akarisidal maddeyi easyPACId yaklaşımı (kolay destekleyici aktifleştirilmiş bileşik tanımlama)

kullanarak izole etmeyi ve tanımlamayı amaçlamaktadır (Bode vd., 2019). Son yıllarda geliştirilen bu biyoteknoloji yöntemi, gen ekspresyonunun düzenlenebildiği mutant suşlar kullanılarak belirli bir gen tarafından üretilen doğal ürünlerin etkilerini araştırma ve karşılaştırma imkânı sağlamaktadır (Bode vd., 2015; 2019). Bu yaklaşımda, ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) veya poliketid sentetaz (PKS) enzimleri tarafından sentezlenen ve *Xenorhabdus* bakterilerinde tek bir promoter tarafından düzenlenen biyolojik gen kümeleri, indüklenebilir promotorlar kullanılarak etkinleştirilebilmektedir (Bode vd., 2019).

Tanımlanacak yeni akarisidal maddenin, hedef zararlı *T. urticae* üzerindeki etkisi ve *T. urticae*'nin doğal düşmanları (bu durumda avcı akarlar) üzerinde herhangi bir yan etki meydana getirip getirmeyeceğini belirlemek oldukça önemlidir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı (1) *Xenorhabdus nematophila* ve *X. szentirmaii* bakterileri tarafından sekonder metabolit olarak üretilen biyoaktif akarisidal maddeyi promoter bölgesi değiştirilmiş mutant suşları kullanarak belirlemek, (2) akarisidal aktivite gösteren mutant suşun indüklenmesiyle elde edilen süpernatantın *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerine etkilerini belirlemek, (3) aktivitenin saptandığı mutant suşa ait süpernatantın avcı akarlar, *P. persimilis* ve *N. californicus* üzerindeki toksisitesini belirlemek, (4) biyoaktif akarisidal ekstraktın *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkilerini belirlemek ve (5) akarisidal maddenin sitotoksik değerini belirlemektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Entomopatojen nematodlarla simbiyotik ilişkili bakterilerin ürettikleri sekonder metabolitlerin akarlar üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı sayıda literatür bulunmaktadır. Mevcut literatür bilgileri aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır.

Bussaman vd. (2006), *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'ların mantar akarı, *Luciaphorus* sp. (Acari: Pygmephoridae) üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Anti-fungal madde ürettikleri de bilinen bu bakterilerden 21 tanesinin mantar, *Lentinus squarrosulus*'un misel gelişimini etkilediği saptanmıştır. Daha sonra uygulanan sekiz bakteri türüne ait hücresiz süpernatantlarının akarlar üzerinde 24-48 saat içinde ölüm meydana getirdikleri saptanmıştır. *Photorhabdus luminescens* ssp. *laumondii*'nin iki suşu (GPS12 ve GPS11), 48 saat içinde akarlarda %90-95 oranında ölüm meydana getirerek test edilen sekiz bakteri içinde en etkili olmuştur. Bu çalışma, entomopatojen bakteriler *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'ların akarisidal aktiviteleri üzerine ilk kayıttır.

Bussaman vd. (2009)'nin yaptıkları başka bir çalışmada altı bakteri türünün (*P. luminescens* (P1), *X. nematophila* (X1), *X. nematophila* (X2), *X. bovienii* (X3), *X. poinarii* (4) ve *Xenorhabdus* sp. (5)) mantar akarı *Lentinus perniciosus* üzerine etkilerini araştırmışlar ve tüm simbiyotik bakterilerin mantar akarı *L. perniciosus* dişilerine karşı doğrudan toksik olduğunu bildirmişlerdir. *Xenorhabdus nematophila* (X1) ve *P. luminescens* (P1) bakteri kültürleri uygulanan *L. perniciosus* dişilerindeki maksimum ölüm oranı sırasıyla %85 ve %83 olarak uygulamadan üç gün sonra saptanmıştır. Ayrıca, *X. nematophila* (X1) bakteri kültürünün akarlarda oluşturduğu ölüm oranının hücre miktarına bağlı olarak arttığı belirtilmiştir. *Xenorhabdus nematophila* (X1)'nin en yüksek konsantrasyonu (1×10^8 hücre/ml) dışı akarlarda %85 ölüm oranıyla en yüksek etkiyi gösterirken, en düşük konsantrasyonu (1×10^4 hücre/ml) ise %40'lık en düşük ölüm oranını meydana getirmiştir.

Sobanboa vd. (2009) mantarlarda zararlı akar *Luciaphorus* sp.'ye karşı altı simbiyotik bakteri, *Xenorhabdus* sp. (X1), *X. nematophila* (X2), *X. poinarii* (X3), *Xenorhabdus* sp. (X4), *Photorhabdus luminescens* (P1) ve *P. luminescens akhurstii* (P2)'nin etkinliklerini araştırmışlardır. *Xenorhabdus* sp. (X1)'nin hücre süspansiyonu (1×10^8 hücre/ml) %82,5 oranında akar ölümüne neden olmuştur. Bakteri kültürlerinin yaşı ile akarlarda meydana getirdikleri ölüm oranı değişmiş,

iki günlük kültürde %82,5, üç günlük kültürde ise %74,17 ölüm oranı görülmüştür. Bunlara ilave olarak bakteri kültürü 30°C'de yetiştirildiğinde akarlarda ölüm oranı %83,33 olmuştur. *Xenorhabdus* sp. (X1)'in hücreleri uzaklaştırılarak elde edilen süpernatantı uygulandığında ise %90,83 ölüme neden olmuştur. X1 kültürünün iki ve üç günlük hücresiz süpernatantları sırasıyla %87,5 ve %78,33 ölüme neden olmuştur. Bunlara ilaveten, *Xenorhabdus* sp.(X1) bakteri süpernatantı *L. perniciosus*'un doğurganlığını önemli derecede azaltmıştır. Sonuçta test edilen tüm simbiyotik bakterilerin akarisidal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *Xenorhabdus* sp. (X1)'nin hem bakteri hücresi içeren süspansiyonu hem de hücreleri uzaklaştırılmış süpernatantının akarisidal etkisinin olduğu ve kültür mantarında zararlı akarların mücadelesinde potansiyel olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bussaman vd. (2012) Tayland'da mantar akarı *Luciopharus* sp.'ye karşı *Xenorhabdus stokiae* PB09 suşunun bakteri hücrelerini ihtiva eden süspansiyonunun, hücrelerin uzaklaştırıldığı süpernatantının ve ham hücre ekstraktının *Luciopharus* sp.'ye karşı etkinliğini araştırmışlardır. Sonuç olarak *X. stokiae* hücresiz süpernatant uygulaması hem yüksek akar ölümü (%89) hem de düşük üremeye (41 yumurta/dişi) neden olmuştur. İçerisinde bakteri hücrelerinin bulunduğu süspansiyon, hücresiz süpernatanta göre daha düşük etkiye sahip bulunmuştur. *Xenorhabdus stokiae*'nin ham hücre ekstratı uygulaması ise etkisiz bulunmuştur.

Namsena vd. (2016) *Luciophorus perniciosus*'un mücadelesinde *Xenorhabdus stockiae* PB09'nin biyoformülasyonu üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda ıslanabilir toz (WP), likid konsantrasyon (LC) ve sıvı süpernatantın sırasıyla %90,25, %86,5, %92,78 gibi yüksek oranda akarisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Tüm formülasyonlardaki akarisidal aktivite ve canlı hücre miktarı dikkate alındığında, 4 °C de depolamanın oda sıcaklığına göre daha uygun olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak hem WP hem de LC formülasyonlarının akarların mücadelesinde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Nermut vd. (2019) entomopatojen nematodlar *Steinernema* ve *Heterorhabditiscinslerine* ait 20 farklı izolatin infektif juvenillerini (IJs), *Rhizoglyphus* akarlarına karşı uygulamış ve akarlarda meydana gelen ölüm oranlarını belirlemişlerdir. Ayrıca bazı *Xenorhabdus* bakteri süpernatantlarının etkisini *Rhizoglyphus*'lara karşı araştırmışlardır. Sonuçta hem *Steinernema* hem de

Heterorhabditis nematodlarının akarları enfekte edip öldürebildiğini ancak infektivite ve ölüm oranının oldukça düşük olduğunu belirlemişlerdir. En yüksek infektivite oranı 30 IJs/akar ile *H. taysearae*'de elde edilmiştir. *Steinernema huense*, *H. bacteriophora* ve *H. amazonensis* %30 ile en yüksek ölüm oranı gösteren türler olmuşlardır. Uygulanan bakteri süpernatantlarının akarlar üzerindeki etkisi genellikle düşük bulunmuş fakat *Xenorhabdus* tür ve suşları arasında etkinlik açısından önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. Sonuç olarak entomopatojen nematodlar ve onlarla simbiyotik ilişkili bakteri metabolitlerinin, *Rhizoglyphus* akarlarının biyolojik mücadelesinde uygun bir seçenek olmadığı bildirilmiştir.

Eroğlu vd. (2019) entomopatojen nematodlarla ilişkili simbiyotik bakteriler *Xenorhabdus szentirmaii*, *X. nematophila*, *X. bovienii*, *X. cabanillasii*, *Photorhabdus luminescens* ve *P. temperata* tarafından üretilen sekonder metabolitlerin *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerine karşı etkilerini petri ve saksılarda araştırmışlardır. Petri denemeleri sonucunda tüm bakteri süpernatantlarının *T. urticae*'nin yumurtaları üzerinde etkisiz oldukları, larvalarda %46-97, protonimflerde %30-96, deutonimflerde %41-92, ergin erkeklerde %92-100 ve ergin dişilerde %46-93 oranında ölüme neden oldukları saptanmıştır. *Xenorhabdus szentirmaii* ve *X. nematophila* bakterileri *T. urticae*'nin hareketli dönemleri üzerinde %90'dan fazla ölüm oranıyla en etkili türler olarak kaydedilmiştir. Saksı denemeleri sonucunda *X. szentirmaii* ve *X. nematophila* süpernatantlarının, *T. urticae* popülasyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Cevizci vd. (2020), *X. szentirmaii* ve *X. nematophila* süpernatantlarının *T. urticae*'nin ergin dişilerine olası nüfuz etme şeklini ve predatör akarlar *Phytoseiulus persimilis* ve *Neoseiulus californicus*'un farklı biyolojik dönemlerine karşı toksisitesini araştırmışlardır. Bakteri süpernatantları, *T. urticae*'nin sadece ventral kısmına temas ettiğinde ölüm oranını %26,5 ile %34, hem ventral hem de dorsal kısmına temas ettiğinde ise ölüm oranını %86,5 ile %89 olarak belirlemişlerdir. *Xenorhabdus szentirmaii* veya *X. nematophila* süpernatantlarının *P. persimilis* ve *N. californicus* yumurtaları üzerinde etkisiz olduğu, larva, protonimf, deutonimf ve erginler üzerinde ise ancak %18,5 ile %39,2 oranında ölüm meydana getirdiği saptanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Üretimi

Tetranychus urticae üretiminde ve laboratuvar çalışmalarında kullanılmak amacı ile konukçu bitki olarak fasulye (*Phaseolus vulgaris* cv. barbunia) üretimi yapılmıştır. Bitki üretimi, içinde orman toprağı ve perlit bulunan saksılarda (15x15 cm) gerçekleştirilmiştir. Ekilen fasulye tohumlarının çimlenmesinden sonra bitkiler ilk 5-6 yaprak oluşumuna kadar temiz iklim odasında büyütülmüş ve daha sonra *T. urticae* üretimi için bir başka iklim odasına alınmıştır (Şekil 3.1). Konukçu bitki üretimi $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $\%60\pm 10$ orantılı nem koşullarında 16 saat aydınlatmalı iklim odalarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. İklim odasında yetiştirilen fasulye bitkileri

3.2. Akarların Üretimi

3.2.1. *Tetranychus urticae* Üretimi

Tetranychus urticae (yeşil form), Aydın'daki çilek bitkilerinden elde edilmiştir. 5-6 yaprağına ulaşan fasulye bitkileri *T. urticae* yetiştirme odasına getirilmiş ve zararlıların farklı biyolojik dönemleri ile bulaştırılmıştır. *T. urticae*'nin üretimi, bitki yetiştirme odası ile aynı özelliklere sahip başka bir iklim odasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Tetranychus urticae* ile bulaştırılmış fasulye bitkileri

3.2.2. Avcı Akar Üretimi

Avcı akarlar, *P. persimilis* ve *N. californicus* sırasıyla Hatay'daki fasulye bitkilerinden ve Aydın'daki çilek bitkilerinden elde edilmiştir (Cakmak vd., 2009; Cevizci vd., 2020). Üçüncü bir iklim odasında $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, $70 \pm 10\%$ oranlı nemde ve 16 saat aydınlık koşullarında *T. urticae*'nin tüm biyolojik dönemleri ile bulaşık fasulye yapraklarında üretilmiştir. Fasulye yaprakları, farklı boyutlarda iki küvet (45 x 32 x 8 cm; 78 x 56 x 18 cm) içindeki ters çevrilmiş saksılara yerleştirilmiştir. Akarların kaçmasını önlemek için küvetler su ile doldurulmuş ve pleksiglass bir kap ile kapatılmıştır (Cakmak vd., 2006; Kustutan ve Cakmak, 2009) (Şekil 3.3). *T. urticae* ile bulaşık üç ayrı fasulye yaprağı, avcı akarları üretmek için haftada üç kez ters çevrilmiş her saksıya yerleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Avcı akarların kitle üretimi

3.3. Akarisidal Biyoaktif Maddenin Tanımlanması

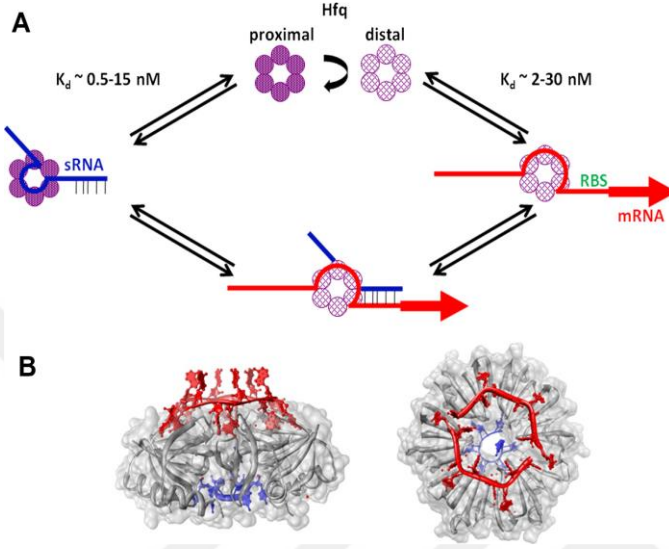
Eroglu vd. (2019) tarafından yürütülen çalışmalarda, birçok *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* türlerinin hücrelerinden arındırılmış süpernatantları *T. urticae*'ye karşı test edilmiş ve *X. szentirmaii* ve *X. nematophila*'nın en yüksek akarisidal etkiyi gösterdikleri belirlenmiştir.

Xenorhabdus szentirmaii ve *X. nematophila* türlerinde akarisidal etki gösteren biyoaktif maddenin belirlenmesi için Δ Hfq, Δ Pptase ve promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlar kullanılmıştır. Bu mutant suşların oluşturulması Almanya'nın Frankfurt kentinde bulunan Goethe Üniversitesi'nden Prof. Dr. Helge Bode'nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tübitak 117O172 nolu proje kapsamında proje ekibinde yer alan Prof. Dr. Selçuk Hazır, Dr. Bode'nin Almanya'daki laboratuvarına giderek (Şekil 3.4) hem *X. szentirmaii* ve *X. nematophila* türlerine ait mutant suşları almış hem de HPLC-MS fraksiyonlarını elde edilip ülkemize getirmiştir.



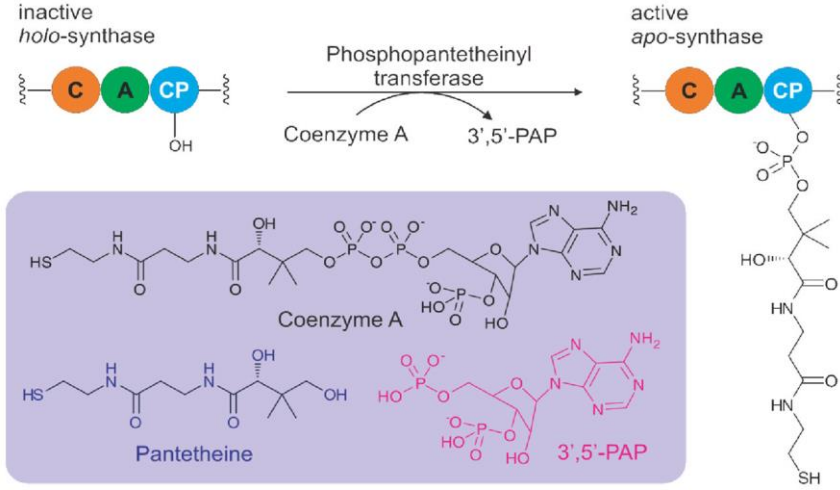
Şekil 3.4. Prof. Dr. Selçuk Hazır Goethe Üniversitesi'nde Prof. Dr. Helge Bode ile HPLC-MS fraksiyonları elde etmek için çalışırken

Hfq, hücresel süreçlerin kapsamlı bir şekilde kontrolünde rol alan sRNA, mRNA, tRNA, DNA ve hatta proteinlere bağlanabilen, bakteriler aleminde yaygın şekilde bulunan bir proteindir. Bakteriler, gen ekspresyonunu kontrol etmek için düzenleyici küçük RNA (sRNA)'lar kullanmaktadır. sRNA'lar virulans faktörlerin ifade edilmesinin yanı sıra bakterilerin olumsuz koşullarda hayatta kalması için önemlidir. sRNA'lar, sıklıkla hedef mRNA'ların translasyonunu ribozoma bağlanma bölgelerini serbest bırakarak veya bloke ederek kontrol ederler. sRNA ile hedefleri arasındaki meydana gelen etkileşimler genellikle RNA bağlanma proteini olan Hfq ile gerçekleşmektedir (Şekil 3.5).



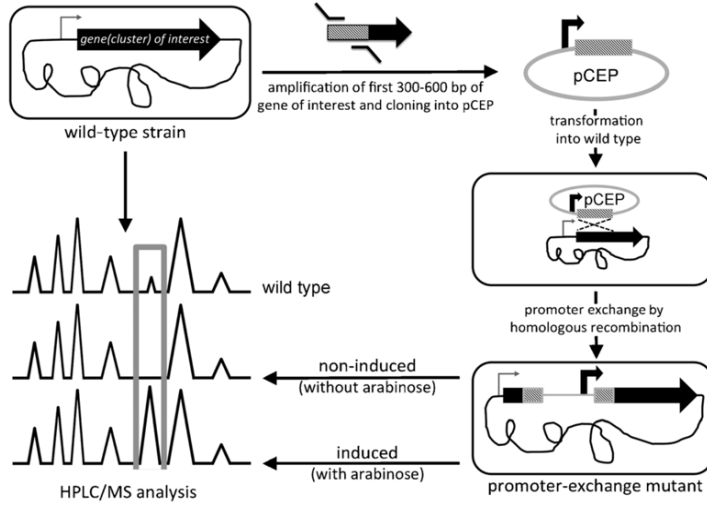
Şekil 3.5. Hfq-RNA kompleks oluşumu ve Hfq bağlanma yüzleri. (A) Hfq, sRNA'ları ve mRNA'ları benzer afinite ile bağlar. Hfq üçlü kompleksi oluşturmadan önce mRNA veya sRNA'yı önce bağlayabilir. (B) Hfq-AU₅G (PDB ID: 1KQ1) ve Hfq-polyA (PDB ID: 1HK9) kristal yapıları üst üste bindirilmiştir. AU₅G proksimal yüzü bağlar ve polyA, homoheksamerin distalini bağlar (Bode vd., 2015).

Bakteriyal sekonder metabolitlerin bir çoğu özel enzimler aracılığıyla sentezlenirler. Örneğin *Photorhabdus*'lar tarafından üretilen anthraquinon'lar polyketid sentetaz (PKS), *Xenorhabdus*'lar tarafından üretilen xenomatin'ler non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) ve fabclavine'ler her iki enzim (PKS/NRPS) aracılığıyla sentezlenirler. Bu enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesi için bazı taşıyıcı proteinler gerekmektedir. Bunlardan peptidyl carrier protein (PCP), PKS enzimatik reaksiyonunda yer alırken, acyl carrier protein (ACP), NRPS enzimatik reaksiyonunda yer almaktadır. Bu proteinlerin enzimatik reaksiyonda yer almaları için inaktif apo-formdan enzimatik olarak aktif holo-forma dönüşmeleri gerekmektedir. Bu aktivasyon basamağı phosphopantetheinyltransferaz (PPTase) tarafından katalize edilmektedir (Şekil 3.6). PPTase'ler yaşamın üç temel alanı olan bakteriler, arkeler ve ökaryotların tümünde hücre canlılığı için gereklidir. Bunlar PKS ve NRPS gibi proaktif bir biçimde hareket eden modüller ve tekrarlayan sentezleri post-translasyonel olarak değiştirirler (Bode vd., 2015).



Şekil 3.6. Bir PPTase ile post-translasyonel fosfopantatenilazasyonun genel reaksiyon şeması. PPTase burada, tipik bir NRPS modülü tarafından sergilenen *holo*-taşıyıcı proteini (CP) üretmek için, PPant parçasını Coenzim A'dan *apo*-CP üzerindeki korunmuş serine aktarır. C, yoğunlaşma; A, adenilasyon; CP, taşıyıcı protein domainleri; 3', 5'-PAP, 3',5'- fosfoadonezin fosfat (Bode vd., 2015)

Bu bilgilerden yola çıkarak *X. szentirmaii* ve *X. nematophila* türlerine ait bakterilerin farklı gen bölgeleri üzerinde yapılan promotor bölgesi değişiklikleri sayesinde elde edilen mutant suşların farklı sekonder metabolitlerinin üretimleri denetim altına alınmıştır. Bunu yaparken hedef maddenin üretiminden sorumlu gen bölgesinin önündeki doğal promotor bölge geriye itilerek o promotor bölgenin önüne L-arabinoz ile indüklenebilen yeni bir promotor bölge yerleştirilmiştir (Bode vd., 2015) (işlemin ayrıntısı Şekil 3.7'de verilmiştir).



Şekil 3.7. Promotor Değişirme Yöntemi. Doğal promotorunun değiştirilmesi istenen gen bölgesinin ilk 300-600 baz çiftlik bölgesi PCR ile çoğaltılır ve pCEP plazmitine klonlanır. Hedeflenen gen bölgesini taşıyan plazmit *E. coli* S17-1 λpir bakterisine elektroporasyon işlemi ile aktarılır. Plazmiti doğru bir şekilde aldığı saptanan *E. coli* bakterileri taşıdıkları plazmitleri konjugasyon aracılığıyla hedef geni taşıyan ve promotor değişikliği yapılmak istenen bakteriye aktarır. Promotor değişikliği gerçekleşen bakteriler pCEP plazmitinin taşıdığı kanamisin antibiyotik direnç geni sayesinde seçici besi ortamı kullanılarak kolaylıkla saptanır. Promotor değişikliği sonucunda doğal promotor (gri ok) yerine indüklenebilir promotor (siyah ok) yerleştirilmiş olur. Yeni promotor sıkı bir şekilde kontrol edilebilir ve indükleyici (arabinoz) olmadan aktivite göstermez. Buna bağlı olarak hedef gen bölgesi eksprese olmaz ve ilgili metabolit üretilmez. İndükleyici varlığında ise istenen gen normalden fazla eksprese olur ve ilgili metabolit yabancı tüpe göre daha fazla üretilir (Bode vd., 2015).

Böylece hedef gen bölgesi üreme ortamında sadece L-arabinoz olduğunda aktif hale gelebilmekte ve o genin kontrol ettiği sekonder metaboliti üretebilmektedir. Bu yöntemle promotor bölgesi değiştirilmiş 9 farklı *X. nematophilave* 11 farklı *X. szentirmaii* mutant suşu (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) ve *X. szentirmaii*'nin 13HPLC-MS fraksiyonları elde edilmiştir.

Çizelge 3.1.Çalışmada kullanılan *Xenorhabdus nematophila*'nin promotör bölgesi değiştirilmiş mutantsuşları ve kontrol ettikleri sekonder metabolitler

	Mutant suşlar	Kontrol ettikleri metabolit
1	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_2022	Xenotetrapeptide
2	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_1711	Xenocoumacin
3	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_2040	Xenoamicine
4	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_xndA	Xenortide
5	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_2783	PAX-peptide
6	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_2228	Rhabdopeptide
7	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_P _{BAD} _XNC1_2713	Xenematid
8	<i>X.nematophila</i> _ΔPPTase_P _{BAD} _XNC1_isnA	Rhabduscin
9	<i>X.nematophila</i> _Δhfq_ΔisnAB_P _{BAD} _XNC1_2300	Xenortide

Çizelge 3.2.Çalışmada kullanılan *Xenorhabdus szentirmaii*'nin promotör bölgesi değiştirilmiş mutant suşları ve kontrol ettikleri sekonder metabolitler

	Kodlar	Mutant suşlar	Kontrol ettikleri metabolit
1	KS16	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0346	GameXpeptide
2	SvS-218	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0377	Lipopeptide, Unknown
3	SvS-204	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-1979	Diketopiperazine
4	SvS-247	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3397	Rhabdopeptide
5	SvS-208	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3460	Szentiamid
6	SvS-210	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3663	Benzoxazolidine
7	SvS-212	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3680	Xenobactin
8	SvS-240	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3942	Rhabduscine
9	KS22	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-5118	Jenamidin derivate
10	LP56	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-fcIC	Fabclavin
11	LP53	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-xfSA	Xenofuranone
12		<i>X.szentirmaii</i> _P _{BAD} xpZI	
13		<i>X.szentirmaii</i> _P _{BAD} xpZA	
14		<i>X.szentirmaii</i> _P _{BAD} xpZV	
15		<i>X.szentirmaii</i> _Pcep-KM-02985	

Xenorhabdus nematophila ve *X. szentirmaii*'ye ait mutant bakteri suşları nutrient broth (NB) ortamında üretilirken iki gruba ayrılarak bir gruba L-arabinoz eklenip genler indüklenmiş, diğer gruba ise ekleme yapılmayarak genin çalışması engellenmiştir. Bakteriler 28°C'de ve 150 rpm de 24 saat süreyle üretilmiş daha sonra 10000 rpm'de ve 4°C'de 10 dk boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek tüm bakteri hücreleri uzaklaştırılmıştır (Hazir vd., 2016; Donmez-Ozkan vd., 2019). Elde edilen

indüklenmiş ve indüklenmemiş mutant suşlara ait süpernatantların etkisi *T. urticae* ergin dişileri üzerinde test edilmiştir.

Deneyler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%70 \pm 5$ oranlı nem ve 16 saat aydınlık koşullarına sahip bir iklim odasında (PG34-3 Digitech Ltd., Ankara) gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarına (15 cm çapında) önce nemlendirilmiş pamuk yerleştirilmiş ve daha sonra fasulye yaprağı alt tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanmış petriler

Tetranychus urticae'nin ergin dişileri her bir petri kabına 20 dişi olacak şekilde ince bir fırça ile ayrı ayrı aktarılmıştır (Şekil 3.9). Mutant suşların bir el spreyi (2,5 ml/Petri kabı) ile yaprakların üzerine püskürtülmüştür. Kontrol grubu olarak bakterilerin üretildiği steril NB besi ortamı kullanılmıştır. Uygulamadan 2,5 ve 7 gün sonra yapılan kontrollerde akarların ölüm oranları belirlenmiştir. Deneyler 20'şer tekerrürlü olarak yürütülmüş ve farklı zamanlarda 4 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.9. Kültürden petrilere kırmızı örümceklerin aktarılması

3.4. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun *Tetranychus urticae*'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkisi

Bölüm 3.3'de *T. urticae* dişileri üzerinde en etki olan *X.nematophila*'nın mutant suşu (pCEP_kan_XNC1_1711) L-arabinoz ile indüklendikten sonra elde edilen süpernatant hücrelerinden arındırılmış ve *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri (yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin) üzerindeki etkisi petri kaplarında ve saksılarda araştırılmıştır.

3.4.1. Petri Denemeleri

Xenorhabdus nematophila pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşuna ait süpernatantın *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerine (yumurta, larva, protonimf, deutonimf, ergin) karşı etkileri Bölüm 3.3'de anlatıldığı şekilde yürütülmüştür. Petri kaplarına (15 cm çapında) önce nemlendirilmiş pamuk yerleştirilmiş,daha sonra fasulye yaprağı alt tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. *T. urticae*'nin yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin dişileri, her bir petri kabına 20 birey olacak şekilde ayrı ayrı ince uçlu bir fırça ile aktarılmıştır. Denemelerde kullanılacak *T. urticae*'nin aynı yaştaki farklı biyolojik dönemlerini elde etmek için, *T. urticae*'nin 25 adet ergin dişi bireyi yaprak disklerine aktarılmıştır. Dişiler 24 saat sonra disklerden uzaklaştırılmış ve ortamda

sadece yumurtalar bırakılmıştır. Bu şekilde *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri (yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin dişi) aynı yaşta elde edilmiştir. *X.nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşun süpernatantı, bir el spreysi (2,5 ml/Petri kabı) ile yaprakların üzerine püskürtülmüştür. Kontrol grubu olarak steril NB kullanılmıştır. Uygulamadan 2,5 ve 7 gün sonra yapılan kontrollerde akarların ölüm oranları belirlenmiştir. Deneyler 20'şer tekerrürlü olarak yürütülmüş ve farklı tarihlerde 4 kez tekrarlanmıştır.

3.4.2. Saksı Denemeleri

Petri kabı deneylerinde olduğu gibi, saksı deneylerinde de fasulye bitkileri kullanılmıştır. Fasulye bitkileri saksılarda (7x5 cm) yetiştirilmiştir ve denemelerde aynı yaşta fasulye bitkileri kullanılmıştır. İki kotiledon yapraklı bitkilerin bir yaprağı kesilmiş ve her saksıda sadece bir yaprak bırakılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Denemelerde kullanılan saksılar

Tetranychus urticae kültüründen elde edilen 10'ar adet yumurta, larva, protonimf, deutonimf, ergin dişi ve ergin erkek olmak üzere toplam 60 birey, bu bitkilere ince uçlu bir fırça ile mikroskop altında aktarılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kırmızı örümceklerin saksılardaki fasulye yapraklarına transferi

Xenorhabdus nematophila pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşunun süpernatantı, bir el spreyi ile yaprakların hem alt hem de üst yüzeylerine(5 ml/saksı) püskürtülmüştür. Kontrol grubundaki bitkilere aynı miktarda steril NB püskürtülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Bakteri süpernatantı püskürtülen yapraklar

Püskürtmeden 7 gün sonra yapraklarda *T. urticae*'nin canlı tüm biyolojik dönemlerinin sayıları ayrı ayrı kaydedilmiştir. Deneyler 20'şer tekerrürlü olarak yürütülmüş ve farklı zamanlarda 4 kez tekrar edilmiştir.

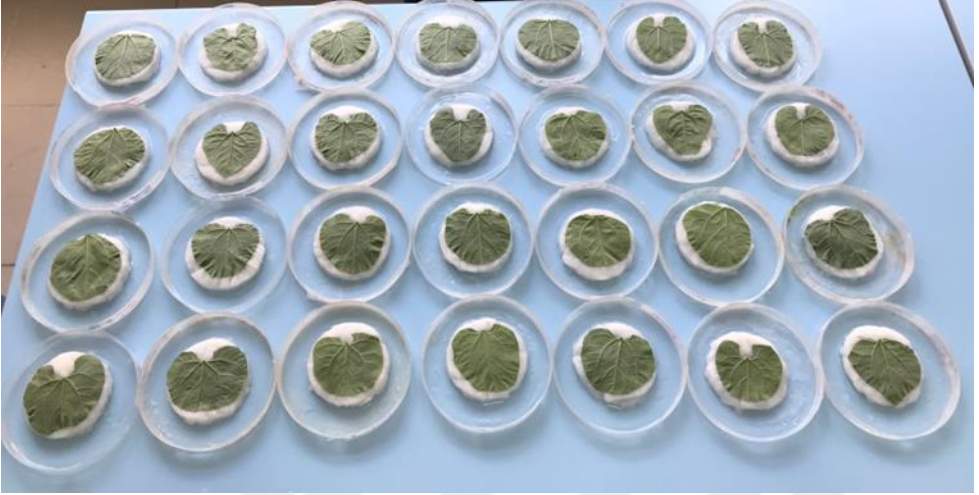
3.5. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun Avcı Akarlar Üzerindeki Toksisitesi

Xenorhabdus nematophila pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşu L-arabinoz ile indüklendikten sonra elde edilen hücesiz süpernatantın avcı akarlar *P. persimilis* ve *N. californicus* üzerindeki potansiyel toksik etkisi petri kapları üzerinde, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ orantılı nem ve 16 saat aydınlık koşullara sahip bir iklim odasında araştırılmıştır. Petri kaplarına (15 cm çapında) nemlendirilmiş pamuk (10 cm çapında) konmuş ve daha sonra pamuk üzerine fasulye yaprağı alt tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Petri kabı ile pamuk arasındaki boşluk, avcı akarların kaçmasını önlemek için musluk suyuyla doldurulmuştur (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Avcı akarların ergin dişi dönemi için hazırlanan petriler

Kültürden elde edilen ergin *P. persimilis* ve *N. californicus* (20 birey/Petri kabı) dişileri ayrı ayrı ince uçlu bir fırça ile petri kaplarındaki yapraklara aktarılmıştır. *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri (~ 300 birey) ile bulaşık fasulye yaprakları, avcı akarları beslemek için iki günlük aralıklarla yaprakların üzerine fırçalanmıştır (Şekil 3.14). *X. nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşunun süpernatantı yaprakların üzerine bir el spreyi (2,5 ml/petri) ile püskürtülmüş ve kontrol olarak steril NB kullanılmıştır. Uygulamadan 2, 5 ve 7 gün sonra her petrideki ergin dişilerin canlı ve ölü sayıları kaydedilmiştir. Ergin dişilerin bıraktığı yumurtalar ortamdaki ince uçlu bir fırça yardımıyla her gün uzaklaştırılmıştır. Denemeler 20'şer tekerrürlü olarak yürütülmüş ve farklı zamanlarda 4 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.14. *Tetranychus urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerinin firçalandığı avcı akar petrileri

3.6. Biyoaktif Akarisidal Madde Ekstraktının *Tetranychus urticae*'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkileri

Akarisidal aktiviteden sorumlu biyoaktif madde ekstrakte edilirken önce L-arabinoz ile indüklenen *X. nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşu içerisinde %2 XAD® resin bulunan Luria Berthoni (LB) sıvı besi yerinde ve 30°C de 3 gün boyunca üretilmiştir. Daha sonra ortamdaki resin metanol ile oda sıcaklığında (23-24°C) iyice karıştırılarak yoğun bir ekstrakt elde edilmiştir (Bode vd., 2019). Ekstrakt elde etme işlemleri Prof. Dr. Helge Bode'nin Almanya'daki laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve Türkiye'ye getirilmiştir. Elde edilen bu yoğun ekstrakt önce 400µl dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş ve ardından 200µl steril distile su ile karıştırılarak son konsantrasyonu 0,208 mg/ml olacak şekilde stok solüsyon hazırlanmıştır. Bu ekstraktın LC₅₀ ve LC₉₀ değerini belirlemek için bu stok çözeltinin farklı seyreltileri (%100,%50,%25,%12,5,%6,25 ve%3,125), petri kaplarındaki *T. urticae* dişilerine uygulanmıştır. Daha sonra, bu bileşiğin 5. gündeki LC₉₀ dozunun etkisi, petri kaplarında *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerine (yumurta, larva, protonimf, deutonimf ve ergin) üzerinde test edilmiştir. Bu çalışmalar için önce petri kaplarına (15 cm çapında) nemlendirilmiş pamuk yerleştirilmiş,daha sonra fasulye yaprağı alt tarafı yukarı bakacak şekilde yerleştirilmiştir. *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerinin her biri ayrı ayrı 20 adet/Petri olmak üzere her bir petri kabındaki yaprağa ince uçlu

bir fırça ile aktarılmıştır. Farklı seyreltiler ve ekstraktın 5. gündeki LC₉₀ dozu yaprakların üzerine bir el spreyi (2,5 ml / petri kabı) ile püskürtülmüştür. Kontrol grubu olarak DMSO kullanılmıştır. Uygulamadan 2, 5 ve 7 gün sonra akarların canlı ve ölü sayıları kaydedilmiştir. Denemeler 10'ar tekerrürlü olarak yürütülmüş ve farklı zamanlarda 2 kez tekrar edilmiştir.

3.7.Sitotoksisite Deneyleri

Sitotoksisite çalışmaları MRC-5 sağlıklı insan fetal akciğer fibroblast hücre hattı üzerinde yürütülmüştür. MRC-5 hücreleri Türkiye Tarım ve Ormanlık Bakanlığı hücre kültürü bankasından temin edilmiştir (MRC-5 An₁, HÜKÜK no: 96101701). Hücreler içerisinde %10 fetal bovine serum ve %5 penicillin-streptomycin solüsyonu bulunan Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) içerisinde üretilmiştir. Hücreler doku kültürü kapları içerisinde ve 37°C, %5 CO₂ ve %96 nem koşullarında inkübe edilmiştir. Hücrelerin içerisinde bulunduğu kültür ortamı her iki günde bir yenilenmiştir. *X.nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşundan elde edilen akarisisidal ekstraktın sitotoksisitesi MRC-5 hücre hattı üzerinde MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] yöntemi ile belirlenmiştir. MRC-5 hücreleri akarisisidal ekstraktın farklı dilüsyonları ile 48 saat boyunca 37 °C'de muamele edilmiştir. Akarisisidal ekstrakt önce 400µl DMSO içerisinde çözülmüş ve ardından 200µl steril distile su ile karıştırılarak son konsantrasyonu 0,208 mg/ml olacak şekilde stok solüsyon hazırlanmıştır. Altı farklı konsantrasyon (1,04'den 104 µg/ml kadar) EMEM (Sigma-Aldrich) içerisinde hazırlanmıştır. MRC-5 hücreleri 48 gözenekli doku kültür plakları içerisine her kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde eklenmiş ve 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra farklı dilüsyonlardaki akarisisidal ekstraktlar kuyucuklara ilave edilmiş ve 48 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Çalışmada iki farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Birinci grupta hücre kültür ortamı ve MRC-5 hücreleri, ikinci grupta ise çözücü olarak kullanılan DMSO ve MRC-5 hücreleri yer almıştır. 48 saat sonunda her kuyucuğa MTT solüsyonu (5 mg/mL) eklenmiş ve hücreler 4 saat süreyle daha 37°C'lik bir %5 CO₂ inkübatöründe tutulmuştur (Freimoser vd., 1999). Her kuyucuk içerisine oluşan formazon kristallerini çözmesi için 100µl DMSO eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika süreyle karıştırıldıktan sonra formazan renginin seviyesi optikal yoğunluk (OD) ölçer (Multiskan™ GO Microplate reader) (Thermo Scientific™, Finland) ile 570 nm (OD_{570-630nm}) ile ölçülmüştür (Abdi vd., 2018). Yari-maksimal inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀) değerleri 48

saat sonunda ölçülerek belirlenmiştir. Denemeler birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrar edilmiştir. Hücrelerin canlılık oranları % Canlılık = (uygulama yapılan hücrelerin OD değeri / Kontrol grubundaki hücrelerin OD değeri) x 100 formülasyonu ile hesaplanmıştır (Örenlili Yaylagül ve Ülger, 2020).

3.8. İstatiksel Analizler

Bölüm 3.3, 3.4.1 ve 3.6'daki veriler Genel Doğrusal Model ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey's Honestly Significant Difference (Tukey HSD) testine göre $P = 0,05$ düzeyinde gruplandırılmıştır. Bölüm 3.4.1 ve 3.6'da elde edilen veriler Abbott formülü (Abbott, 1925) uygulanarak hesaplanmıştır. Bölüm 3.4.2 ve 3.5'deki veriler Student t testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz yapılmadan önce tüm denemelerde akarların ölüm oranlarına Arcsine transformasyonu uygulanmıştır (SPSS, 2011). LC50 ve LC90 değerleri POLO bilgisayar paket programında belirlenmiştir (LeOra Software, 1994).

4. BULGULAR

4.1. Akarisidal Biyoaktif Maddenin Tanımlanması

Xenorhabdus nematophila'nın Δ Hfq mutant suşlarıyla yapılan denemeler sonucunda **Xenocoumacin** maddesinin üretiminden sorumlu olan gen bölgesi indüklenip gen aktif hale getirildiğinde ($P_{BAD_XNC1_1711}$ suşu) akarların 7 gün sonundaki ölüm oranı %100 olurken, Xenocoumacin geni indüklenmeyip susturulduğunda ise ortaya çıkan ölüm oranı %40'ın altında olmuştur. Kontrol grubunda ortaya çıkan ölüm oranı ise %9 olarak belirlenmiştir. Diğer sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu genlerin indüklenmesi sonucunda önemli bir akarisidal aktivite tespit edilmemiştir (Çizelge 4.1). Xenocoumacin ile test edilen diğer tüm bileşikler ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur/görülmüştür ($F = 16.695$, $df = 18$, $P < 0.001$). Bu sonuçlar *X. nematophila* bakterilerinde akarisidal aktiviteden sorumlu maddenin Xenocoumacin olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1. *Xenorhabdus nematophila*'nın promotör bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarının ürettiği süpernatantların *Tetranychus urticae*'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri

*	Mutant suşlar	Kontrol ettikleri metabolit	Uygulamadan sonraki ölüm oranı (%)		
			2.Gün	5.Gün	7.Gün
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2022	Xenotrapeptide	4,0±1,2	22,1±3,0	39,5±5,3 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2022	Xenotrapeptide	3,5±1,3	21,1±1,1	30,5±2,2 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_1711	Xenocoumacin	45,7±6,1	98,5±1,1	100,0±0,0 a
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_1711	Xenocoumacin	5,0±2,1	23,6±4,8	36,0±6,6 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2040	Xenoamicine	10,6±3,7	37,8±3,3	48,0±3,8 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2040	Xenoamicine	12,0±3,3	37,5±4,1	43,0±3,3 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_xndA	Xenortide	5,5±2,6	19,7±4,3	40,0±3,5 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_xndA	Xenortide	5,5±1,7	24,5±2,6	30,5±2,8 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2783	PAX-peptide	3,5±1,5	17,0±2,7	32,5±4,7 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2783	PAX-peptide	4,0±1,9	22,5±3,7	35,0±3,9 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2228	Rhabdopeptide	8,6±2,1	36,0±5,6	45,0±3,7 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2228	Rhabdopeptide	9,5±1,9	32,0±4,7	49,0±4,9 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2713	Xenematid	15,6±2,0	33,5±2,8	48,8±5,1 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq P _{BAD} _XNC1_2713	Xenematid	3,5±1,5	20,0±3,6	42,0±3,9 b
A+	<i>X.nematophila</i> ΔPPTase P _{BAD} _XNC1_isnA	Rhabduscin	3,5±1,5	29,5±3,0	45,0±5,6 b
A-	<i>X.nematophila</i> ΔPPTase P _{BAD} _XNC1_isnA	Rhabduscin	2,5±1,5	33,0±3,0	47,0±3,0 b
A+	<i>X.nematophila</i> Δhfq ΔisnAB P _{BAD} _XNC1_2300	Xenortide	4,6±2,2	29,5±2,2	48,0±3,4 b
A-	<i>X.nematophila</i> Δhfq ΔisnAB P _{BAD} _XNC1_2300	Xenortide	14,0±5,5	30,0±3,2	46,0±4,1 b
	Kontrol (steril Nutrient Broth)		2,7±1,5	6,0±2,3	9,0±2,4 c

*A+: İndüklenmiş, A-: indüklenmemiş

X.szentirmaii türüne ait promotor bölgesi değiştirilmiş 15 farklı mutant suş ve 13 HPLC-MS fraksiyonu ile yapılan denemeler sonucunda ise kullanılan süpernatantlar % 50'den daha az akarisidal aktivite sergilemiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.1). Bu nedenle *X.szentirmaii* türünde akarisidal aktiviteden sorumlu madde tespit edilememiştir.

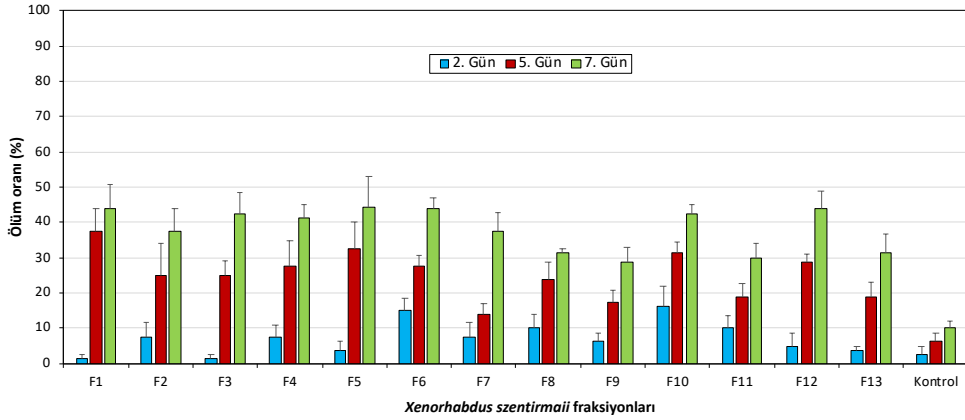
Çizelge 4.2. *Xenorhabdus szentirmaii*'nin promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarının ürettiği süpernatantların *Tetranychus urticae*'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri

*	Mutant suşlar	Kontrol ettikleri metabolit	Uygulamadan sonraki ölüm oranı (%)		
			2.Gün	5.Gün	7.Gün
KS16+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0346	GameXpeptide	6,0±1,8	26,5±2,0	44,3±4,7
KS16-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0346	GameXpeptide	5,0±2,0	25,2±2,5	36,9±2,8
SvS-218+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0377	Lipopeptide, Unknown	10,5±2,8	24,2±3,1	38,1±4,3
SvS-218-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-0377	Lipopeptide, Unknown	29,5±3,5	41,4±7,6	49,7±7,5
SvS-204+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-1979	Diketopiperazine	20,5±3,8	42,5±5,2	47,5±4,7
SvS-204-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-1979	Diketopiperazine	6,1±1,4	21,7±2,3	29,2±2,0
SvS-247+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3397	Rhabdopeptide	13,3±2,3	23,7±2,7	34,8±4,9
SvS-247-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3397	Rhabdopeptide	10,2±2,3	25,5±3,9	38,5±3,8
SvS-208+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3460	Szentiamid	7,5±1,9	17,0±2,5	28,0±2,8
SvS-208-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3460	Szentiamid	23,0±6,4	37,0±5,0	48,5±5,3
SvS-210+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3663	Benzoxazolidine	6,0±2,3	19,7±3,2	30,7±3,1
SvS-210-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3663	Benzoxazolidine	19,1±3,6	41,7±4,2	46,5±4,7
SvS-212+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3680	Xenobactin	9,0±1,8	18,5±3,3	25,5±2,5
SvS-212-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3680	Xenobactin	8,1±2,4	24,2±2,3	34,5±2,2
SvS-240+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3942	Rhabduscine	5,5±1,6	13,5±2,1	32,5±5,0
SvS-240-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-3942	Rhabduscine	2,5±1,1	20,6±2,6	45,2±4,3
KS22+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-5118	Jenamidin derivate	4,0±1,6	17,5±4,0	32,0±3,9
KS22-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-5118	Jenamidin derivate	14,5±1,9	26,6±2,2	41,7±4,2
LP56+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-fclC	Fabclavin	5,5±1,6	12,0±2,7	27,0±2,4

Çizelge 4.2. *Xenorhabdus szentirmaii*'nin promotor bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarının ürettiği süpernatantların *Tetranychus urticae*'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri (devamı)

*	Mutant suşlar	Kontrol ettikleri metabolit	Uygulamadan sonraki ölüm oranı (%)		
			2.Gün	5.Gün	7.Gün
LP56-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-fclC	Fabclavin	8,0±1,5	15,0±2,5	29,0±3,0
LP53+	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-xfSA	Xenofuranone	14,8±2,7	30,4±3,3	42,3±3,4
LP53-	<i>X.szentirmaii</i> Δhfq Pcep-KM-xfSA	Xenofuranone	10,1±1,3	27,2±4,3	41,2±3,4
A+	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzI		11,3±4,3	35,0±5,4	46,3±6,6
A-	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzI		7,5±3,2	13,8±4,3	23,8±4,3
A+	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzA		7,5±4,3	21,3±5,2	31,3±3,1
A-	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzA		12,5±4,8	22,5±7,8	32,5±7,8
A+	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzV		6,3±2,4	21,3±4,3	28,8±3,1
A-	<i>X.szentirmaii</i> P _{BAD} xpzV		12,5±4,3	27,5±6,0	33,8±9,0
A+	<i>X.szentirmaii</i> Pcep-KM-02985		8,4±4,0	16,3±2,4	25,0±3,5
A-	<i>X.szentirmaii</i> Pcep-KM-02985		6,3±2,4	35,0±4,1	41,7±4,5
	Kontrol (steril Nutrient Broth)		2,0±1,1	5,0±1,7	8,0±2,0

*+: İndüklenmiş, -: indüklenmemiş

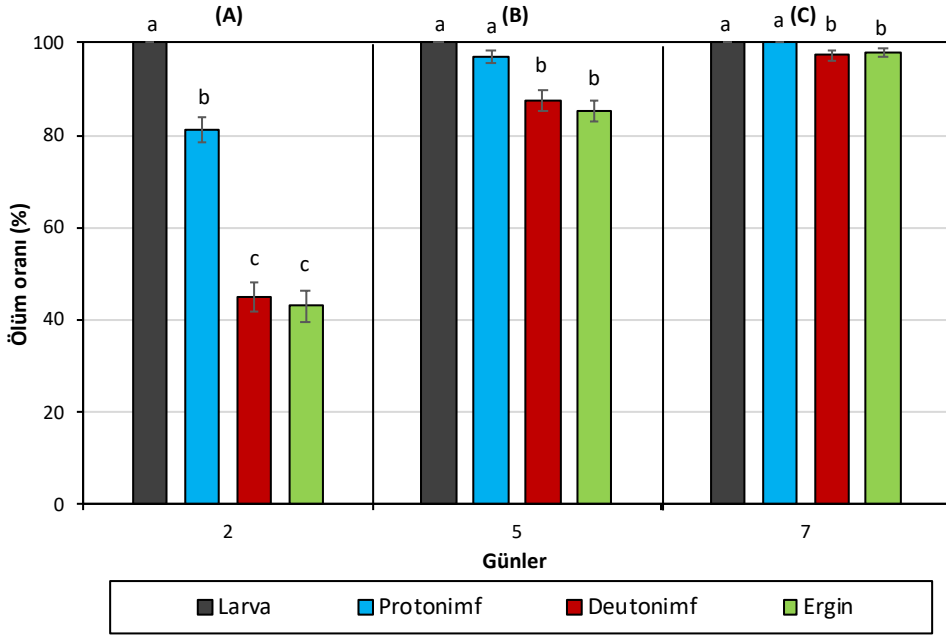


Şekil 4.1. *Xenorhabdus szentirmaii* HPLC-MS fraksiyonlarının *Tetranychus urticae*'nin ergin dişileri üzerindeki etkileri

4.2. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun *Tetranychus urticae*'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkisi

4.2.1. Petri Denemeleri

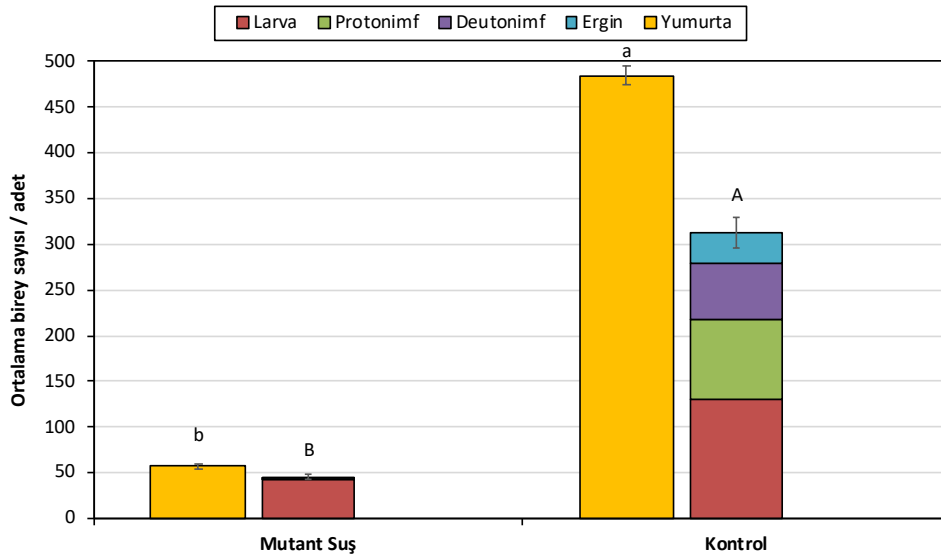
Xenorhabdus nematophila'nin Δ HfqP_{BAD}_XNC1_1711 kodlu mutant suşunun L-arabinoz ile indüklenmesi sonucu oluşan Xenocoumacin içerikli süpernatantın *T. urticae*'nin yumurta dönemi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (ovisidal oran %0). İndüklenmiş bakteri süpernatantıyla *T. urticae*'nin larva, protonimf, deutonimf ve ergin dişileri üzerine yapılan uygulamalardan 2 gün sonra sırasıyla %100, %81, %44,9 ve %43,1 oranında ölüm meydana gelmiştir (Şekil 4.2). *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri arasında ölüm oranları açısından aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuş/görölmüş ve en yüksek ölüm oranı larvalarda saptanmıştır (F= 187,580; P<0,001). Uygulamadan 5 ve 7 gün sonra en yüksek ölüm larva ve protonimflerde, en düşük ölüm ise deutonimf ve erginlerde saptanmasına rağmen, tüm biyolojik dönemlerde 5 gün sonra %85'in üzerinde, 7 gün sonra ise %97'nin üzerinde ölüm meydana gelmiştir (5. günde F= 24,417; P<0,001; 7. günde F= 4,694; P<0,05; Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Petri denemelerinde *Xenorhabdus nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant şuşunun ürettiği sekonder metabolit Xenocoumacin'in *Tetranychus urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri A) Uygulamadan 2 gün sonra, B) Uygulamadan 5 gün sonra, C) Uygulamadan 7 gün sonra

4.2.2. Saksı Denemeleri

Xenocoumacin içerikli süpernatantın *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerinin bulunduğu saksılara uygulanmasından 7 gün sonra ortamda saptanan canlı birey sayıları şekil 4.3'de gösterilmiştir. Deneme başlangıcında *T. urticae*'nin 10 yumurta ve 50 hareketli dönemi (larva, protonimf, deutonimf, ergin dişi ve erkek) yaprakta bulunurken, 7 gün sonra *X.nematophila*'nın mutant şuşunun ürettiği süpernatant grubunda ve kontrolde sırasıyla 57 ve 485 yumurta ile 45 ve 313 hareketli dönem elde edilmiştir. Hem yumurta sayıları hem de hareketli dönem sayıları dikkate alındığında Xenocoumacin içerikli süpernatant ile kontrol arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur/görölmüştür (yumurta, $F=13,972$; $P<0,01$; $t=42,988$; hareketli dönem $F=11,111$; $P<0,01$; $t=41,307$; Şekil 4.3).



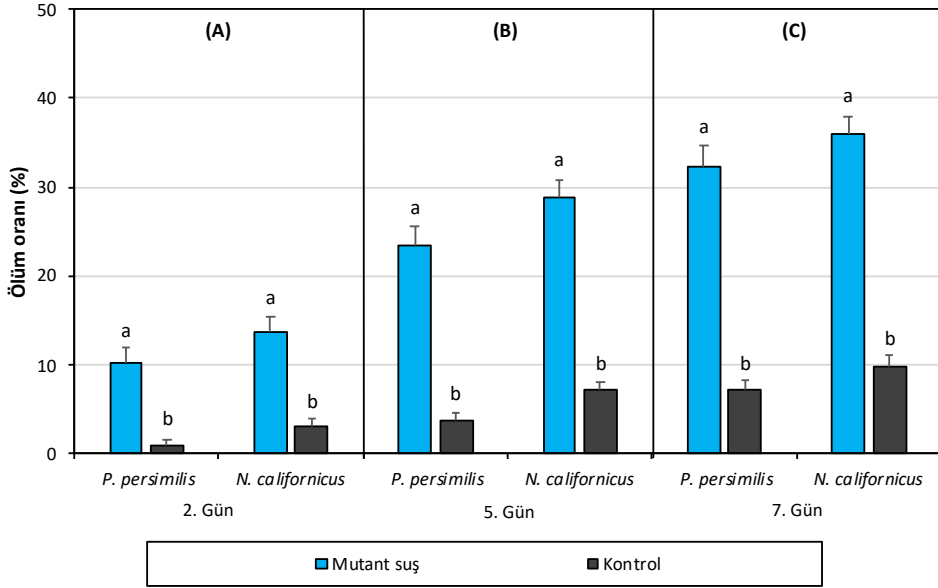
Şekil 4.3. Saksı denemelerinde *Xenorhabdus nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant suşunun ürettiği Xenocoumacin'in *Tetranychus urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri

4.3. Akarisidal Aktiviteden Sorumlu Maddeyi Üreten Mutant Suşun Avcı Akarlar Üzerindeki Toksisitesi

İçerisinde Xenocoumacin bulunan *X. nematophila* süpernatantının avcı akarlar *Phytoseiulus persimilis* ve *N. californicus*'un ergin dönemlerine uygulanmasından 2, 5 ve 7 gün sonra elde edilen ölüm oranları Şekil 4.4'de verilmiştir. *P.persimilis*'in ergin dişilerine uygulanan süpernatant ve kontroldeki ölüm oranları uygulamadan 2, 5 ve 7 gün sonra sırasıyla %10,3, %23,5, %32,3 ve %1, %3,8, %7,3 olarak saptanmıştır. Mutant suş ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (2. gün $F=12,245$; $P<0,01$; $t= 5,54$; 5. gün $F=21,674$; $P<0,001$; $t=8,454$; 7. gün $F=19,158$; $P<0,001$; $t= 9,499$; Şekil 4.4A,B,C).

Neoseiulus californicus'un ergin dişilerine uygulanan Xenocoumacin içerikli süpernatant ve kontroldeki ölüm oranları uygulamadan 2,5 ve 7 gün sonra sırasıyla %13,8, %28,8, %36,0 ve %3, %7,3, %9,8 olarak saptanmıştır. Bakteri süpernatantı ile kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (2. gün $F=5,821$; $P<0,05$; $t= 5,669$; 5. gün $F=10,230$; $P<0,01$; $t=9,284$; 7. gün $F=7,605$; $P<0,01$; $t=11,132$; Şekil 4.4A,B,C).

Ancak avcılar arasında mutant suşun ürettiği sekonder metabolitlere duyarlılık açısından aradaki fark istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (2. gün $F=0,240$; $P>0,05$; $t=1,520$; 5. gün $F=0,227$; $P>0,05$; $t=1,752$; 7. gün $F=1,004$; $P>0,05$; $t=1,193$).



Şekil 4.4. *Xenorhabdus nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant suşunun ürettiği Xenocoumacin'in avcı akarlar *Phytoseiulus persimilis* ve *Neoseiulus californicus*'un ergin dişileri üzerindeki toksisitesi A) Uygulamadan 2 gün sonra, B) Uygulamadan 5 gün sonra, C) Uygulamadan 7 gün sonra

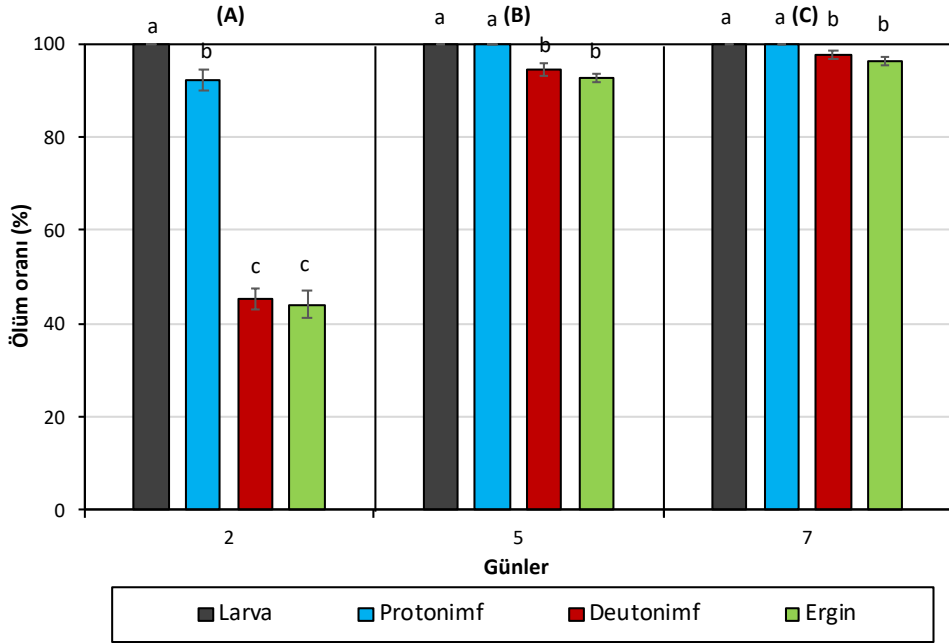
4.4. Xenocoumacin ekstraktının *Tetranychus urticae*'nin Farklı Biyolojik Dönemleri Üzerindeki Etkileri

Veriler, Xenocoumacin'in son derece etkili bir akarisit bileşik olduğunu ortaya koymuştur. Xenocoumacin'in %25'lik konsantrasyonu bile uygulamadan 7 gün sonra *T. urticae* ergin dişilerinde % 93,8 oranında ölüm meydana getirmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı Xenocoumacin dilusyonlarının *Tetranychus urticae* ergin dişileri üzerindeki etkisi

Test edilen madde	Farklı dilusyonlar (%)	Uygulamadan sonraki ölüm oranı (%)		
		2. Gün	5. Gün	7. Gün
Xenocoumacin	100	95,0±2,9	100,0±0,0	100,0±0,0
	50	46,3±5,5	93,8±3,8	96,3±2,4
	25	46,3±6,9	85,0±3,5	93,8±3,8
	12,5	30,0±5,4	51,3±9,4	62,5±6,0
	6,25	13,8±7,7	22,5±7,8	28,8±7,5
	3,125	7,5±3,2	20,0±4,6	30,0±2,0
Kontrol (DMSO içeren distile su)		1,3±1,3	13,8±2,4	15,0±4,6

Xenocoumacin'in 2, 5 ve 7 günlerdeki LC₅₀ değerleri sırasıyla 0,060, 0,026, 0,021 mg/ml ve LC₉₀ değerleri 0,301, 0,071, 0,055 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Beşinci gündeki LC₉₀ değeri (0.071 mg/ml) *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerine uygulandığında, *T. urticae*'nin larva, protonimf, deutonimf ve ergin dişileri üzerinde sırasıyla 2. günde %100, 92, 45, 44; 5. günde %100, 100, 94, 92 ve 7. günde %100, 100, 97, 96 oranında ölüm meydana gelmiştir (Şekil 4.5). *T. urticae*'nin farklı biyolojik dönemlerinin 2. 5. ve 7. gündeki ölüm oranları arasında istatistiki olarak önemli fark görülmüştür (2. günde F = 169.005; P <0.001; 5. günde F = 32.665 P <0.001; 7. günde F = 9.717; P <0.001; Şekil 4.5). Diğer taraftan, Xenocoumacin'in *T. urticae*'nin yumurta dönemleri üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir (ovisidal oran% 0).



Şekil 4.5. Xenocoumacin'in *Tetranychus urticae*'nin farklı biyolojik dönemleri üzerindeki etkileri

4.5. Sitotoksosite Deneyleri

MRC-5 insan fetal akciğer fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmaları Xenocoumacin ekstraktına ait IC_{50} değerinin $17.71 \mu\text{g/ml}$ olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Entomopatojen nematodlar (EPN) konukçu bir böceğe girdiğinde, birlikte yaşadıkları simbiyotik bakteriler, enfekte kadavrayı bakteri, fungus, protozoa gibi fırsatçı mikroorganizmalardan ve karıncalar, çekirgeler, hamamböcekleri, akarlar v.s. gibi yağmacı arthropdlardan korumak için geniş spektrumlu aktiviteye sahip çok çeşitli biyo-aktif bileşikler üretmektedirler (Gulcu vd., 2012; Ulug vd., 2014; Lewis vd., 2015). *Hypoaspis* sp., *Pergamasus* nr. *crassipes* (Mesostigmata), *Eugamasus* sp. (Mesostigmata), *Cosmolaelaps vacua*, *Ololaelaps veneta*, *Gamasellodes vermivorax*, *Antennoseius* sp., *Amblyseius setulus*, *Ascanesoica*, *Alycus roseus*, *Pilogalumna cozadensis* (Oribatida), *Alicorhagia fragilis* (Endeostigmata), *Tyrophagus putrescentiae* (Astigmata) gibi akarların EPN'ler üzerinden beslendikleri bildirilmiştir (Raja vd., 2021). Ayrıca, *Sancassania polyphyllae* (Astigmata) gibi türlerin EPN ile enfekte olmuş böcek kadavralarında ve burada gelişen EPN IJ'leri ile beslendiği gözlemlenmiştir (Karagoz vd., 2007; Ekmen vd., 2010a,b; Cakmak vd., 2010; 2011; 2013). Enfekte kadavrayı ve gelişen nematodları akarlardan korumak için, nematod-bakteri kompleksi biyoaktif akarisit bileşik/ler üretmelidir. Buna göre, yürütülen çalışmalar, bazı *Xenorhabdus* bakteri türlerinin akarisidal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Bussaman vd., 2006, 2012; Nermut vd., 2019; Eroglu vd., 2019, Cevizci vd., 2020). Ancak, bu çalışmaların hiçbirisinde biyoaktif akarisit bileşik tanımlanmamıştır. Bu nedenle yapılan bu çalışma, son yıllarda geliştirilen easyPACId biyoteknolojik yöntem kullanılarak *X. nematophila* bakteri türünde üretilen akarisidal aktiviteden sorumlu maddeyi saptayan ilk çalışmadır. Bu biyoteknolojik yaklaşım, gen kümelerini kontrol edenindüklenebilir promotörlerle mutant suşları aktive ederek diğer bileşiklerin genlerini susturmak suretiyle aradığımız biyoaktif maddeyi belirlememizi sağlamıştır (Bode vd., 2015, 2019). Promotör bölgesi değiştirilmiş mutant suşlarla yapılan deneyler, *X. nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşunun indüklendiğinde ürettiği Xenocoumacin'in *T. urticae* üzerinde en yüksek akarisit etkiyi gösterdiği saptanmıştır.

Xenocoumacin'ler *X. nematophila*'da iki form (Xenocoumacin-1 ve Xenocoumacin-2) olarak ilk defa McInerney vd. (1991) tarafından tanımlanmış ve benzopyran-1-one (isocoumarin)'lerin türevidir. Daha sonra Reimer vd. (2009) birkaç *Xenorhabdus* suşundan bu doğal ürünlerin dört ilave türevini keşfetmiş ve bunların bir hibrit poliketid sentaz (PKS) - nonribozomal polipeptid sentetaz (NRPS) ile sentezlendiğini bildirmiştir. Her iki form da (Xenocoumacin-1 ve 2)

antifungal, antibakteriyel, antikanser ve anti-ülser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir, ancak Xenocoumacin-1 biyolojik olarak daha aktiftir (Webster vd., 2002; Park vd., 2009; Dreyer vd., 2018).

Diğer taraftan *X. szentirmaii*'nin indüklenmiş veya indüklenmemiş 15 mutant suşu %50'den daha az akarisidal aktivite göstermiştir. *X.szentirmaii* Xenocoumacin üretmeyen bir türdür (Tobias vd., 2017). Bu nedenle akarisidal aktiviteden sorumlu olan molekülün farklı bir molekül olması gerekmektedir. *X.szentirmaii* türünde biyoaktif akarisidal maddenin ne olduğunun bulunamamasının nedenleri ya tüm sekonder metabolitlere ait mutant suşların oluşturulamamış olması, ya da HPLC-MS fraksiyonlarından elde edilen verilerden yola çıkarak, *X. szentirmaii*'deki akarisidal aktiviteden sorumlu olan maddenin tek bir molekülden oluşmadığı, iki veya daha fazla farklı molekülün bu etkiyi sergilemek için bir araya gelmesi gerekliliğinden olabilir.

Bu çalışmada Xenocoumacin'in önemli bir zararlı olan *T. urticae*'nin tüm biyolojik dönemleri üzerindeki akarisidal etkisi araştırılmıştır. İlk olarak, *T. urticae*'nin hareketli dönemlerinin, *X. nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant suşuna ait süpernatantlardan ve Xenocoumacin ekstraktından farklı seviyelerde etkilendiği görülmüştür. Petri denemelerinde uygulamadan iki gün sonra *T. urticae*'nin larva dönemleri, ergin dişilere göre daha duyarlı bulunmuş ancak yedi gün sonra *T. urticae*'nin tüm biyolojik dönemlerinde ölüm oranı %96'nın üzerinde görülmüştür. Benzer şekilde Eroğlu vd. (2019), *X. nematophila* süpernatantının 7 günün sonunda ergin dişilerde %90, *T. urticae* larvalarında %98 oranında ölüm meydana getirdiğini bildirmiştir.

Yürüttüğümüz çalışmada Xenocoumacin maddesinin *T. urticae* ergin dişileri üzerindeki LC₅₀ değerleri 2, 5 ve 7. günler için sırasıyla 0.060, 0.026, 0.021 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında Furuya vd. (2017) yeni bir akarisidal madde olan pyflubumide için *T. urticae*'ye karşı LC₅₀ değerini 1.2 mg olarak belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise *T. urticae* ergin dişileri için cyflumetofen akarisidal maddesinin LC₅₀ değeri 1.1 mg/L olarak rapor edilmiştir (Hayashi vd.,2013)

Saksı denemelerinde, *X. nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant suşunun süpernatantı *T. urticae* popülasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Benzer şekilde Eroğlu vd. (2019) *X. szentirmaii* ve *X. nematophila*'nın süpernatantlarının tek

başlarına yadabirlikte kullanıldığında, saksı denemelerinde *T. urticae* popülasyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada *X. nematophila* (pCEP_kan_XNC1_1711) mutant suşuna ait süpernatantın *T. urticae* yumurtaları üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (ovisidal oran% 0). Genel olarak akar yumurtalarının akarisitlere, *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* bakterisi süpernatantlarına veya entomopatojen fungusların enfeksiyonlarına dirençli olduğu bildirilmektedir (Dogan vd., 2017; Eroglu vd., 2019; Cevizci vd., 2020).

Doksan altı etken maddeye direnç kazanan *T. urticae*, dünyadaki eklembacaklı zararlılar arasında en dayanıklı tür olarak bilinmektedir (Mota- Sanchez ve Wise, 2021). Bu nedenle, *P. persimilis* ve *N. californicus* gibi avcı akarlar, *T. urticae* popülasyonlarını kontrol etmek için alternatif olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. İdeal bir akarisidal bileşik *T. urticae*'yi öldürmeli ancak bu avcı akarlar üzerinde minimum yan etkiye sahip olmalıdır. Bu nedenle gerçekleştirilen bu çalışmada, Xenocoumacin'in *P. persimilis* ve *N. californicus*'un ergin dişilerine karşı toksisitesi de değerlendirilmiştir. Akarisidal aktiviteye sahip olan *X. nematophila* pCEP_kan_XNC1_1711 mutant suşuna ait süpernatant veya Xenocoumacin ekstratlarının *T. urticae*'nin ergin dişileri üzerinde %90'dan fazla ölüm meydana getirmesine rağmen, 7 günün sonunda her iki avcı akarda %40'tan daha az ölüm oranı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Cevizci vd. (2020) tarafından da elde edilmiştir. Avcı akarlar ve *T. urticae* arasındaki morfolojik farklılıklar, akarların bakteriyel süpernatantlara farklı duyarlılıklar göstermesinde anahtar bir role sahiptir. Örneğin, *T. urticae* yapraklarda beslenmekte, avcı akarlar göre bacakları daha kısa ve vücut kısımları uygulanan bileşiklerle daha doğrudan temas halinde bulunmaktadır (Cevizci vd., 2020). Bunun yanı sıra, avcı akarlarda *T. urticae*'den daha kalın bir kutikula bulunmaktadır (Wu vd., 2018).

Bu çalışmada yürütülen sitotoksikite çalışmaları, Xenocoumacin maddesinin 17.71µg/ml'dan aşağı oranlarda kullanıldığında insan hücre hattı üzerinde toksik olmadığını göstermiştir. Bode vd. (2019) *X. nematophila* bakterisinden elde ettikleri Xenocoumacin maddesinin sıvı ekstrakt halini insan mikrovasküler endothelial hücre hattı üzerinde test etmişlerdir. Hücre çoğalması üzerindeki toksik etkisi haricinde Xenocoumacin maddesinin hücrelerin metabolik aktivitesi üzerinde hiç bir toksik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca Xenocoumacin'in lökosit adhezyonu üzerindeki sitotoksitesinin orta derecede olduğunu ve endothelial hücrelerdeki etkisinin ise oldukça düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın verileri, *X. nematophila* bakterilerinden elde edilecek Xenocoumacin maddesinin potansiyel olarak *T. urticae*'nin mücadelesinde biyo-akarisit olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak Xenocoumacin'in tarla denemelerindeki etkinliği ve bitkiler üzerindeki fitotoksitesinin ileriki çalışmalarda belirlenmesinde fayda vardır.



KAYNAKLAR

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology**, 18(2): 265-267.
- Abdi Goushbolagh N, Abedi Firouzjah R, Ebrahimnejad Gorji K, Khosravanipour M, Moradi S, Banaei A, Astani A, Najafi M, Zare MH, Farhood B. 2018. Estimation of radiation dose-reduction factor for cerium oxide nanoparticles in MRC-5 human lung fibroblastic cells and MCF-7 breast-cancer cells. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, 46(sup3):1215-1225.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., Gupta, R.S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 66: 5575-5599.
- Anonim, 2011. Türkiye'den 2011 yılında yapılan domates ihracat rakamları ve ihraç edilen ülkeler, (<http://www.yms.org.tr>), Erişim Tarihi: 30.08.2017.
- Bode, E., Brachmann, A.O., Kegler, C., Simsek, R., Dauth, C., Zhou, Q., Kaiser, M., Klemmt, P., Bode, H.B. 2015. Simple "on-demand" production of bioactive natural products. **Chembiochem**, 16(7): 1115-9
- Bode, E., Heinrich, A.K., Hirschmann, M., Abebew, D., Shi, Y.N., Vo, T.D., Wesche, F., Shi, Y.M., Grün, P., Simonyi, S., Keller, N., Engel, Y., Wenski, S., Bennet, R., Beyer, S., Bischoff, I., Buaya, A., Brandt, S., Cakmak, I., Çimen, H., Eckstein, S., Frank, D., Fürst, R., Gand, M., Geisslinger, G., Hazir, S., Henke, M., Heermann, R., Lecaudey, V., Schäfer, W., Schiffmann, S., Schöffler, A., Schwenk, R., Skaljic, M., Thines, E., Thines, M., Ulshöfer, T., Vilcinskas, A., Wichelhaus, T.A., Bode, H.B. 2019. Promoter activation in Δ hfq mutants as an efficient tool for specialized metabolite production enabling direct bioactivity testing. **Angewandte Chemie International Edition**, 58(52): 18957-18963.
- Bode, H.B. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, 13: 224-230.

- Bussaman, P., Sa-Uth, C., Rattanasena, P., Chandrapatya, A. 2012. Acaricidal activities of whole cell suspension, cell-free supernatant, and crude cell extract of *Xenorhabdus stokiae* against mushroom mite (*Luciaphorus* sp.). **Journal of Zhejiang University Science B**, 13(4): 261-266.
- Bussaman, P., Sermswan, R.W., Grewel, P.S. 2006. Toxicity of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* to the mushroom mite (*Luciaphorus* sp; Acari: Pygmephoridae). **Biocontrol of Science and Technology**, 16: 245-256.
- Bussaman, P., Sobanboa, S., Grewal, P. S., Chandrapatya, A. 2009. Pathogenicity of additional strains of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) to the mushroom mite *Luciaphorus perniciosus* (Acari: Pygmephoridae). **Applied Entomology and Zoology**, 44(2): 293-299.
- Cagatay, N.S., Riga, M., Vontas, J., Çevik, B., Ay, R., 2018. Biochemical and molecular characterizations of cypermethrin resistance in laboratory-selected cypermethrin-resistant strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology**, 5: 1-7.
- Cakmak, I., Baspinar, H., Madanlar, N. 2005. Control of the carmine spider mite *Tetranychuscinnabarinus* Boisduval by the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot) in protected strawberries in Aydin, Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 29: 259-265.
- Cakmak, I., Ekmen, Z.I., Karagoz, M., Hazir, S., Kaya, H.K., 2010. Development and re- production of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) feeding on entomopathogenic nematodes and tissues of insect larvae. **Pedobiologia**, 53: 235-240.
- Cakmak, I., Hazir, S., Ulug, D., Karagoz, M., 2013. Olfactory response of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) to its phoretic host larva killed by the entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae). **Biological Control**, 65: 212–217.
- Cakmak, I., Janssen, A., Sabelis, M.W. 2006. Intraguild interactions between the predatory mites *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus persimilis*. **Experimental and Applied Acarology**, 38: 33-46.

- Cakmak, I., Janssen, A., Sabelis, M.W., Baspinar, H. 2009. Biological control of an acarine pest by single and multiple natural enemies. **Biological Control**, 50: 60-65.
- Cakmak, I., Karagoz, M., Ekmen, Z.I., Hazir, S., Kaya, H.K., 2011. Life history of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) feeding on dissected tissues of its phoretic host, *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae): temperature effects. **Experimental and Applied Acarology**, 53: 41–49.
- Cevizci, D., Ulug, D., Cimen, H., Touray, M., Hazir, S., Cakmak, I. 2020. Mode of entry of secondary metabolites of the bacteria *Xenorhabdus szentirmaii* and *X. nematophila* into *Tetranychus urticae* and their toxicity to the predatory mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 174: 10741.
- Dhanasekaran, D., Thangaraj, R., 2014. Microbial secondary metabolites are an alternative approach against insect vector to prevent zoonotic diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 4: 253-261.
- Dogan, Y.O., Hazir, S., Yildiz, A., Butt, T.M., Cakmak, I., 2017. Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the effect of *Metarhizium brunneum* on the predatory mites (Acari: Phytoseiidae). **Biological Control**, 111: 6–12.
- Donmez Ozkan, H., Cimen, H., Ulug, D., Wenski, S., Yigit Ozer, S., Telli, M., Aydin, N., Bode, H.B., Hazir, S., 2019. Nematode-associated bacteria: Production of anti- microbial agent as a presumptive nominee for curing endodontic infections caused by *Enterococcus faecalis*. **Frontiers Microbiology**, 10:2672.
- Dreyer, J., Malan, A.P., Dicks, L.M.T. 2018. Bacteria of the genus *Xenorhabdus*, a novel source of bioactive compounds. **Frontiers in Microbiology**, 9:3177
- Ekmen, Z.I., Cakmak, I., Karagöz, M., Hazir, S., Ozer, N., Kaya, H., 2010a. Food preference of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae): living entomopathogenic nematodes or insect tissues? **Biocontrol Science And Technology**, 20: 553-566.

- Ekmen, Z.I., Hazir, S., Cakmak, I., Ozer, N., Karagöz, M., Kaya, H.K., 2010b. Potential negative effects on biological control by *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) on an entomopathogenic nematode species. **Biological Control**, 54: 166-171.
- Eroglu, C., Cimen, H., Ulug, D., Karagoz, M., Hazir, S., Cakmak, I. 2019. Acaricidal effect of cell-free supernatants from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 160: 61-66.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. E., Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, 51: 47-72.
- Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., Tuor, U. 1999. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(8):3727-9.
- Fuchs, S.W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., Bode, H.B. 2014. Fabclavines: bioactive Peptide-Polyketide-Polyamino hybrids from *Xenorhabdus*. **Chembiochem**, 15: 512-516.
- Furuya, T., Machiya, K., Fujioka, S., Nakano, M., Inagaki, K. 2017. Development of a novel acaricide, pyflubumide. **Journal of Pesticide Science**, 42(3): 132-136.
- Gualtieri, M., Aumelas, A., Thaler, J.O. 2009. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Antibiotics**, 62: 295-302.
- Gulcu, B., Hazir, S., Kaya, H.K. 2012. Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 110: 326-333.
- Hayashi, N., Sasama, Y., Takahashi, N., Ikemi, N. 2013. Cyflumetofen, a novel acaricide - its mode of action and selectivity. **Pest Management Science**, 69(9): 1080-1084.
- Hazir, S., Kaya, H.K., Stock, S.P., Keskin, N., 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, 27:181-202.

- Hazir, S., Shapiro-Ilan, D.I., Bock, C.H., Hazir, C., Leite, L.G., Hotchkiss, M.W., 2016. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, 146: 369-381.
- Houard, J., Aumelas, A., Noël, T., Pages, S., Givaudan, Fitton-Ouhabi, V., Villain-Guillot, P., Gualtieri, M. 2013. Cabanillasin, a new antifungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasii* JM26. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, 66(10): 617-620.
- Hussey, N.W., Scopes, N.E.A. 1985. Greenhouse vegetables (Britain). In: Spider Mites Their Biology, Natural Enemies and Control (Helle, W. and Sabelis, M.W., Eds.), Elsevier, pp. 285-297, Amsterdam.
- Ilias, A., Vontas, J., Tsagkarakou, A., 2014. Global distribution and origin of target site insecticide resistance mutations in *Tetranychus urticae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 48: 17-28.
- Jeppson, L.R., Keifer, H.H., Baker, E.W., 1975. Mites Injurious to Economic Plants. University of California, Berkeley, CA, USA.
- Karagoz, M., Gulcu, B., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, S., 2007. Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae). **Experimental and Applied Acarology**, 43: 85-95.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38: 181-206.
- Kulkarni, N. S., Mani, M., Banerjee, K. 2008. Management of Mites on Grape. Extension Folder, 15, National Research Centre for Grape, (ICAR), Manji Farm, Pune, Maharashtra, p.2, India.
- Kustutan, O., Cakmak, I., 2009. Development, fecundity, and prey consumption of *Neoseiulus californicus* (McGregor) fed *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 33: 19-28.
- Lahai, M.T., Ekanayake, I.J., George, J.B. 2003. Leaf chlorophyll content and tuberous root yield of cassava in inland valley. **African Crop Science Journal**, 11: 107-117.
- LeOra Software, 1994. POLO-PC: a User's Guide to Probit or Logit Analysis. LeOra Software, 28 p., Berkeley, CA.

- Lewis, E.E., Hazir, S., Hodson., Gulcu, B. 2015. Trophic relationships of entomopathogenic nematodes in agricultural habitats. In: Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests (Campos-Herrera, R., Ed), Springer International Publishing, pp. 137-163, Switzerland.
- McInerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R.J., Lutz, M.E., White, A.H. 1991. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotics activity. **Journal of Natural Products**, 54: 774-784.
- Migeon, A., Dorkeld, F. 2020. Spider Mites Web: A Comprehensive Database for the Tetranychidae. <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb> (Erişim tarihi: 15 Aralık 2020).
- Mota-Sanchez, D., Wise, J.C. 2021. The Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. Erişim (<http://www.pesticideresistance.org>)
- Namsena, P., Bussaman, P., Rattanasena, P. 2016. Bioformulation of *Xenorhabdus stockiae* PB09 for controlling mushroom mite, *Luciaphorus perniciosus* Rack. **Bioresources and Bioprocessing**, 3(1): 19.
- Nermut, J., Zemek, R., Mracek, Z., Palevsky, E., Puza, V., 2019. Entomopathogenic nematodes as natural enemies for control of *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae)? **Biological Control**, 128: 102-110.
- Örenlili Yaylagül, E., Ülger, C. 2020. The effect of Baicalein on Wnt/ β -Catenin pathway and MiR-25 expression in Saos-2 Osteosarcoma cell line. **Turkish Journal of Medical Sciences**, 50(4):1168–79.
- Park, D., Ciezki, K., Hoeven, R., Singh, S., Reimer, D., Bode, H.B., Forst, S. 2009. Genetic analysis of Xenocoumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. **Molecular Microbiology**, 73(5): 938-949.
- Poinar, Jr. G., Poinar, R. 1998. Parasites and pathogens of mites. **Annual Review of Entomology**, 43: 449-469.
- Raja, R.K., Arun, A., Touray, M., Gulsen, S.H., Cimen, H., Gulcu, B., Hazir, C., Aiswarya, D., Ulug, D., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, H., 2021. Antagonists and defence mechanisms of entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria. **Biological Control**, 152: 104452.

- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A.O., Bode, H.B. 2009. A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. **Chembiochem**, 13: 224-230.
- Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T., Lee, B. J. 2012. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, 17(10): 12276-12286.
- Sobanboa, S., Bussaman, P., Chandrapatya, A. 2009. Efficacy of *Xenorhabdus* sp. (X1) as biocontrol against for controlling mushroom mites (*Luciaphorus* sp.). **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, 2(Special Issue): 145-154.
- SPSS, 2011. SPSS v.20.0 for Mac. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
- Tobias, N.J., Wolff, H., Djahanschiri, B., Grundmann, F., Kronenwerth, M., Shi, Y.M., Simonyi, S., Grün, P., Shapiro-Ilan, D., Pidot, S.J., Stinear, T.P., Ebersberger, I., Bode, H.B. 2017. Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. **Nature Microbiology**, 2: 1676-1685.
- Ulug, D., Hazir, S., Kaya, H.K., Lewis, E., 2014. Natural enemies of natural enemies: the potential top-down impact of predators on entomopathogenic nematode populations. **Ecological Entomology**, 39(4): 462-469.
- Webster, J.M., Chen, G., Hu, K., Li, J. 2002. Bacterial metabolites. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R., Ed.), CABI Publishing, pp. 99-114, Wallingford, UK.
- Wu, S., Guo, J., Xing, Z., Gao, Y., Xu, X., Lei, Z., 2018. Comparison of mechanical properties for mite cuticles in understanding passive defense of phytoseiid mite against fungal infection. **Materials and Design**, 140: 241-248.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze İNCEDAYI

Doğum Yeri Ve Tarihi :

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Bildiriler

-
-
-

İLETİŞİM

E-Posta Adresi :

Tarih : 23/02/2021