

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***RHIZOPHAGUS GRANDIS* (COLEOPTERA, RHIZOPHAGIDAE)'TEN bir
ENTOMOPATOJENİK MICROSPORIDIUM'UN İLK KAYDI VE TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiçek AYDIN

AĞUSTOS 2008

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***RHIZOPHAGUS GRANDIS* (COLEOPTERA, RHIZOPHAGIDAE)'TEN BİR
ENTOMOPATOJENİK MICROSPORIDIUM'UN İLK KAYDI VE TANIMLANMASI**

Çiçek AYDIN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.07.2008

Tezin Savunma Tarihi : 04.08.2008

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bilal KUTRUP

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ertuğrul SESLİ

Enstitü Müdür Vekili : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2008

ÖNSÖZ

“*Rhizophagus grandis* (Coleoptera, Rhizophagidae)’ten Bir Entomopatojenik Microsporidium’un İlk Kaydı ve Tanımlanması” adlı bu tez çalışması Türkiye ve tüm dünya için *R. grandis*’ten ilk defa bir microsporidian patojeni teşhisi ve tanımlanmasını içermesi nedeniyle bir ilktir. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda, bu çalışma ile birlikte edinilen tecrübelerin, bilimsel eksiklik ve hataların tamamlanıp düzeltilmesine yardımcı olacağını ümit ediyorum.

Tez süresince yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında beni yönlendiren ve bana olan güvenini her fırsatta hissettirerek, desteğini esirgemeyen, Almanya’da yaptığı elektron mikroskobu çalışmaları sayesinde bu tezi mümkün kılan, sayın hocam Doç. Dr. Mustafa YAMAN’a, tez çalışmaları sırasında her konuda yardımlaştığım çalışma arkadaşlarım Onur TOSUN, Nejla ÖZCAN ve Hilal BAKİ’ye, tür teşhisi ve tanımlanması sırasında engin bilgilerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Jaroslav WEISER’e, elektron mikroskobu çalışmalarının yapılabilmesine imkân sağlayan aynı zamanda tez çalışmalarına engin bilgileriyle katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Renata RADEK’e, çalışma için proje olarak maddi destek sağlayan TUBİTAK’a (Proje no: 107T166) ve son olarak çalışmalarım sırasında büyük fedakârlıklarda bulunan ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çiçek AYDIN

Trabzon 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. <i>Rhizophagus grandis</i> 'in Tanımı ve Önemi.....	1
1.1.1.1. <i>R. grandis</i> 'in Üretimi ve Maliyeti.....	3
1.1.1.2. <i>R. grandis</i> 'in Biyolojik Mücadelede Kullanımı.....	9
1.1.2. <i>R. grandis</i> 'in Biyolojisini Etkileyen Faktörler.....	11
1.1.3. Faydalı Böceklerde İstenmeyen Enfeksiyonlar.....	13
1.1.3.1. <i>Apis mellifera</i> 'da Microsporidian Enfeksiyonu.....	13
1.1.3.2. <i>Bombyx mori</i> 'de Microsporidian Enfeksiyonu.....	14
1.1.3.3. <i>Hippodamia convergens</i> 'te Microsporidian Enfeksiyonu.....	15
1.1.4. <i>R. grandis</i> 'in Üretimini Olumsuz Etkileyen İstenmeyen Enfeksiyonlar.....	16
1.1.5. Microsporidian Patojenlerinin Biyolojisi.....	16
1.1.5.1. Microsporidian Sitolojisi ve Gelişiminin Temelleri.....	16
1.1.5.1.1. Spor.....	17
1.1.5.1.2. Polar Filament Çıkarma ve Enfeksiyon.....	19
1.1.5.1.3. Çoğalma.....	19
1.1.5.1.4. Çekirdek Bölünmesi ve Eşeyssel İşlemler.....	20
1.1.5.1.5. Gelişim Döngüleri.....	21
1.1.5.1.6. Spor Öncesi Dönemlerin Sitolojisi.....	23
1.1.5.2. Microsporidian Patojenlerinin Elektron Mikroskopundaki Yapısı ve Taksonomisi.....	24
1.1.5.2.1. Ekzospor.....	24

1.1.5.2.2.	Polaroplast.....	26
1.1.5.2.3.	Polar Filament.....	27
1.1.5.2.4.	Sporofor Kesesi.....	29
1.2.	Tezin Amacı.....	32
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	33
2.1.	Böceklerin Elde Edilmesi.....	33
2.2.	Makroskobik İncelemeler.....	33
2.3.	Mikroskobik İncelemeler.....	34
2.3.1.	Işık Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar.....	34
2.3.1.1.	Taze Preparatların Hazırlanması ve İncelenmesi.....	34
2.3.1.2.	Microsporidian Patojeninin Giemsa ile Boyanması.....	35
2.3.2.	Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar.....	35
2.3.2.1.	Diseksiyon ve Fiksasyon.....	35
2.3.2.2.	Dehidrasyon.....	36
2.3.2.3.	İnfiltrasyon ve Gömme.....	36
2.3.2.4.	Microsporidian Patojeninin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	<i>R. grandis</i> 'te Microsporidian Enfeksiyonunun Belirlenmesi.....	38
3.2.	Microsporidian Enfeksiyonunun Makroskobik Görünümü.....	38
3.3.	Microsporidian Enfeksiyonunun Mikroskobik Olarak Belirlenmesi.....	39
3.3.1.	Işık Mikroskobu Çalışmaları.....	39
3.3.2.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Çalışmaları.....	40
4.	TARTIŞMA.....	44
4.1.	Taksonomi.....	46
5.	SONUÇLAR.....	49
6.	ÖNERİLER.....	50
7.	KAYNAKLAR.....	51
	ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÖZET

Rhizophagus grandis Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae), Türkiye’de ve Avrupa’da biyolojik mücadele amacıyla kitle üretimi yapılan ve *Dendroctonus micans* Kug. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) salgınlarına karşı kullanılan bir predatördür. Üretim laboratuvarlarında başarıyı düşürebilecek enfeksiyonların araştırılarak tür seviyesinde tespiti olası hastalıklara karşı önlem almak adına çok önemlidir. Bu amaçla laboratuvarlardan ve araziden alınan toplam 2963 adet *R. grandis* ergini ve larvası ışık mikroskobu ile detaylı olarak incelendi. Çalışmalar sırasında Artvin ve Trabzon illerindeki laboratuvarlardan alınan predatör böceklerde enfeksiyona yol açan bir microsporidium türüne rastlandı. Patojene ait sporların oval şekilli ve 4.25 ± 0.23 (3.53 – 4.77) μm (n = 165) x 2.40 ± 0.17 (1.98 – 2.9) μm (n = 183) ebatlarında olduğu tespit edildi. Bulunan patojenin elektron mikroskobu ile detaylı yapısı çalışıldı. Tür teşhisinde kullanılan kriterler göz önünde bulundurularak elde edilen veriler ışığında microsporidium türünün karakterizasyonu yapıldı. Bu çalışmada bulunan patojen diğer kabuk böceklerinde bu güne kadar bulunan microsporidium türleri ile karşılaştırıldı. *R. grandis*’te enfeksiyona neden olan microsporidian patojeninin yeni bir tür olduğu sonucuna varıldı. Sonuçta literatüre göre taksonomisi yapılan yeni microsporidian patojeni için *Canningia rhizophagi* sp. n. binomeni önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: microsporidia, *Rhizophagus grandis*, *Canningia*, kabuk böcekleri, *Dendroctonus micans*.

SUMMARY

First Report and Description of an Entomopathogenic Microsporidium from *Rhizophagus grandis* (Coleoptera, Rhizophagidae)

Rhizophagus grandis Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae) is a predator beetle mass-reared for biological control and used against *Dendroctonus micans* Kug. (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) outbreaks in Turkey and Europe. It is very important to study possible infections, which could decrease success in the mass-rearing laboratories, at species level in order to take precautions against diseases. To reach this goal, a total of 2963 *R. grandis* adults and larvae were examined thoroughly using a light microscope. During light microscopical studies a microsporidian pathogen infecting the predator beetles from two of the laboratories in Trabzon and Artvin provinces was discovered. The spores of the pathogen are oval and measured as 4.25 ± 0.23 (3.53 – 4.77) μm (n = 165) in length and 2.40 ± 0.17 (1.98 – 2.9) μm (n = 183) in width. The detailed morphology of the pathogen was studied under the electron microscope. Taking into consideration the characteristics used in species description, the microsporidian pathogen was characterized using the data obtained from light and electron microscopical examinations. The pathogen found in this study was compared to other microsporidian species isolated from different bark beetles. We concluded that the microsporidian pathogen infecting *R. grandis* is a new species. Finally, the taxonomy of the new microsporidian species is studied according to the literature and the name *Canningia rhizophagi* n. sp. is proposed for the new microsporidian infecting *R. grandis* in Turkey.

Key Words: microsporidia, *Rhizophagus grandis*, *Canningia*, bark beetles, *Dendroctonus micans*.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. <i>Rhizophagus grandis</i>	1
Şekil 2. <i>Dendroctonus micans</i>	2
Şekil 3. Maçka Hıdırnebi yaylasındaki bir ladin ağacında <i>D. micans</i>	2
Şekil 4. Maçka'daki <i>R. grandis</i> üretim laboratuvarı.....	3
Şekil 5. <i>R. grandis</i> üretim aşamaları.....	4
Şekil 6. Şekil çeşitliliğini göstermek için microsporidian sporlarının şematik görünümü	17
Şekil 7. Hücre bölünme şekilleri.....	20
Şekil 8. Microsporidian gelişim döngülerinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 9. Microsporidian sporlarının taze preparatlarının ışık mikroskobu fotoğrafları.....	39
Şekil 10. Giemsa boyalı microsporidian sporlarının ışık mikroskobu fotoğrafları.....	40
Şekil 11. Microsporidian sporlarının elektron mikroskobu fotoğrafları 1.....	42
Şekil 12. Microsporidian sporlarının elektron mikroskobu fotoğrafları 2.....	43

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kabuk böceklerini enfekte eden bazı tek çekirdekli microsporidian türleri.....46

SEMBOLLER DİZİNİ

BTB	: Black Turpentine Beetle (Siyah Terebentin Böceği)
SPB	: Southern Pine Beetle (Güney Çam Böceği)
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu

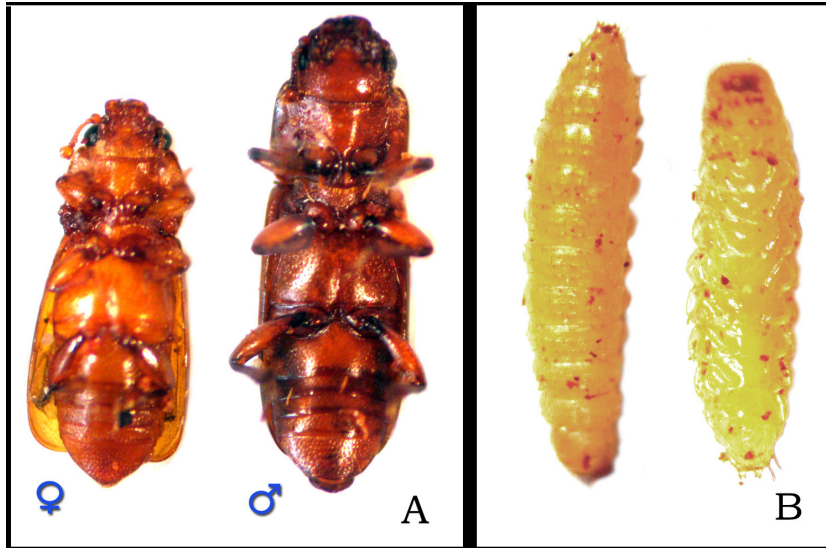
1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Ormanlar ve ülke ekonomisi için ciddi bir tehdit oluşturan dev kabuk böceği *Dendroctonus micans* Kug. ile mücadele için, Türkiye’de ve salgın yaptığı diğer ülkelerde de predatörü *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae)’ten yararlanılmaktadır. Bu predatör böcek konağa özgü ve etkin bir avcı olduğu için, kabuk böcekleriyle mücadelede oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Predatör böcekte oluşabilecek herhangi bir hastalık bu başarıyı tehdit edebileceğinden böyle bir hastalık etmeninin bulunması ve tanımlanması, gerekli önlemlerin alınması açısından çok önemlidir. Bu yüksek lisans tezi bu tür hastalık etmenlerinin bulunup tanımlanmasıyla ilgilidir.

1.1.1 *Rhizophagus grandis*’in Tanımı ve Önemi

R. grandis erginleri 2.5-5 mm boylarında kıvılcımlı kahverengi uzun ince bir gövdeye sahip kınkanatlı böceklerdir (Şekil 1A). Larvaları uzun ince, uçlarda sivrilen, son instarda 5-8 mm boylarına kadar ulaşabilen, kirli beyaz renkte, yumuşak bir gövde yapısına sahiptir (Şekil 1B).

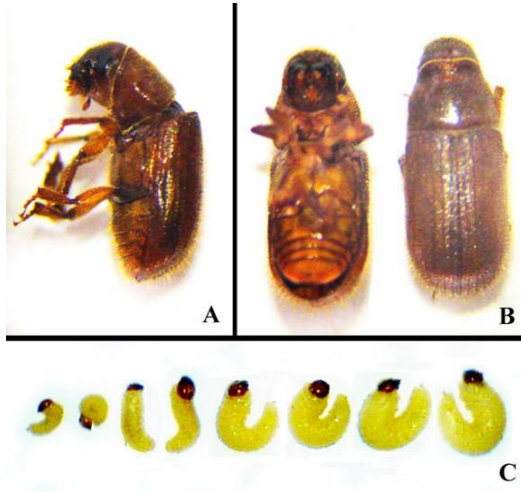


Şekil 1. *Rhizophagus grandis* A. Ergin dişi ve erkek. B. Larva üstten ve alttan görünüm.

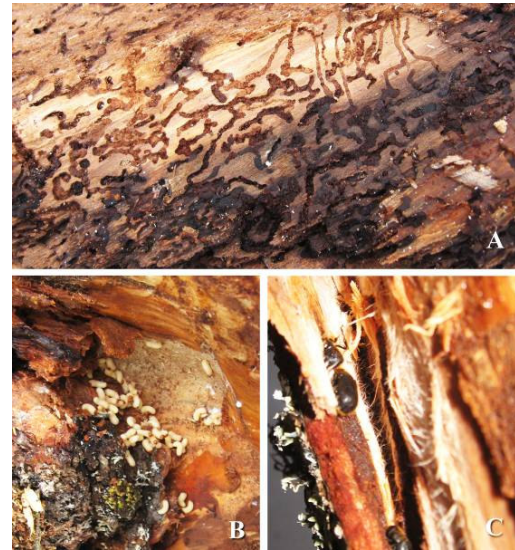
Dişi ve erkek böcekler arasında çıplak gözle görülebilir belirgin bir fark yoktur ancak 10x-45x büyütmede dişilerin abdomenlerinin uç kısmında belirgin bir sivrilme ve erkeklerin düz abdomen uçlarında dişilerde olmayan bir çıkıntı (aedeagus) göze çarpar. Ergin böcekler yaşlandıkça renkleri koyulaşır.

R. grandis ladin ormanlarına büyük ölçüde zarar veren dev kabuk böceği *D. micans*'ın (Şekil 2) etkin bir predatörüdür. Bu zararlı böcekler kabuk altında galerilerini oluşturmak, burada beslenip büyüme ve olgunlaştıklarında delikler oluşturarak kabuktan dışarı çıkmak suretiyle ağaçlara zarar vermektedir (Şekil 3). Bu şekilde *D. micans* salgını yaptığı bölgelerde ağaçları kurutmaktadır.

Hem konak hem de predatörün dağılımı şu an itibarıyla Sibirya'nın doğusundan batıya doğru Fransa ve İngiltere'ye, güneyde Türkiye'ye ve kuzey uçta ise Norveç'e uzanmaktadır (Bevan ve King, 1983). *D. micans* bu geniş arazi içindeki tek *Dendroctonus* türüdür. Palearctic Ladin ormanlarında, *R. grandis*'in sadece *D. micans* ile ilişkili olduğu, başka scolytid'lere saldırdığına dair hiç bir kayıt olmadığı bilinmektedir.



Şekil 2. *Dendroctonus micans*. A. Ergin yandan görünüm B. Ergin üstten ve alttan görünüm. C. İstarlarına göre küçükten büyüğe sıralanmış larvalar.



Şekil 3. Maçka Hıdırnebi yaylasındaki bir ladin ağacında *D. micans* A. *D. micans* galerileri. B. Larvalar toplu halde beslenirken. C. Ergin *D. micans*'lar.

Ancak bu durum belki de Avrasya'da predatörün doğal menziline başka herhangi bir *Dendroctonus* türü bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Yakın geçmişte, *D. micans* ana vatanı olan Sibirya'dan batıya doğru yayılmıştır (Fielding ve Evans, 1997). Geçen 100 yılda *D. micans* popülasyonlarında görülen patlamalar böceğin Avrupa'yı istila ettiği süre boyunca yayılımı ile çakışmalar göstermiştir (Carle, 1975). Anlaşıldığı kadarıyla *D. micans* popülasyonlarındaki bu patlamalar predatör, *R. grandis* geçici bir süre için etkinliğini kaybettiği zamanlarda meydana gelmiştir, ancak predatör-av dengesi sağlandığında, *D. micans* yeniden endemik hale gelmiştir (Fielding ve Evans, 1997). *D. micans*'ın, yayıldığı bölgelerin iç kısımlarında düşük ve zararsız bir popülasyon düzeyinde kaldığı bilinmekte (Grégoire, 1988) ve bunun en önemli nedeni olarak türün özgün predatörü *R. grandis* gösterilmektedir (Grégoire vd., 1989).

1.1.1.1. *R. grandis*'in Üretimi ve Maliyeti

Avrupa'daki denemeler araziye verilmek üzere çok sayıda *R. grandis*'in ladin kütükleri içindeki *D. micans* sürüleri ile beslenerek yapay veya yarı yapay olarak üretilebileceğini göstermiştir (Grégoire vd., 1986). Bu metot ilk olarak Rusya'da (Khobakhidze vd., 1968) geliştirilmiştir daha sonra Grégoire vd. (1986) tarafından kütük kullanmama, çok az miktarda *D. micans* larvası kullanma gibi gereksinimlere göre uyarlanmıştır. Ülkemizde de kütüklerin kullanıldığı bu ilk metot geçerlidir. *R. grandis*'in kitle üretimi ülkemizdeki laboratuvarlarda *D. micans* erginlerinden ve larvalarından üretim olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir.



Şekil 4. Maçka'daki *R. grandis* üretim laboratuvarı

Öncelikle üretimde kullanılacak laboratuvarlar, araç gereçler ve kum dezenfekte edilir. Laboratuvarlardaki yüzeyler, ışık, havalandırma, nem ve ısı gibi koşullar düzenlenir. 2 ve 3. instarda *D. micans* larvaları ormandan toplanır. *R. grandis* erginlerinin de 4-5 mm arasında olanları ormandan toplanır. Ormandan ayrıca *D. micans* galerilerinin bulunduğu yaş ladin ağaçları alınıp 35-40 cm boyunda parçalara ayrılır. Bu kütüklerin bir yüzüne karşılıklı iki kanal açılır (Şekil 5, 1).



Şekil 5. *R. grandis* üretim aşamaları 1. Kütükte oyuklar açılarak larvaların yerleştirilmesi. 2. Açılan oyukların pamukla kapatılıp kütüğün açıkta kalan yüzeyine parafin sürülmesi. 3. Kütükte üçgen şeklinde kapaklar açılması. 4. *R. grandis* dişi ve erkek erginlerinin kütüğe verilmesi. 5. Açılan kapağın macun ile kapatılması. 6. Kütüğün nemli kum içeren leğene konularak uygun koşullarda raflara yerleştirilmesi.

Bu kanallara 400-1000 kadar *D. micans* larvası verilir ve kanallar pamuk ile doldurulur. Kütüğün kanallı yüzü ve olası çatlakları parafin ile kapatılır (Şekil 5, 2). Diğer yüzü altta kalacak şekilde nemli kum ile dolu leğen içine konulan kütüklere *R. grandis* erginleri 3-7 günlük yerleşme süresi sonunda kabukta üçgen şeklinde kapaklar açılarak çiftler halinde (2 dişi, 1 erkek) verilir (Şekil 5, 3). *R. grandis* erginlerinin erkek ve dişileri önceden ayrılarak,

iki ayrı kapta beslenmeleri ve cinsel güce erişmeleri sağlanır. Erginler üretim kütüklerine verilmeye kadar saklama kaplarında buzdolabında 4°C’de latens halde saklanırlar. Üretim kütüklerine verilecek erginler, 2-3 saat önceden buzdolabından çıkarılarak 20-22°C’de bekletildikten sonra çiftler halinde üretim kütüklerine verilirler (Şekil 5, 4). Açılan kapaklar tekrar kapatılır ve macunla iyice sıvanır (Şekil 5, 5). *R. grandis* erginleri kütükte bir hafta içinde çiftleşerek yumurta bırakırlar. Bir haftanın sonunda yumurtadan çıkan *R. grandis* larvaları kütükte, 22-30 gün boyunca *D. micans* larvaları ile son instara kadar beslenirler. Prepupa safhasındaki larvalar pupa safhasına geçmek için kütüğün altındaki nemli kuma inmeye başlarlar. Kumda pupa safhasına giren larvalar 7-10 günlük diyapoz döneminden sonra pupa safhasına geçerler. 10-15 günlük bir pupa safhasından sonra genç ergin haline gelen *R. grandis*’lerin tamamen erginleşmesi beklenir. Toplamda 65 gün sonra ergin hale gelen böcekler kumdan seçilir. Larva öğüntüsü veya ladin talaşı, 1x1, 2x2, 2x3 cm ebadında yaş ladin kabuğu ve *D. micans* larvaları, pupaları veya yumurtaları konulmuş cam beslenme kaplarına aktarılan larva ve ergin *R. grandis*’ler 4-5 gün süreyle olgunluk beslenmesine bırakılırlar. Yırtıcılar bu süre sonunda ormana verilene kadar beslenme kapları ile birlikte 4°C’de latens halde saklamak için buzdolabına konulur, ormana verilecek erginler ve larvalar taşıma kapları ile böcekli sahalara götürülerek *D. micans* yuvalarına verilirler (Göktürk, 2007).

Erginden üretim metodunda ise 40-60 cm boyunda ağacın üç kısımlarına denk gelen kütük parçaları kullanılır. Ormandan toplanan *D. micans* erginleri kabukta üçgen şeklinde kapaklar açılarak film kutuları yardımıyla kütüklere verilir. Kapaklar tekrar kapatılıp macunla sıvanır, nem kaybını önlemek için kütüğün üstte kalan kısmı ve olası çatlakları da parafinle kapatılır. *D. micans* erginleri yerleşip yumurta bırakırlar, yumurtadan çıkan larvalar bir ay kadar beslendikten sonra *R. grandis* erginleri *D. micans* galerilerinin olduğu yerden yine kapak açma yöntemiyle verilir. Bundan sonra larvadan üretim metodundaki gibi devam edilir. Larvadan üretim metodunun süresi ortalama 67 gündür, erginden üretim metodunun süresi ise 90-97 güne kadar çıkmaktadır. Süre uzamasına rağmen erginden üretim yöntemiyle çok iyi sonuç alınmaktadır. Uygulamalara göre yılda iki kez üretim yapılacaksa, birinci üretimin larvadan, ikinci üretimin ise erginden yapılması daha verimli sonuçlar vermektedir (Göktürk, 2007).

R. grandis üretiminin daha verimli hale getirilmesi için, İngiltere’de ve Amerika’da denenilen ve geliştirilen yöntemler ve uygulamalardan elde edilen tecrübeler mutlaka değerlendirilmelidir. Bu nedenle aşağıda bu uygulamalar detaylı bir şekilde verilmektedir.

İngiltere’de ilk *R. grandis* üretimi Khobakhidze vd. (1970) ve Grégoire vd. (1984b) tarafından anlatılan yöntem ile yapılmıştır ve *D. micans* larvalarını beslemek için ladin kütüğü parçaları kullanılmıştır. Ergin *D. micans*’lar taze kesilmiş kütüklere yerleştirilmiştir. Ayarlanmış şartlar altında (sıcaklık $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, göreceli nem 65-75% ve 18-saatlik gün uzunluğu) *D. micans*’ın ilk yerleştirilmesinden iki ila üçüncü instar larvaların gelişmesine kadar 35-45 günlük bir süre gerekmektedir. Araziden toplanmış larvalar da Kobakhidze vd. (1970)’nin anlattığı şekilde ladin kütüklerine monte edilmiştir. Ergin dişi/erkek *R. grandis* çiftleri, küçük üçgen şeklinde bir kabuk parçası kaldırılarak, doğrudan *D. micans* larvalarının üstüne bırakılmıştır. Üçgen şeklindeki kabuk parçası tekrar yerine konup yapıştırılmıştır ve kütükler geniş plastik huniler içerisinde, çelik ızgara platformlar üzerine dikey olarak konduktan sonra, 25-27 gün süreyle kuluçkaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda yumurtadan çıkarak beslenen *R. grandis* larvaları üç kez gömlek değiştirdikten sonra prepupa haline gelerek hunilerin içine ve oradan da plastik tepsiler içine düşmüşlerdir, bu tepsilerden günde iki defa prapupalar alınmıştır. Prepupalar 40 gün süreyle kapalı kaplarda, nemli, steril turba/kum karışımı içinde, ergin hale geçip kozadan çıkana kadar kuluçkaya yatırılmıştır. *R. grandis* erginleri sayılmış, cinsiyet ayrımı yapılmış ve nemli kum içeren Petri kaplarında 4°C ’de saklanmıştır. Ergin predatörler bu şartlar altında bariz bir olumsuz etki olmaksızın altı aya kadar dayanabilirler. 1985’te İngiltere Ormancılık Komisyonu *R. grandis* erginlerini bu yöntemle, işçilik ve malzemeler de dâhil, böcek başına yaklaşık 2,5\$’a yetiştirmişlerdir (Moser, 1989).

Bu üretim sisteminde *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) adlı entomopatojenik mantarın varlığı ciddi bir sorun teşkil etmektedir. Hastalık ilk olarak 1983 Ağustos’unda *D. micans* üretim sürüsünde ortaya çıkmıştır ve kuluçkadaki *R. grandis* pupa ve erginlerinde %80’e varan ölüm oranıyla sonuçlanmıştır. Ana üretim programında hem *D. micans* erginlerinde hem de *R. grandis* pupa/erginlerinde zaman zaman toplu katliamlara neden olması nedeniyle sabit bir sorun olarak önemini korumaktadır. Her iki böcek türünde de *B. bassiana* kaynaklı ölümleri azaltma girişiminde üç fungusit (thiabendazole (TBZ), benomyl (Benlate R) ve carbendazim) denenmiştir. Sonuçlar bir miktar iyileşme olduğunu göstermiştir ancak istatistiksel olarak kayda değer olmamıştır (Fielding ve Evans, 1997). 1985 sonu 1986 başı itibariyle sıkı hijyenik koşullar hastalığın meydana gelme oranını oldukça düşürmüştür ancak yöntemin çok daha titiz bir uzmanlıkla uygulanması gerektiğinden, 1986’da yöntemin yeniden gözden geçirilmesi gündeme gelmiştir. Grégoire vd. (1986) tarafından betimlendiği gibi, *D. micans* larvaları ve ladin kabuğu tozu içeren kaplar içinde *R. grandis* ovipozisyonunu uyarmayı kapsayan, alternatif bir *R. grandis* yetiştirme yöntemi değerlendirilmiş ve

benimsenmiştir. Bu yöntemde genç *R. grandis* larvaları yumurtadan çıktıklarında başka kaplara aktarılmış ve olgunlaşana kadar alternatif böceklerle beslenmiştir. 1986'da sistemde modifikasyonlar geliştirilip uygulanmış ve başarılı olmuştur. Geceleri üretim ünitelerinde ultraviyole ışıklandırma uygulamasının başlatılması, mantar sporlarını öldürmek suretiyle, hastalığın ortaya çıkma oranını azaltmıştır.

1986 yılından itibaren İngiltere'de kullanılmakta olan 'kutu-üretim' sistemi aşağıdaki prosedürü takip etmektedir. Dairesel şeffaf polistren kaplar (50 × 25 mm) yarıya kadar, nemlendirilmiş ve kalın öğütülmüş ladin kabuğu ile doldurulur. 20 tane kadar iki ila dördüncü instar *D. micans* larvası ve iki dişi bir erkek ergin *R. grandis* eklenip dikdörtgen şeklinde kesilmiş taze ladin kabuğu ile kambiyum tarafı aşağı gelecek şekilde kapatılır. Kutunun kapağı kapatılıp 20°C 'de karanlıkta 20 gün süreyle bekletilir. Bu sürenin sonunda beş adet ovipozisyon kabının içeriği daha büyük bir polistren kaba (17.5 × 11.5 × 6 cm) boşaltılır ve bundan sonra *R. grandis* larvaları -20°C'de saklanmış ölü *Calliphora* sp. (*Calliphoridae*) larvaları ile beslenirler. Bu kutular alçıdan bir dış 'duvara' sahiptir. 25 gün sonra prepupalar bu 'duvara' tırmanır ve günlük olarak toplanırlar. Toplanan prepupalar beyaz kum içeren benzer kutularda 40 gün süreyle tamamı ergin hale gelene kadar kuluçkaya bırakılırlar. Bu kutulara 0.2 ml α -pinene eklenmesi *B. bassiana* hastalığına yakalanma oranını neredeyse yok etmektedir (Fielding ve Evans, 1997). *R. grandis* erginleri beyaz kumdan su ve elek yardımıyla ayrılırlar. Dişi *R. grandis* başına elde edilen yavru sayısı (0-70 aralığında) değişken olmasına rağmen kütükle üretim yöntemine göre artış göstermiştir. Bu yöntem aynı zamanda yer, *D. micans* larvası ve kütük ihtiyacını azaltması ve hastalığa karşı daha fazla kontrol sağlaması gibi büyük avantajlara sahiptir (Fielding ve Evans, 1997). Her bir ovipozisyon kutusu ile 80'e kadar *R. grandis* düzenli olarak üretilmektedir ancak bu sayı α -pinene veya sentetik ovipozisyon uyararı eklenerek artırılabilir (Grégoire vd., 1991). *D. micans* larva ihtiyacı bir süreliğine *Calliphora* sp. larvası ve eşit miktarlarda camphor (rasemik), (-)-fenchone, terpinen-4-ol (rasemik), (-)- α -fenchol, borneol, (S.vt)-(-)-verbenone ve pentane içeren bir ovipozisyon uyararı kullanılarak ortadan kaldırılabilir (Grégoire vd., 1991). Ancak bu yöntem tek başına kullanılamaz çünkü sadece bir veya iki nesil için işe yaramaktadır (Fielding ve Evans, 1997). *R. grandis* üretimi normal koşullarda yavaş ilerlemektedir ancak ihtiyaç olduğunda dört ay içinde çok sayıda böceğin üretilmesi mümkündür, böylelikle bu yöntemle predatör yeni keşfedilen *D. micans* salgını alanlarına çabucak verilebilir (Fielding ve Evans, 1997).

Amerika'da *R. grandis*'i *Dendroctonus terebrans* Olivier (BTB) ve *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (SPB) üzerinde üretme metotlarını denemek üzere Louisiana'daki

Alexandria Orman Merkezi'nde bir proje gerçekleştirilmiştir (Moser, 1989). Bu proje için 20 derecelik bir sabit sıcaklık, %65–75 R. H. nem ve günde 18 saatlik bir yapay ışıklandırma rejiminden oluşan koşullar yetiştirme odalarında uygulanmıştır (Evans, 1985). 1986 ve 1987 yıllarında J-C. Grégoire tarafından Belçika'da yetiştirilmiş *R. grandis* çiftleri BTB ve SPB üzerinde üretim metodlarını denemek üzere Louisiana'daki Alexandria Orman Merkezi'ne getirilmiştir. Her ne kadar ön denemeler predatörün BTB üzerinde hem kütük hem de yarı yapay metot kullanılarak yetiştirilebildiğini gösterse de ikinci metot tercih edilmiştir, çünkü kütük kullanmak çok iş gücü gerektirmektedir. Bahsedilen projenin birincil amacı *R. grandis* yumurtaları elde etmek ve White's solüsyonu (Barras, 1972) kullanarak yüzeylerini sterilize etmektir, böylelikle Avrupa'dan mikroorganizmaların gelmesi engellenecektir. *R. grandis*'ler yaklaşık 20 kadar BTB larvası aşılınmış ve bir erkek iki dişi *R. grandis* eklenmiş (ikinci dişi yumurta sayısını artırmak için konulmaktadır) kütük sandviçleri içinde yumurtlamaya bırakılmıştır. Genç BTB larvaları *D. micans*'inkilere benzer bir şekilde toplu halde beslenirler ancak daha yaşlı larvalar yalnız kalmayı tercih ederler. Dişilerin her biri sandviç başına en fazla 133 yumurta bırakmışlardır. 5 ila 8 gün sonra sandviçler açılmıştır ve kolaylıkla görülebilen yumurtalar toplanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra yumurtalar polistiren kutulara konularak yumurtadan çıkan larvalar Grégoire vd. (1986) tarafından anlatılan alternatif besinlerle beslenmişlerdir (Moser, 1989). *R. grandis* larvaları sandviçlerin içinde toplu halde BTB larvalarıyla beslenebilmektedirler. Bunun yanı sıra predatör larvaları (ve erginleri) daha kolay bulunabilen dondurulmuş diptera kurtçukları ve hatta ticari kedi maması da dâhil çeşitli besinlerle de beslenebilirler. Prepupalar Grégoire vd. (1986) tarafından anlatılan tekniğe göre pupa haline geçmeleri için nemli kum üzerine bırakılmaktadır. Her ne kadar *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Avrupa'da *D. micans* ve *R. grandis* sürülerinde büyük üretim kayıplarına yol açıyorsa da, Alexandria Orman merkezinde uygulanan bu ilk projede bir başka patojen [muhtemelen *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin] kısa zamanda hem konak hem de predatör larvalarında %100 kayba neden olmuştur. Hastalık daha sonraki üretimlerde polistiren kutuların içine konulan 400 g kabuk tozuna her birinden 0.5 g olmak üzere sorbik asit ve metil paraben karıştırılarak kontrol altına alınmıştır (Moser, 1989).

İngiltere ve Amerika'da uygulanan kutu-üretim yöntemlerinin avantajları barizdir. Özellikle hastalıklara karşı kolaylıkla önlem alınabilmesi çok önemlidir. Ülkemizde halen kütüklerin kullanıldığı fazla iş gücü ve titizlik gerektiren yöntemin yürürlükte olması muhtemelen enfeksiyonların çok görülmesinin en önemli sebeplerinden biridir.

1.1.1.2. *R. grandis*'in Biyolojik Mücadelede Kullanımı

Literatür taramaları ve Avrupalı bilim insanları ile iletişimler spesifik bir predatör böcek olan *R. grandis*'in Avrupa'da *D. micans* için kayda değer bir doğal popülasyon dengeleme ajanı olduğu izlenimini uyandırmaktadır (Kobakhidze vd., 1970; Bevan ve King, 1983). Avrasya menzili içinde *D. micans*'ın en önemli ve potansiyel olarak kullanışlı tek doğal düşmanı *R. grandis*'tir. Bu predatörün ilk kayda değer yapay üretimi ve salıverilmesi 1963'te Gürcistan Cumhuriyeti'nde başlamıştır ve geniş doğu ladini ormanlarında ciddi *D. micans* salgınlarını azaltmada etkin olduğu takdir edilerek halen sürmektedir (Kobakhidze vd., 1970). Benzer bir program 1983'te Fransa'da başlatılmıştır, Belçika'dan bilim insanları Fransız orman otoriteleri ile birlikte çalışarak çeşitli *D. micans* salgınlarının olduğu yerlere *R. grandis* uygulamışlardır (Grégoire vd., 1984a). Belçika'da, doğal olarak bulunan *R. grandis* popülasyonlarının *D. micans* popülasyonlarını düşük endemik seviyelerde tuttuğu, böylelikle ekonomik zararın sadece geniş Ardennes ormanlarında meydana geldiği düşünülmektedir (Grégoire, 1984). Ülkemizde de 1985 yılından itibaren Artvin, Giresun, Ordu ve Trabzon'da kurulmuş olan üretim laboratuvarlarında biyolojik mücadele yapılmaktadır. İngiltere, Fransa, Rusya ve Türkiye'nin bu scolytid'in hala salgın halinde bulunduğu belli bölgelerinde bu predatörü Ladin ormanlarına sunmak için büyük kapsamlı programlar halen yürürlüktedir (Grégoire vd., 1985). *D. micans*'ın 1982'de ilk defa keşfedildiği İngiltere'de çabalar özellikle yoğunudur (Bevan ve King, 1983). 1984'te İngiltere'nin *D. micans*'ın salgın olduğu bölgelerinde dağıtılmak üzere geniş üretim ünitelerinde 30.000 *R. grandis* ergini üretilmiştir (Evans, 1985). 1985'te Belçika'da 29.000 tanesi yetiştirilmiştir (Moser, 1989).

Bu böceğe karşı, Gürcistan'da 1963 yılında büyük boyutlu bir biyolojik mücadele programı uygulamaya konulmuştur (Khobakhidze, 1965). Bu program da zararlı böcek gibi komşumuz Gürcistan'dan ülkemize gelmiştir ve 1985 yılında başlatılan biyolojik mücadele çalışmalarına öncü olmuştur (Eroğlu, 1995). Bu çalışmalarda, ülkemizde çeşitli illerde kurulan laboratuvarlarda bugüne kadar yaklaşık 5.000.000 adet *R. grandis* üretilerek böcekli ağaçlara yerleştirilmiştir. Doğu Karadeniz Ladin ormanlarında muazzam tahribat yapan *D. micans* zararlısına karşı biyolojik mücadele, bu zararlıların yırtıcısı *R. grandis* türü böcekler laboratuvarlarda üretilmek suretiyle yapılmaktadır. Bu amaçla Artvin'de 1984 yılından itibaren 7 adet klimalı 4 adet geçici, Giresun'da 1991 yılından itibaren 1 adet klimalı 11 adet geçici, Trabzon'da ise 1998'den itibaren 2 laboratuvar kurulmuştur ve bu laboratuvarlarda halen üretim devam etmektedir (D.P.T., 2001). Bunlara ek olarak 1992–2001 yılları arasında Giresun'da 5 ve Ordu ilinde de 1 laboratuvar daha açıldı (URL 1, 2008). Giresun Orman Bölge

Müdürlüğü'nde de 70.000 ha'lık alanda etkili olan *D. micans* zararlısına karşı biyolojik mücadele çalışmaları başarı ile devam etmektedir. Trabzon'da da 1998 yılından itibaren Artvin ve Giresun'daki laboratuvarlarda üretilen *R. grandis*'lerden, nakletmek suretiyle *D. micans* ile biyolojik mücadele çalışmalarına başlanılmıştır. Şimdi Maçka ve Şalpazarı ilçelerindeki laboratuvarlarda üretilen predatör böcekler ile Trabzon ilinde halen 10.000 ha'lık alanda etkili olan bu zararlıya karşı mücadele sürmektedir.

Doğu Karadeniz Ladin ormanlarında *D. micans* ve *R. grandis* ile ilgili veriler incelendiğinde 1991 yılında Artvin bölgesinde ağaçların % 40'ından fazlasına *D. micans*'ın bulaştığı ve ormana verilen *R. grandis*'in ise zararlı böcek yuvalarının %26'sında bulunduğu tespit edilmiştir. 1997 yılında Artvin Ladin ormanlarındaki *D. micans*'ın ortalama yoğunluğu %29'a inerken, *R. grandis*'in ortalama yoğunluğu %59'a yükselmiştir. Ayrıca 1991 de hastalıklı bir Ladindeki ortalama *D. micans* faal yuva sayısı 1.5 iken 1997 yılında 0.4 olarak tespit edilmiştir (D.P.T., 2001). 1994 yılında *R. grandis*'in yoğun olarak verildiği Giresun-Kemerköprü ve Kulakkaya ormanlarında 40 bölmede Ormancılık özel ihtisas komisyonu tarafından yapılan yoğunluk sayımında 901 faal *D. micans* yuvasının 491'inde (%54) predatör böceğin varlığı tespit edilmiştir. Giresun ladin ormanlarında ise zararlı böceğin yuvasında *R. grandis* yoğunluğu 1995'te %36 iken 1997 yılında %48'e yükselmiştir. *D. micans*'ın bütün yayılış alanında yırtıcı böcek oranının %50'nin üzerine çıkması planlanmış ve mücadele hedefi olarak saptanmıştı. 1999 yılı itibariyle Artvin ve Giresun ormanlarında yırtıcı böcek (predatör) oranının %50 civarında ve hatta yer yer bu oranın da üzerinde olduğu bilinmektedir. Böylelikle yaklaşık 160.000 hektarlık Ladin ormanında zararlı böcek miktarının ekonomik zarar seviyesinin altına indirildiği düşünülmektedir (D.P.T., 2001).

Özcan vd. tarafından 2006'da gerçekleştirilen bir araştırmada Artvin, Trabzon ve Giresun'da toplam 33 deneme alanında *D. micans*'ın zarar durumu ve *R. grandis*'in etkinliği incelenmiştir. Bu alanlardaki yaralı ağaçların %88'inin *D. micans* tarafından istila edilmiş olduğu saptanmıştır. *R. grandis*, deneme alanlarının %42,4'ünde, *D. micans*'ın bulunduğu ağaçların %21,4'ünde ve galerilerin %16,2'sinde bulunmuştur. *R. grandis* ergin ve larvalarının, birlikte buldukları galerilerdeki *D. micans* bireyleri üzerinde etkinlikleri sırasıyla %100 ve %79 olarak bulunmuştur. *R. grandis*'in *D. micans* üzerindeki aktüel etkinliği bulunduğu galerilerde %84, bulunduğu deneme alanlarında %23,9 ve örnekleme alanlarının tamamında %15,4 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar Eroğlu, 1997'de sırasıyla %87, %31 ve %15 olarak verilmektedir (Özcan vd., 2006). Bu veriler ışığında *R. grandis*'in yıllara göre kayda değer bir değişiklik göstermeyen, bu nedenle güvenilir ve oldukça yüksek etkinliğe sahip bir biyolojik mücadele ajanı olduğu söylenebilir.

Deneyimler, predatörün salıverilmesinden birkaç yıl sonra, *D. micans* istilalarının mutlaka zararsız düşük seviyelere (saldırılan ağaçların %5-10'u) gerilediğini ve bu seviyelerde kaldığını bununla beraber *D. micans* kolonilerinin %60-80'inde *R. grandis*'in yerleşik hale geldiğini göstermektedir (Van Averbek ve Grégoire, 1995).

İngiltere'de, *R. grandis*'in yerleştirildiği 47 alanın 22'sinde (% 47) ergin ve larvalarına rastlandığı ve izleyen yıllarda üç alanda *D. micans* kuluçka sistemlerinin %34'ünde predatörün etkin olduğu ve ertesi yıl bu üç alanda bu oranın %68'e ulaştığı kaydedilmiştir (Fielding vd., 1991). Belçika'da, düşük *D. micans* yoğunluğunda, kuluçka odacıkları ortalama %60 oranında *R. grandis* tarafından işgal edilmiştir (Grégoire, 1988). Ülkemizde ise *D. micans*'in biyolojik mücadele çalışmalarında bugüne kadar üretilen yaklaşık 5.000.000 adet *R. grandis* toplam 120.000 ha alana salınmış ve bu alanda %15,4 oranında bir etkinlik sağlanabilmiştir (Özcan vd., 2006). Ülkemizde üretilip ormanlara verilen *R. grandis* sayıları bu kadar yüksek olmasına rağmen etkinliği İngiltere ve Belçika'daki oranlarla kıyaslandığında çok düşüktür. İngiltere ve Belçika'da daha az sayıda predatör böcek üretilmiş, daha yüksek başarılar sağlanmıştır. Bu durumun nedenleri arasında kullanılan üretim metodunun eksiklikleri, böceklerin ormanlara verilmiş yöntemlerindeki hataların yanı sıra biyolojik mücadelede kullanılmak üzere üretilip ormanlara verilen bu böceklerin hastalıklı olma ihtimalleri de söz konusudur. Üretim laboratuvarlarında hastalıklı böcekler üretilerek ormanlara verildiğinde doğal olarak biyolojik mücadelenin başarısı da azalmaktadır.

1.1.2. *R. grandis*'in Biyolojisini Etkileyen Faktörler

R. grandis'in Avrupa'daki biyolojik döngüsünü aşağıdaki gibi özetleyebiliriz. Yumurtlama dönemi genellikle Nisan ve Temmuz ayları arasında olmaktadır ve yavruları aynı yılın Kasım ve Aralık aylarında erişkin hale gelirler (King vd., 1991). Larvalar yaklaşık bir ay süreyle kuluçka evresi geçirirler. Bu sürenin sonunda yumurtadan çıkan larvalar üç instar geçirirler. Son olarak prepupa evresine erişerek toprağa düşerler ve pupa oluştururlar. 40 gün sonra genç erginler pupa evresini tamamlar ve topraktan çıkarlar (Moser, 1989). Ülkemizde üretim laboratuvarlarında muhtemelen iklim koşulları nedeniyle bütün bu evreler daha kısa sürmektedir (Görktürk, 2007).

Biyolojilerinin bir sonucu olarak, *R. grandis* erginleri, kabuk altında ya da pupa evrelerini geçirdikleri toprakta, uzun süre canlı kalabilmekte ve bu sayede yılın herhangi bir diliminde rastlanan *D. micans* popülasyonlarının çoğu evrelerinden etkili bir şekilde yararlanmaktadır

(King vd., 1991). *R. grandis*'in larva, prepupa ve ergin safhalarındaki davranışları ve hayat döngüsü zamanlamaları hakkında edinilen bilgiler bu türün mükemmel bir hayatta kalma stratejisine sahip olduğunu göstermiştir (Fielding ve Evans, 1997).

R. grandis yüksek bir tarama yeteneğine sahiptir ve *D. micans* galerilerinin %80'inden daha fazlasında bulunmaktadır (Grégoire vd., 1985). *R. grandis* *D. micans*'ın hem larva hem de ergin allomonlarını algılama yeteneğine sahiptir ancak *R. grandis* dişileri *D. micans*'ın larva dışkısı olmadığına yumurta bırakmazlar (Grégoire vd., 1984b). *R. grandis*'leri *D. micans* galerilerine çeken anahtar allomonların bu böceklerin erginleri tarafından üretildiği sanılan *exo-brevicomini* ve *D. micans* larvaları tarafından üretilen (-)-verbenone olduğu tahmin edilmektedir (Tømmerås vd. 1985).

R. grandis erginleri avlarının yerini belirlemek konusunda çok gelişmiştir, *D. micans* sürülerinden çevreye yayılan kimyasal sinyalleri hemen hissederler (Wainhouse vd., 1991, 1992; Grégoire vd., 1992). Kabuğun altına girdiklerinde eğer larva safhasında av bulamazlarsa *R. grandis* erginleri *D. micans* yumurtalarıyla beslenebilirler, böylelikle sürülerde kayda değer popülasyon azalmalarına yol açarlar (Evans ve Fielding, 1994). Eğer *D. micans* larvası mevcutsa, predatörler çiftleşir ve yumurta bırakırlar, yumurta miktarı sürüdeki av yoğunluğu ile orantılıdır, bu durum büyük ihtimalle *D. micans* larvalarının kümeleşme feromon konsantrasyonunu yansıtmaktadır (Fielding ve Evans, 1997). Ebeveyn *R. grandis*'ler yavrularının ilk beslenmesine önyak olmak için *D. micans* larvalarını yaralarlar. Predatör larvaları kurbanlarının üzerinde kümelenirler, *D. micans* larvalarının yumuşak gövdelerini yağmalayarak tamamen tüketirler ve sadece kabuğunu bırakırlar. Üç larva instarları süresince büyürken *R. grandis* larvaları direk olarak avlarına saldırır ve tüketirler. Tamamen doyduklarında, *R. grandis* larvaları prepupa safhasına girerler ve çoğunluğu *D. micans* sürülerinin bulunduğu sistemi terk ederler, ağaçtan atlayarak toprağa düşerler ve burada pupa oluşturarak sonunda ergin hale geçerler ve yeni bir nesil oluştururlar.

Diğer arazi gözlemleri ve deneyler *R. grandis*'in çok gelişmiş bir konak bulma yeteneğine sahip olduğunu ve çok geniş alanlara yayılabildiğini göstermiştir. Erginlerin İngiltere'de salıverilmelerinden 28 gün sonra 200 m'ye kadar yayılabildikleri gözlenmiştir. Bunun yanı sıra araştırmalar predatörün en yakın istiladan 9 km uzaklıktaki izole orman bloklarında *D. micans* popülasyonlarını bularak orada egemenlik kurduklarını göstermiştir.

1.1.3. Faydalı Böceklerde İstenmeyen Enfeksiyonlar

Genel olarak böcekler etrafta uçuşarak veya gezinerek insanları rahatsız eden küçük ve önemsiz canlılar gibi değerlendirilir. Çoğunun zararlı veya sinir bozucu olduğu düşünülmektedir. Aslında, faydalı böcekler insan hayatına çok önemli katkılar sağlamaktadır. Doğrudan bir ürün elde edilerek gözle görülür bir fayda sağlamasa bile aslında biz farkında bile olmadan ekonomiye çok büyük katkısı olan tozlaşmaya yardımcı böcekler bunun en önemli örneklerinden biridir. Faydalı böcekler denilince akla öncelikle bal arısı gelmektedir. Bunun yanı sıra ipek böceği de ticari öneme sahip faydalı bir böcektir. Ayrıca, kitle üretimi yapılarak zararlı böceklerle karşı kullanılan, faydalı böcekler de vardır ve bunlar da yine doğrudan olmasa bile hatırı sayılır bir şekilde ekonomiye katkı sağlamaktadırlar. Literatüre bakıldığında özellikle bal, ipek gibi ticari ürünler için yetiştirilen ve ekonomiye katkı sağlayan böceklerdeki hastalıklar üzerine detaylı araştırmalar yapılmıştır ve halen sürmektedir. Ancak, biyolojik mücadelenin kaçınılmaz olduğunun anlaşılmasıyla beraber, zararlı böcek popülasyonlarını baskılamak için kullanılan predatör böceklerdeki istenmeyen enfeksiyonlar da önem kazanmıştır. Aşağıda ticari öneme sahip uç böcekteki microsporidian enfeksiyonlarıyla ilgili araştırmalara kısaca değinilmektedir.

1.1.3.1. *Apis mellifera*'da Microsporidian Enfeksiyonu

Bal arısı *Apis mellifera* ürettiği besin değeri yüksek bal nedeniyle beslenen ve ticari anlamda da değere sahip önemli bir faydalı böcektir. Bu böcek de diğer böcekler gibi doğal düşmanlara sahiptir. Bu doğal düşmanlar üzerine pek çok çalışma yapılmıştır ve bunların arasında literatürde yer alan microsporidian patojenleri de bulunmaktadır. Bu bağlamda *Nosema apis* bal arılarında hastalık yapan en yaygın patojenlerden biridir (Bailey ve Ball, 1991; Matheson, 1996; Fléché, 1997; Fries, 1997). Bal arılarında hastalığa neden olan bu microsporidian patojeni arı kolonilerinin tamamen ölmesiyle bile sonuçlanabilmektedir (Farrar, 1947; Woyke, 1984; Fries, 1988, 1997). *N. apis* bal arılarının (*A. mellifera*'nın) yetiştirildiği neredeyse bütün ülkelerde rastlanan (Matheson, 1996) ve kovanın üretkenliği üzerinde kayda değer bir olumsuz etkiye sahip olan önemli bir microsporidian patojenidir (Goodwin vd., 1990; Anderson ve Giacón, 1992; Wilde ve Bratkowski, 1995). *N. apis* enfeksiyonu *A. mellifera* türüne ait ergin bal arılarının orta bağırsak epitel tabakasını etkiler. Enfeksiyon sindirim sıkıntıları ve arının yaşam süresinde kısalmaya neden olarak özellikle kış

koşulları sonrası arı popülasyonlarında azalmayla sonuçlanır (Ritter, 2001). Bu noktada şunu vurgulamak gerekir ki; *N. apis* sadece ergin arıların bağırsak dokusunda enfeksiyon yapan (De Graaf ve Jacobs, 1991) ve sporları hastalıklı bireylerin dışkıları vasıtasıyla çok miktarlarda ortama dağılabilen bir patojendir (Bailey, 1981). Hastalık böcekler arasında kontamine olmuş peteklerin ve su kaynaklarının sindirilmesi (L'Arrivee, 1965), besin veya diğer salgıların alışı verişi (Webster, 1993) ve belki de bal depoları ve ezilmiş hastalıklı arıların da vasıtasıyla geçmektedir (Fries, 1993).

1.1.3.2. *Bombyx mori*'de Microsporidian Enfeksiyonu

Ürettiği ipek nedeniyle ticari öneme sahip ipekböceği *Bombyx mori* L. ülkemizde özellikle Bursa'da yetiştirilmekte ve ekonomiye belli bir katkı sağlamaktadır. Ülkemizde 1500 yıllık bir geçmişe sahip olan ipekböceği yetiştiriciliği dünyada sadece 16 ülkede uygulanan bir tarım koludur. Bu ülkeler arasında 2003 yılı verilerine göre Türkiye ipekböceği kozası üretiminde 9. sırada yer almıştır (Aydın vd., 2007). Bu faydalı böceğin en önemli düşmanı 'karataban hastalığı' olarak da bilinen *Nosema bombycis* (Naegeli, 1857) türü microsporidian patojenin sebep olduğu 'Pebrin hastalığıdır' (Aydın vd., 2007; Hatakeyama ve Hayasaka, 2002, 2003; Jyothi vd., 2004; Keeling ve Fast, 2002; Patil vd. 2001). *N. bombycis* enfeksiyonunun biyolojisine bakıldığında, hayat döngüsünü tamamlaması soğuk iklimlerde bir hafta, sıcak iklimlerde ise dört gün sürmektedir (Akbay, 1986; Mimioğlu vd., 1969). Enfeksiyona yol açan sporla iki yol ile bulaşmaktadır. Horizontal bulaşmada dışkı ile dışarı atılan sporlar besin ve su kaynaklarını kontamine eder ve bu kaynakları kullanan diğer bireyler de ağız yoluyla sporları alırlar. Diğer yol ise vertikal bulaşmadır ve dişi kelebeğin yumurtalığına yerleşen *N. bombycis* patojenin burada oositlerde çoğalarak sporlarının transovarial olarak gelecek nesillere geçmesini sağlaması sonucu gerçekleşir (Aydın vd., 2007). Vertikal bulaşmadan dolayı, bir ipekböceği kolonisinde pebrin hastalığı bir defa geliştiğinde, diğer nesil de etkileneceğinden, *N. bombycis* ile enfekte tüm ipekböcekleri imha edilmektedir. Bu durum, ipek üretiminde azalmaya ve sonuçta önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Hatakeyama ve Hayasaka, 2002, 2003; Jyothi vd., 2004; Patil vd. 2001). *N. bombycis* patojeni ipekböceklerinde, yumurta üretimini de olumsuz etkilemektedir. Hastalık özellikle larva döneminde bağışıklığı daha az olan bireyleri etkilemektedir. Genç larvalar, içlerinde bağışıklığı en az olduğundan en çok tahribat bu bireylerde meydana gelir (Aydın vd., 2007). Hastalığın ileri safhalarında larvalar halsiz, cansız ve donuk bir hal alırlar. Bunun yanı

sıra büyümelerinin yavaşlaması ve düzensizleşmesi de pebrin hastalığının en çarpıcı makroskobik belirtileridir. Hastalığın son safhalarında larvaların pas rengini alması, vücutlarını kaplayan kütikül tabakasının buruşması ve özellikle ayak tabanlarında şekilsiz, koyu kahverengi veya siyah noktalar görülmesi nedeniyle halk arasında “karataban” olarak anılmaktadır (Aydın vd., 2007). İpek bezleri de enfeksiyondan etkilenmektedir. Etkilenme kütlelerinin azalması ve ipek bezlerinin, spor yapılarının hızla çoğalması sonucu, beyaz bir sıvı ile dolması şeklinde olmaktadır. Sonuç olarak larvalar pupa evresine geçmeleri için uygun ortam sağlansa bile koza örememektedir (Aydın vd., 2007). Bazı böcekler çok az miktarda ipek salgılamayı başarsalar bile sonra yere düşmektedirler. Kelebeklerde ise pulların dökülmesi, karın ve kanat pullarında renk değişikliği, kanatlarda şekil bozukluğu gibi makroskobik belirtiler görülmektedir. (Akbay, 1986). *N. bombycis*'in yanı sıra ipek böceklerinden birkaç tane daha microsporidian cinsi bulunmuştur (Bhat, Nataraju, 2007; Govindan vd., 1998). Bu da araştırmalar arttıkça hastalık etmenlerinin sayısının da arttığını göstermektedir. Microsporidian enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu deneylerle kanıtlanmış bir takım ilaçlar vardır. Örneğin, albendazol ve fumagillin uygun dozlarda kullanıldıklarında hastalık tamamıyla tedavi edilebilmektedir (Haque vd., 1993; Jason vd., 2001). Bu nedenle ipekböceği gibi faydalı böceklerdeki hastalık etmenlerinin tür seviyesinde teşhisi ve tanımlanması çok önemlidir. Böylelikle mevcut ilaçlar yeni türler üzerinde denenerek etkinlikleri ve gerekli dozlar belirlenebilir.

1.1.3.3. *Hippodamia convergens*'te Microsporidian Enfeksiyonu

Uğur böcekleri çok yaygın olmaları, kolaylıkla bulunabilmeleri ve yaprakbitleri ile beslenmeleri gibi özellikleri nedeniyle bahçelerde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan böceklerdir. Yakınsak uğur böceği olarak da bilinen *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville de Güney Amerika'da sıklıkla bahçelerde biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan ve kışladıkları dağlardan her yıl özel olarak toplanıp ticari olarak satılan bir uğur böceği türüdür. Bu böceklerde, hastalık yapan türü belirlenememiş bir microsporidian patojeni böceğin genel hayatta kalma potansiyelini ve üretkenliğini yaklaşık yarı yarıya azaltmaktadır (Joudrey ve Bjørnson, 2007). Bu da böceğin biyolojik mücadelede kullanımını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca bazı microsporidian türlerinde olduğu gibi bu böcekte bulunan microsporidian patojeni da yüzde yüz yatay taşınma sahiptir (Joudrey ve Bjørnson, 2007). Bu da hastalığın bir sonraki nesle mutlaka bulaşacağı anlamına gelmektedir.

Dolayısıyla popülasyonda hastalıklı bir bireyin bulunması daha sonraki nesilleri de olumsuz etkileyeceğinden biyolojik mücadelede başarısı kayda değer bir şekilde azalacaktır.

1.1.4. *R. grandis*'in Üretimini Olumsuz Etkileyen İstenmeyen Enfeksiyonlar

Faydalı böceklerdeki istenmeyen enfeksiyonların ve özellikle de microsporidian enfeksiyonlarının olumsuz etkileri yukarıda da bahsedildiği gibi güncel bir konudur ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılan faydalı böceklerde, hastalığa neden olan microsporidian patojenleri, bu tezin ilgi alanına girmektedir. Yukarıdaki uğur böceği örneğinden de anlaşılacağı gibi microsporidian patojenleri özellikle biyolojik mücadelede kullanılan bir böcek için şiddetle istenmeyen bir durumdur. Bal arısı örneğinde olduğu gibi bu tür hastalıklarla başa çıkmak mümkündür ancak konu edilen microsporidian patojeninin tür seviyesinde detaylı olarak çalışılmış olması gerekmektedir. Bu nedenle microsporidian türlerinin yapısı, biyolojisi ve taksonomisi hakkında detaylı bir araştırma yapılmıştır.

1.1.5. Microsporidian Patojenlerinin Biyolojisi

Microsporidian patojenlerinin biyolojisi aşağıda iki başlık altında detaylı olarak anlatılmaktadır. Microsporidian sitolojisi ve gelişiminin temelleri başlığı altında yapıların sitolojik özellikleri ve gelişim döngülerinin ayrıntıları irdelenmektedir. Microsporidian patojenlerinin elektron mikroskobundaki yapısı ve taksonomisi başlığı altında microsporidian patojenlerinin en yaygın evrelerinin yani sporların detaylı yapısı ve bu yapıların taksonomide kullanımı anlatılmaktadır.

1.1.5.1. Microsporidian Sitolojisi ve Gelişiminin Temelleri

Microsporidian karakterizasyonu alanında ilk çalışmalar Vavra (1976b,c) tarafından yapılmıştır ve bu incelemelerdeki bilgiler halen geçerlidir. Microsporidian çekirdeğinin biyolojisi Raikov (1982) tarafından incelenmiştir.

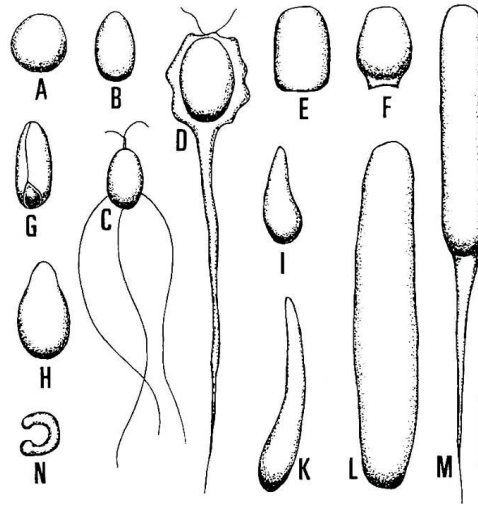
Microsporidian enfeksiyonunun karakteristik safhası spor yapısıdır. Spor en uzun süreye sahip gelişimsel evredir ve ışık mikroskobu seviyesinde bir microsporidiana ait olduğu

kolayca belirlenebilen tek evredir. Sporların olmadığı durumlarda, bir uzman tarafından bile spor öncesi evrelerin teşhisi çok zordur.

1.1.5.1.1. Spor

Sabitlenmemiş microsporidian sporları genellikle 2-7 µm uzunluğundadır, ancak fiksasyon sırasında kayda değer bir şekilde küçülmektedir. Çoğu tür oval veya kayık şekilli sporlara sahiptir, ancak çubuk şekilli veya dairesel sporlar da bazı cinslerin karakteristik özellikleridir. Birkaç cins, özgün şekilli sporlara sahiptir (Şekil. 6). İstisnalar hariç dış yüzey genellikle pürüzsüzdür.

Spor duvarı kalın, kitin içeren koruyucu bir tabakadır (Erickson ve Blanquet, 1969; Vávra, 1976b) Normalde üç kısım ayırt edilebilir. En dışta 10-200 nm kalınlığında, elektronca yoğun ekzospore vardır. Yarı saydam orta tabaka, endospor bazı türlerde yoktur veya az gelişmiştir. İç plazma zarı 7 nm kalınlığında tek katlı bir zardır. Plazma zarı ve ekzospore (istisnalar hariç) tüm spor çeperinde aynı kalınlıktadır. Endospor ön kutupta dar bir tabakaya dönüşür.



Şekil 6. Şekil çeşitliliğini göstermek için microsporidian sporlarının şematik görünümü A: küresel (*Buxtehudea*); B-D: oval (B-*Nosema*, C-*Inodosporus*, D-*Caudospora*); E: fıçı şeklinde (*Amblyospora*); F: *Parathelohania*; G: *Weiseria*; H-K: armut şeklinde (H-*Systemostrema*, I-*Bohuslavia*, K-*Pyrotheca*); L-N: çubuk şeklinde (L-*Mrazekia*, M-*Jirovecia*, N-*Toxoglugea* Ölçek: 5µm). (Larsson, 1986'dan)

Spor çoğunlukla posterior bölgesinde bir veya iki çekirdeğe sahiptir. Eşleşmiş çekirdekler bir diplokaryon şeklinde sıkı sıkıya birleşmişlerdir (*sensu* Sprague ve Vernick, 1974). Çekirdek alışılmış ökaryotik tiptedir, çift katlı zara sahiptir. Küresel veya oval nadiren de at nalı şeklindedir (Vivier ve Schrevel, 1973; Larsson, 1982).

Sitoplazma serbest ribozomlara ve karakteristik bir şekilde konumlanmış endoplazmik retikuluma sahiptir. Üst üste yığılmış zar keseleri, keselerin arasında sandviç halinde ribozomlarla sıkıştırılmıştır. Yığınların dış yüzeyi tamamen ribozomlardan yoksun gibi görünmektedir. Ishihara ve Hayashi (1968), yaptıkları çalışmalarda ribozomların çoğunlukla monoribozomlar olduğunu ve tortulaşma katsayılarının 70S olmadığını bulmuşlardır. Bu da ökaryotik microsporidian patojenlerinin, prokaryotik özellikteki ribozomal RNA'ya sahip oldukları anlamına gelmektedir. Microsporidian patojenleri sadece hücre içi parazitler olduğundan tüm gelişimsel evreler mitokondriden yoksundur. İhraç etme aparatı (polar filament) microsporidian patojenine özgüdür.

Polar filament sporun anterior kutbuna bağlıdır ve sporun posterior yarısında genellikle iki veya daha fazla katman oluşturacak şekilde sarmal oluşturmaktadır. Dış tarafından tek katlı zar ile çevrelenmiştir ve enine kesitlerinde değişken elektron-yoğunluklu ve yarı saydam tabakalar görülebilmektedir. (Weidner, 1976).

Anchoring aparatının boyuna kesiti bir mantarı andırmaktadır, filamentin kıvrılmış anchoring diski şapkasını ve filamentin şişmiş, soğansı eklenti kesiti de sapını oluşturmaktadır. Kesitlerde disk yan yana sırayla dizilmiş elektronca yoğun ve elektronca saydam tabakalar şeklinde görünür.

Anchoring disk, polar filamentin tek katlı zarının devamı olan polar kese içinde bulunmaktadır (Petri ve Schiødt, 1966). Polar kese polaroplastın anterior kısmını çevrelemektedir. Microsporidian patojenlerinin büyük çoğunluğunda polaroplast sporun büyük bir kısmını oluşturmaktadır.

Çoğu microsporidian sporunun posterior kutbuna yakın bir konumda, zarla çevrili, posterior vakuol olarak adlandırılan yapı bulunur. Vernick ve çalışma arkadaşları (1977) polar filamentin bu yapı tarafından meydana getirildiğini doğrulamıştır. Her ne kadar bu alan klasik Golgi aparatından morfolojik olarak farklı olsa da, bu organelle karşılık geldiği sonucuna varılmıştır (Vernick vd., 1977).

1.1.5.1.2. Polar Filament Çıkarma ve Enfeksiyon

Microsporidian patojenleri yeni konağa değişik yollardan bulaşabilir. En yaygın giriş sindirim sistemi yoluyla olmaktadır. Ayrıca yumurtalar yoluyla da bulaşabilirler veya kütiküladan bir takım vektörler yardımıyla giriş yapabilirler (Kramer, 1976). Uygun bir konak içerisinde, genellikle bağırsakta, spor polar filamentini ihraç eder. Bu işlem sırasında doğal konakta mekanik (besinlerin öğütülmesi gibi) ve kimyasal uyarıların (örneğin; pH, ozmos veya enzim ve katyonların kompozisyonu ve konsantrasyonu) etkin olduğuna inanılmaktadır. İhraç edilen polar filament eşit genişlikte bir boşaltım tüpü oluşturur ancak boyu filamentten biraz daha uzundur. Filament çıkarma işleminin, bir eldivenin parmağı gibi ters çevrilerek meydana geldiği düşünülmektedir (Lom ve Vávra, 1963b).

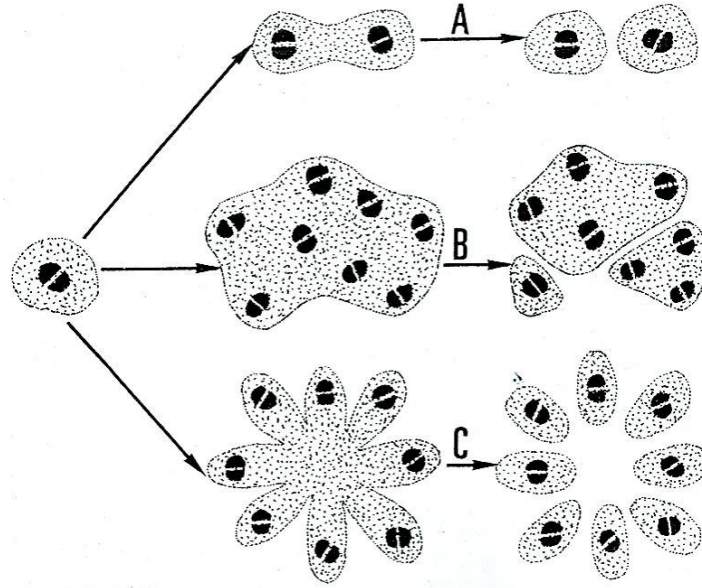
Boşaltım tüpü bir epitelyum hücresinin duvarından geçer ve sporoplazma, bulaşıcı hücre, tüp vasıtasıyla enjekte edilir (Ishihara, 1968; Weidner, 1972). Sporoplazmanın plazma zarı, polaroplastın zarından meydana gelmektedir (Weidner vd., 1984).

Polar filamentin deneysel olarak ihraç edilebildiği iyi bilinen pek çok metot vardır. Bu metotlar mekanik basınç uygulama, kurutup yeniden ıslatma, dondurup çözme veya çeşitli tuzlar, asitler veya bazlar ile muamele etmeyi içerir. (Dall, 1983; Weidner ve Byrd, 1982).

1.1.5.1.3. Çoğalma

Microsporidian patojenlerinin gelişimi iki çoğalma bölümünü içerir: merogoni (vegetatif çoğalma) ve sporogoni (sporların oluşması). Merogoni kısa bir süreye sahiptir ve dikkatli irdelenmediği sürece gözden kaçabilir. Sporogoni ise kalıcı ve belirgin sporlar ile sonuçlanır. Doğadan toplanmış materyal ile yapılan çalışmalarda elde edilen microsporidian patojenleri genellikle spor aşamasındadır.

Merogoni ve sporogoni terimleri Microspora'da Apicomplexa'da olduğundan daha geniş bir anlamda kullanılmaktadır. Levine (1971) merogoni ve sporogoniyi şizogonial çoğalma olarak tanımlamıştır. Ancak, Microspora'da merogoni ve sporogoni ikili fizyon, plasmatomy (çok çekirdekli bir hücrenin arka arkaya bölünmesi) veya şizogoni (çoklu tomurcuklanma) şeklinde meydana gelebilir (Şekil. 7).



Şekil 7. Hücre bölünme şekilleri A-İkili fizyon, B-Plasmotomi, C-Schizogoni. (Larsson, 1986'dan).

Çoğu microsporidian patojeninde bütün sporoblastlar şizogoni ile aynı anda oluşmaktadır. Bölünmelerin şekli, plazmodyumun biçimi ve meydana gelen yavru hücre sayısı taksonomide faydalı olabilecek karakterlerdir,

Nosema apis (Gray vd.,1969)'in gelişiminde olduğu gibi merogoni ve sporogoni konakta aynı dokuda bulunabilir veya; *Culicosporella lunata* (Hazard vd., 1984)'da olduğu gibi aynı konağın farklı dokularında görülebilir veyahut da; *Amblyospora* sp. (Andreadis, 1983)'te olduğu gibi aynı konak türünün farklı nesillerinde bulunabilir.

1.1.5.1.4. Çekirdek Bölünmesi ve Eşeyssel İşlemler

Raikov (1982) tarafından kullanılan sınıflandırmaya göre, microsporidian patojenlerinin çekirdeği büyük nükleoplazma bölgeleri ve çoğunlukla dağılmış kromatin içeren keseli bir yapıya sahiptir. Microsporidian çekirdeklerinde çekirdekcik nadiren görülmektedir.

Microsporidian mitozu genellikle bölünmekte olan sporontlar üzerinden çalışılmıştır. Mitoz sırasında çekirdek zarfı korunur ve mitotik iğ iplikçikleri hücre içindedir (Raikov, 1982).

Mitoz ile ilişkilendirilen yapılar mikrotübüller, merkezci plakalar, kinetokorlar, kromozomlar ve polar keselerdir. Mitozdaki iğ ipliklerinin mikrotübüllerinin çapı c. 15

nm'dir. Tek bir tarafta birçoğu kromozomların kinetokorlarına bağlanmıştır, diğer tarafları ise bir organizasyon merkezine bağlıdır. Microsporidian patojenlerinin sentriolleri yoktur. Merkezil plaka dairesel bir yapıdır. Kaydedilen çaplar 70 nm ile 400 nm'den daha büyük değerler arasında değişmektedir. Sitoplazmada merkezil plakaların çevresinde kesecikler toplanmaktadır.

Mitozun başlangıcında çekirdeğin tek bir plakası vardır. Plaka, iğ iplikçikleri ve kromozomlar bölünür ve iki yarım iğ iplikçiği çekirdeğin farklı kutuplarına göç. Çift çekirdekli nükleuslarda iğ iplikçiklerinin tübüleri nükleuslar arasındaki bağlantıya paralel olarak uzanırlar. Son olarak kromozomlar kutuplara çekilir ve çekirdek zarfı ikiye boğumlanır.

Mayoz veya indirgeme bölünmesi genellikle synaptonemal komplekslerin meydana gelmesi ile ortaya çıkar. 90-100 nm genişliğindeki kompleks, fibriller ile bir merkezi elemana bağlanmış iki yanal eleman ile birlikte üç bölümlü bir yapıya sahiptir. Synaptonemal kompleksler hem monokaryotik (tek çekirdekli) hem de diplokaryotik sporontlarda gözlemlenmiştir.

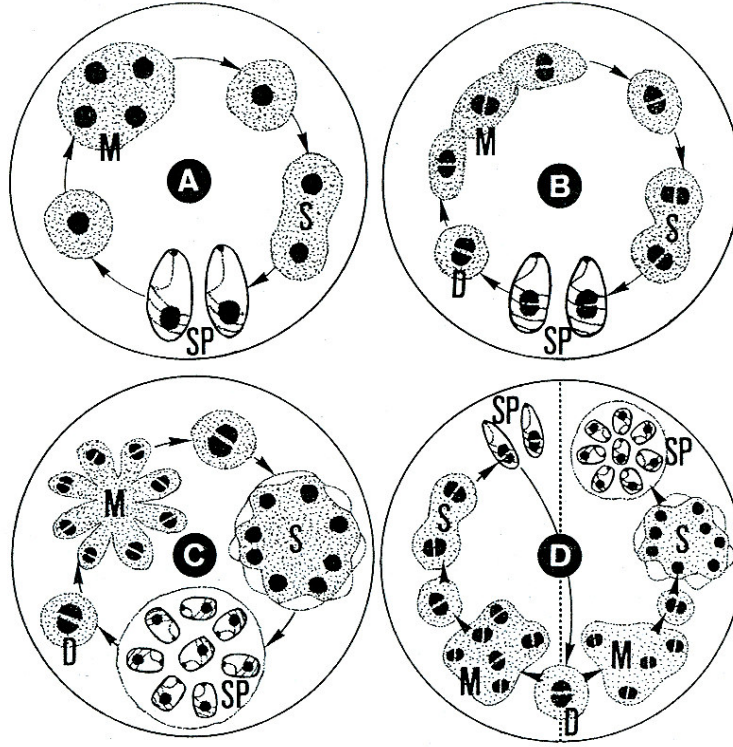
Hazard ve çalışma arkadaşları yakın zamanda microsporidian patojenlerinde eşeyssel işlemlerin gerçekleştiğini açığa çıkarmışlardır (Hazard vd., 1984, 1985). Hazard vd. yaptıkları çalışmada, larvalarda bu microsporidian patojenlerinin sporlarını besin yolu ile aldıktan bir veya iki gün sonra gamont adı verilen monokaryotik hücreler gözlemlenmiştir. 3. ve 4. günlerde, gamet olarak yorumlanan evreler gözlemlenmiştir. Gamet adı verilen bu hücreler tekrar tekrar bölünerek kan hücrelerini monokaryotik yavru hücreler ile doldurmuşlardır. Sonunda hemositler parçalanmakta ve gametler plazmogami geçirdikleri ve ikişer ikişer birleştikleri hemolenf içerisine bırakılmaktadır. Bu şekilde meydana gelen, meront adı verilen, hücrelerde her biri bir gametten gelen iki çekirdek, merkezi bir diplokaryon oluşturacak şekilde bir araya gelmektedir.

1.1.5.1.5. Gelişim Döngüleri

En azından beş farklı gelişim döngüsü ayırt edilebilir, ancak birçok microsporidian türü için hayat döngüsünün yalnızca bir kısmı bilinmektedir.

Döngü 1. Tüm gelişimsel evreler tek çekirdekli (Şekil. 8A). Örnekler: *Unikaryon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*.

Döngü 2. Tüm gelişimsel evreler diplokaryonlar olarak çiftler halinde çekirdeklere sahip (Şekil. 8B). Örnekler: *Nosema*, *Caudospora*, *Octosporea*.



Şekil 8. Microsporidian gelişim döngülerinin şematik gösterimi A. Döngü I, B. Döngü II, C. Döngü III, D. Döngü IV (D-diplokaryon, M-merogoni, S-sporogoni, SP-spor) (Larsson, 1986'dan).

Döngü 3. Merogonial evreler diplokaryotik. Diplokaryotik sporont izole çekirdekli sporogonial plazmodyumu oluşturur ve sonra da tek çekirdekli sporoblastlar oluşur (Şekil. 8C). Sporont çekirdeğinin ilk bölünmesi muhtemelen her zaman mayotiktir. Büyük ihtimalle merogoninin sonunda nükleer füzyon, karyogami ile gerçekleşmektedir. Örnekler: *Thelohanian*, *Systemostrema*, *Trichoduboscqia*.

Döngü 4. İki farklı tip sporun üretildiği dimorfik gelişim. Bir seride tüm evreler çiftler halinde, diplokaryotik çekirdeklere sahiptir. Bir başka seride merogonial evreler ve sporont diplokaryotiktir ve mayoz bölünmeden sonra monokaryotik sporoblastlar oluşur (Şekil. 8D). Büyük ihtimalle merogoninin sonunda karyogamiye sahiptir. Örnekler: *Burenella*, *Amblyospora* (kısmen), *Culicosporella*.

Döngü 5. İki konaklı yaşam döngüsü. Diplokaryotik evreler ve monokaryotik evreler birbirini izler. Örnek: *Amblyospora*.

İki konaklı hayat döngüsüne sahip microsporidian patojenlerinin varlığına dair ilk bariz kanıt Sweeney vd. tarafından 1985'te bildirilmiştir.

1.1.5.1.6. Spor Öncesi Dönemlerin Sitolojisi

Sporoplazmalar, merontlar ve merozoitler, büyük merkezi çekirdekli veya diplokaryonlu, yuvarlaklaşmış veya hafifçe yamuk şekilli hücreler olarak morfolojik açıdan birbirinin aynıdır. Hücre zarfı tek katlı bir zardır. Sitoplazma homojen olarak granüllüdür ayrıca çok sayıda serbest ribozoma ve az gelişmiş endoplazmik retikuluma sahiptir. Sık dizilmiş keseciklerin bulunduğu alanlar ilkel Golgi kompleksleri olarak yorumlanmıştır (Vávra, 1965). Bunlar sporont evresinde daha belirgindir. Microsporidian gelişiminin tüm evreleri mitokondriden yoksundur.

Merozoitten sporont dönüşüm esnasında iki önemli değişiklik meydana gelir. Granüllü endoplazmik retikulum artar ve cisternae çekirdek çevresinde ortak merkezli katmanlar halinde dizilir. İkinci olarak plazma zarının kalınlığı ve karmaşıklığı dışarıdan elektronca yoğun materyal eklenmesi ile birlikte artar. Genç sporontlar hücrenin çevresine yakın keseciklere, yahut paramural cisimcikler veya scindozomlar olarak bilinen, hücre duvarının oluşumuna katkısı olduğu varsayılan geçici yapılara sahiptirler (Vávra, 1976a).

Sporoblastın hücre zarfı, plazma zarının dış kısmında, çoğunlukla olgun sporun yüzey tabakası olan ekzospor ile özdeştir. Kitin içeren, olgun sporlarda belirgin olarak bulunan endospor tabakası, sporoblastın hücre duvarında başlangıçta bulunmamaktadır. Bu tabaka sporun morfogenezinin ilerleyen safhalarında oluşturulmaktadır ve endosporun gelişmesi spor olgunlaşmasını sonlandırmaktadır. Polar filament ve polaroplast, sporoblastlarda ve olgunlaşmamış sporlarda oluşurlar. Sporogonial plazmodyumun merkezinde bir Golgi aparatı bulunabilir ve bu sporoblastlar arasında bölüşülür (Larsson, 1985). Bu yapı hücrenin posterior kısmında, çoğunlukla çekirdeğe yakın bir yerde bulunur. Polar filament Golgi aparatı tarafından oluşturulmaktadır. Polar kese ileride oluşacak taslak polar filamentin anterior ucunda gelişir. Filamentin uzunluğu arttığında uç kısmı olgunlaşmamış sporun anterior kutbuna doğru itilir. Kompleks anchoring aparatı polar kesenin içerisinde gelişir ve sonrasında basit ilkel filament çok katmanlı bir organel dönüşür. Polaroplast sporoblastta ilk

olarak polar filamentin anterior kısmından çıkan tübüler çıkıntılar halinde gelişir. Bunlar kompleks ve odacıklı veya lamelli bir organele genişler veya farklılaşır.

Çok sayıda microsporidian patojeni bir zarf içinde spor oluşturur. Çoğu tür için bu, sporogoninin başlarında sporontun hücre duvarından çıkıntılar halinde meydana gelir. Çoğu microsporidiolojist, bu yapı için Gurley (1893) tarafından önerilen, Thélohan (1892) tarafından türetilen 'pansporoblast' terimini tercih eder. Microsporidian patojenlerinin spor içeren keseleri için 'Sporofor kesesi' en uygun terim gibi görünmektedir.

1.1.5.2. Microsporidian Patojenlerinin Elektron Mikroskopundaki Yapısı ve Taksonomisi

Geçen iki yüzyılda microsporidian patojenlerinin elektron mikroskopundaki yapısı ile ilgili çok bilgi toplanmıştır. Bu bilgiler sistematik bir biçimde sunulmamıştır ve elektron mikroskobu karakterleri tür seviyesinin üzerindeki taksonomik çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmamıştır.

1.1.5.2.1. Ekzospor

Ekzospor çoğunlukla basitçe elektronca yoğun bir tabaka olarak tanımlanır. Ancak ekzosporlar görünüm bakımından basit katmanlaşmamış yapılar ile karmaşık çok tabakalı yapılar arasında değişkenlik gösterirler.

Ekzospor sporont tarafından üretilir. Bazı türlerde çok hızlı bir şekilde son aşamasına farklılaşır ve tamamen gelişmiş ekzospor sporoblastlar tomurcuklanarak ayrılmadan önce mevcuttur.

Suda şişen mucocalyx tabakası (Lom ve Vávra, 1963a; Vávra ve Barker, 1980), elektron mikrosobuyla ayrı bir yapı olarak görüntülenemez.

Tamamen gelişmiş bir ekzosporun morfolojisi ve morfogenezi ile ilgili bilgiler birleştirilerek, en azından dört farklı morfolojik tip ayırt edilebilir. Bunlardan ikisi (II ve III) muhtemelen filogenetik olarak akraba cinsleri karakterize etmektedir. Özelleşmemiş ekzosporlar yakından akraba olmayan cinsler arasında ortaktır. Son grup (IV) çok özelleşmiş ekzosporların polifiletik bir topluluğudur, bu da az sayıda cinsin karakteristiğidir. Aşağıda yaygın ekzospor tipleri maddeler halinde verilmektedir.

Tip 1. Ekzospor homojen elektronca yoğun maddelerden oluşmuştur. Bazı türlerde ekzospor sporontun yüzeyinin üstünde birbirine eşit uzaklıkta paralel teller halinde uzanmaktadır

(Barker, 1975; Canning vd., 1983). Olgun sporun ekzosporu homojen bir tabakadır. Eğer bir sporofor kesesi mevcutsa, kesenin zarfı ekzospor ile bağlantılı değildir.

- A. Ekzospor ince (genellikle 20 nm'den daha ince), projeksiyonsuzdur.
- B. Ekzospor kalın (genellikle 40-60 nm arası), projeksiyonsuzdur.
- C. Tübüler ve fibrilli projeksiyonlara sahip ekzospor.

D. *Tip II.* Ekzospor öncülü granüler veya tabakalaşmış maddelerin yastık benzeri birikintileridir. Olgun sporun ekzosporu normalde homojen bir şekilde elektronca yoğundur. Sporofor kesesi mevcuttur, çoğunlukla ekzosporla bağlantılıdır.

A. Ekzospor öncülü granülerdir. Özdeş olgun ekzospordan çıkan tübüler projeksiyonlar ekzosporu sporofor kesesinin zarfına bağlar.

B. Ekzospor öncülü kat kat elektronca yoğun madde içerir. Olgun sporun ekzosporu ince, homojen, sporları çiftler halinde birbirine bağlayan granüllü elektronca yoğun maddeden yapılmış yamalara sahiptir. Sporofor kesesinin katlanmış zarfı ekzospora bağlıdır.

C. Ekzospor öncülü her yerde eşit bir şekilde elektronca yoğundur. Olgun sporların ekzosporu homojen bir şekilde elektronca yoğundur. Sporoblastlar çiftler halinde homojen, elektronca yoğun maddeden yapılmış kalın tellerle birbirine bağlanmıştır. Olgun sporlar genellikle çiftler halinde tekdüze maddeyle birbirine bağlanmış veya çiftler halinde elektronca yoğun madde ile sarmalanmıştır. Sporofor kesesinin zarfı ekzospor ile doğrudan veya tübüller vasıtasıyla bağlıdır.

D. Sporontun ekzospor öncülü gelişerek sürekli ve çok katmanlı bir hücre duvarı oluşturur. Bazen dış katmanlar, elektronca yoğun iç katmanı homojen bir ekzospor halinde bırakarak, kısmen ayrılır.

Tip III. Ekzospor öncülleri katmanlı elektronca yoğun maddelerin birleştiği alanlardır. Tabakalardan biri tek katlı zarı andıran bir yapıya bölünmüştür. Aşağıda bu yapıdan 'çift-katman' diye söz edilmektedir.

A. Olgun sporun ekzosporu incedir (c. 20 nm) ve çift katmanın iç ve dış kısımlarında granüllü madde yoğun olarak bir araya toplanmıştır.

B-D alt grupları için ekzospor basit yapılı bir iç çift katmana ve katmansız veya elektron yoğunluğu bakımından çok az farklı yaygın katmanlara bölünmüş bir yüzey tabakasına sahiptir ve toplam kalınlığı c. 30 nm'dir. İç kısımlarda elektronca yoğun madde yaygın bir granüllenme veya ayırık katmanlı yapılar şeklinde eklenmektedir.

B. İç kısmına bitişik granüllü madde eklenmiş basit yapıda ekzospor, toplam kalınlık c. 35 nm.

C. Çift katmanın iç kısmındaki elektronca yoğun madde kalın ve fibrilli bir tabaka oluşturur, anterior kutupta bu yoktur. Toplam kalınlık 150- \geq 200 nm.

D. Çift katmanın iç kısmında iki ayrı tabaka bulunur, toplam kalınlık c. 70 nm.

Tip IV. Karmaşık ekzosporların heterojen ve polifiletik bir topluluğudur. Öncülleri çok katmanlı yapılardır. Ekzospor, sporoblastlar serbest kalmadan önce tamamen gelişmiş hale gelebilir. Yüzey tabakası her tür için karakteristiktir.

A. Ekzospor yüzeyi saçak benzeri yapıdadır.

B. Olgun sporlar köpüklü ışın yayan yüzey tabakasına sahiptir.

C. Sporont safhasından itibaren, ekzospor, kalın, bal peteğini anımsatan odacıklı dış tabakaya sahiptir. Yüzey tek katlı zarı anımsatan bir yapı ile çevrilidir.

1.1.5.2.2. Polaroplast

Microsporidian türlerinin hepsi belirgin bir polaroplasta sahip değildir. Çoğu microsporidian türlerinde polaroplast sporun anterior kısmında bulunan çok katlı bir yapıdır. Polaroplast ilk olarak sporoblast veya olgunlaşmamış sporda polar filamentten çıkan vesiküler çıkıntılar şeklinde oluşmaktadır. Bu yapılar zarla çevrili keseler oluşturacak şekilde genişleyerek birbirlerine daha yakın, sıkışık bir görünüm kazanırlar. Tamamen geliştiğinde, polaroplast polar filamentin kıvrımsız kısmını çevreler. Polaroplastların çoğu anterior kısımda daha geniştir ve polar filamentin ilk kıvrımına doğru incelmektedir. Posterior sınır belirgindir ve sporun uzunlamasına eksenine diktir.

Enine kesitlerde polaroplastın lamelleri ve keseleri ya radyal olarak bütündür ve her bir kese polar filamentini tamamen çevreler (Larsson, 1980) veya daha dardırlar ve bir çiçeğin taçyaprakları gibi dizilmişlerdir.

Çoğu microsporidian türleri iki belirgin bölgeye ayrılmış polaroplasta sahiptir. Anterior bölgede keseler yakın ve düzenli bir şekilde dizilmiş lameller halinde sıkışmıştır. Posteriorde ise daha az düzleşmişlerdir ve daha düzensiz yapıdadırlar. Bu iki bölgeye genellikle lamelli polaroplast ve süngersi veya vesiküler polaroplast isimleri verilir.

Polaroplast değişken bir organeldir ve birkaç farklı tiptir.

Tip I. Anterior kısım sık döşenmiş lamellere sahiptir, posterior kısım daha geniş ve daha düzensiz dizilmiş keseler veya lamellere sahiptir. Dar lameller daha geniş olanlardan, iki farklı grup oluşturacak şekilde, kesin olarak ayrılmıştır. Microsporidian türlerinde en sık rastlanan polaroplast tipi budur.

Tip II. Bütün polaroplast alt bölme olmaksızın her yerde aynı yapıda kompartımanlara veya keselere sahiptir. Enine kesitlerde polaroplastın kompartımanları polar filamentin etrafında bir mozaik gibi dizilmişlerdir.

A. Kompartımanlar sıkışık, kese benzeri yapıdadır.

B. Kompartımanlar granüllü veya bazen temiz boşluklar da içeren geniş keseler veya odacıklardan oluşmuştur.

Tip III. Anterior kısımda polaroplast, granüllü madde ile dolu ve sıklıkla temiz boşluklara sahip geniş bölmelerden oluşmaktadır; bölmeler posterior kısma yaklaştıkça giderek daha sıkışık bir hal alırlar.

Tip IV. Olgunlaşmamış sporda anterior kısım granüllü içeriğe sahip yuvarlaklaşmış keselerden oluşmaktadır, posterior kısım lamellidir. Olgun sporun polaroplastı iki kısımdan oluşmaktadır: granüllü içeriğe sahip bir anterior kese ve lamelli bir posterior bölge.

Tip V. Tersine dönmüş polaroplast düzenli bir şekilde dizilmiş lamelli iki farklı bölgeye sahiptir. Anterior lameller geniş, posterior lameller ise, orta bölgelerde aşamalı geçiş olmaksızın, dardır. Bu tip bir polaroplast, kompartımanların anterior kısımdaki geniş bölmelerden kademe kademe daralarak posterior kısmın dar lamellerine dönüştüğü, III. tip polaroplasttan tamamen farklıdır.

1.1.5.2.3. Polar Filament

Taksonomide geniş kullanıma sahip karakterler arasında izofilar ve anisofilar yapı, değişik kısımların uzunluk ve kalınlıkları, kıvrımlı kısmın kapladığı alan, kıvrımların yerleşimi ve eğiklik açısı gelmektedir.

Filament ya baştan uca kadar aynı kalınlıkta (uca doğru çok az incelme olabilir), veya bir noktada aniden daralarak proksimal kısımda geniş ve distal kısımda dardır. Weiser (1977) bu iki durum için sırasıyla izofilar ve anizofilar terimlerini önermiştir.

Anterior filament kıvrımının eğiklik açısı Burges ve çalışma arkadaşları (1974) tarafından bir taksonomik karakter olarak öne sürülmüştür. Doğru bir şekilde ölçülmüş eğiklik açıları aynı türün farklı sporları için yaklaşık 10°'lik bir sapma gösterir. Kıvrım sayısı, kıvrım çapı ve anizofilarlık gibi özellikler olgun spordardan elde edilmelidir.

Polar filament bütün microsporidian türlerinde katmanlı bir yapıya sahiptir. Temel organizasyon en iyi, olgun sporun polar filamenti, sporoblastın ilkel filamentini ile karşılaştırıldığında anlaşılabilir. Temel organizasyon en iyi, olgun sporun polar filamentini, sporoblastın ilkel filamentini ile karşılaştırıldığında anlaşılabilir.

Polar filament sporoblastın Golgi aygıtı tarafından oluşturulmaktadır. Elektronca yoğun madde gelişerek yoğun bir çekirdek ve dış kabuk arasında granüllü veya fibrilli bir madde içeren katmanlı bir yapı oluşturur. Bu iki şekilde olabilir: ilk önce koyu renkli merkez oluşup, daha sonra çevresel silindir eklenerek; veya katmanlar daha sonra tek başlarına kıvrımlara bölünen bir retikulum şeklinde eşzamanlı olarak meydana gelebilir. Sporoblastta veya olgunlaşmamış sporda, kıvrımlar daha düzenli bir şekilde yerleşirler ve kıvrımın etrafında tek katlı bir zar meydana gelir. Bazı microsporidian patojenlerinde polar filamentin başkalaşımı bu aşamada kalır. Diğerlerinde katmanların daha fazla alt katmana bölünmesi söz konusudur.

Olgun bir sporun filament kıvrımlarının enine kesitlerinde, içten dışa doğru sırasıyla aşağıdaki tabakalar görülebilir:

I. Elektronca yoğun merkezden türeyen tabakalar:

- A. Orta yoğunlukta bir tabaka, bazen merkezinde koyu renkli bir nokta içerir.
- B. Az çok elektronca yoğun madde, bazı türlerde iki dar tel şeklinde görünebilmektedir.
- C. Dar, neredeyse şeffaf bir boşluk.
- D. İç ve dışında dağınık çerçevelere sahip orta yoğunlukta bir halka. Dış çerçeve kesitin merkezinden yaklaşık yarısı kadar uzaklıktadır.

II. Aradaki boşluk. Şeffaf veya orta elektron yoğunluğuna sahip tabaka, sıklıkla parlak fibrillerden yapıma gibi görünür (Liu ve Davies, 1973).

III. En dış halka en değişken tabakadır ve çoğu türde alt bölümlere ayrılmıştır. Vávra (1972) ve diğerleri (Takizawa vd., 1975) tarafından bildirilen polisakkaritler bu tabakanın iç çerçevesinde yer alıyormuş gibi görünürler.

IV. Tek katlı zar.

Eğer farklı türlerin I ve III. tabakaları karşılaştırılacak olursa çok belirgin farklar ortaya çıkar. Daha karmaşık hayat döngüsüne sahip microsporidian patojenleri daha fazla başkalaşım gösteren polar filamentlere sahip gibi görünmektedir.

1.1.5.2.4. Sporofor Kesesi

Canning ve Hazard (1982), pek çok microsporidian türünde gelişmekte olan ve bazen de gelişmiş sporları çevreleyen kese benzeri yapıyı ifade etmek için 'sporofor kesesi' terimini ortaya atmışlardır.

Çoğu sporofor kesesi oval veya küreseldir (Hazard ve Oldacre, 1975; Vávra vd., 1981). Şekil her tür için sabittir. Keseler bazı türlerde dar, uzunlamasına, silindirik veya iğ şekilli olabilmektedir (Vivarès vd., 1977; Hazard ve Oldacre, 1975; Larsson, 1984; Vivarès, 1975)

Bazen küresel sporofor keseleri, dört veya daha fazla kese içeren gruplar oluşturacak şekilde birbirlerine yapışırlar.

Sporofor kesesi kısmen kalıcıdır (Hazard ve Oldacre, 1975; Larsson, 1984). Diğer taraftan, alışılmadık şekilde kırılğan keseler de mevcuttur ve kese sıklıkla parçalanarak sporların konak dokusunun içine bırakılmasına neden olur.

Bazı cinslerin sporofor keselerinin gelişimi eşsizdir çünkü kese oluşumu merogoni sırasında başlar ve bunun sonucu olarak kese içinde birden fazla sporonta ait sporlar bulunur (Canning vd., 1979; Canning ve Nicholas, 1980; Canning ve Hazard, 1982). Merontun plazma zarının dışına elektron yoğunluğu fazla bir madde salgılanır, bu madde büyüyerek kalın, yoğun, amorf bir tabaka oluşturur. Sporogoni esnasında, sporogonial plazmodyum geri çekilerek amorf tabakanın sporofor kesesinin zarfı gibi görünmesine neden olur.

Sporofor kesesi genellikle sporont veya sporogonial plazmodyum tarafından oluşturulur, bu da kesenin tek bir sporontun bütün sporlarını içerdiği anlamına gelir. Oluşum başka şekillerde de olabilir. Bazı türlerde sporontun plazma zarı çoğalarak iki katlı hale gelir (Loubès ve Maurand, 1975; Codreanu ve Vávra, 1970; Larsson, 1981a; Canning vd., 1982). Dış tabaka sporont ile bağını yitirir ve sporofor kesesinin zarfı haline gelir.

Bazı cinslerde sporofor kesesinin zarfı sporogoni esnasında bölünür ve her bir spor kendine ait bir kese ile çevrelenir (Larsson, 1983; Larsson, 1981b).

Bazı microsporidian patojenleri, bazen kist olarak da isimlendirilen, kalın ve karmaşık bir sporofor kesesine sahiptir. Bu kistler konak hücre kaynaklı parazitofor keseleri gibi görünmektedir (Sprague vd. 1972; Vivier ve Schrevel, 1973; Purrini ve Weiser, 1984, 1985). Kalın duvarlı kese sporogonial plazmodyumun zarının dış kısmında oluşur. Plazma zarı duvar içine dâhil olmuş olabilir (örn. bakınız Ormières ve Sprague, 1973; Purrini ve Weiser, 1985).

Sporoblastların oluşumundan arta kalan fazlalıklar çeşitli içerikler şeklinde episporontal boşlukta kalır. Bunlar fibrilli, tübüler, kristalimsi veya granüler olabilir. Bu tür içerikler

sporoblast oluşumunun erken evresinde çok sayıdadır ve bu madde sporogoni sırasında kısmen kullanılır. Olgun sporlar içeren keselerde sadece birkaç küçük granül kalmaktadır.

Taksonomide kullanılacak belirgin tiplerde sporofor keseleri vardır. Aşağıda seçilmiş beş tip, sistematik çalışmalarının yalnızca ilk adımı olarak değerlendirilmelidir.

Tip I. Sporofor kesesinin zarfı kalın, $0.5- \geq 1$ μm , direk olarak sporogonial plazmodyumunun plazma zarının üstünde oluşur. Sitoplazma zarftan uzaklaşır ve sporoblastlar plazmotomi ile meydana gelir.

A. Zarf farklı morfolojiye sahip 2-3 katmana ayrılabilir. En iç katman elektronca en yoğun olandır.

B. İç kısımlarda az çok katmanlı madde içeren veya her yerde eşit şekilde elektronca yoğun zarf vardır. Yüzey tabakası poligonal plakalara bölünebilir. Zarfın iç kısımlarında yoğun alanlar halinde sitoplazma kalıntıları bulunabilir.

Tip II. Zarf kalındır 40-150 nm, az çok katmanlıdır; merogoni sırasında gelişmeye başlar ve sporogoni esnasında farklılaşır.

Tip III. Zarf öncülü kalıcı olan bir tek katlı zar veya daha kalın bir zarf olacak şekilde değişmiş gibi görünmektedir.

A. Sporofor kesesinin zarfı kalıcı tek katlı zar özelliğindedir; episporontal boşluk çeşitli şekillerde tübüler yapılar içermektedir.

B. Zarf c. 20 nm kalınlığında, üç katlı bir yapıya dönüşür; episporontal boşluk az çok çıkık tübüler yapılar içermektedir.

Tip IV. Zarf incedir, c. 5 nm. homojen elektron yoğunluğuna sahiptir. Sporogoni esnasında zarf bölünerek her bir sporu kendine ait bir kese içine alır.

A. Episporontal boşluk tübüler yapılardan yoksundur ancak ekzosporun yüzey tabakalarından oluşmuş geçici veya kalıcı extrasporal kılıfa sahiptir.

B. Episporontal boşluk c. 20 nm çapındadır, ince tübüler yapılar içerir, bunlar zarfın altında bir retikulum oluşturur.

C. Episporontal boşluk 65-75 nm genişliğinde retikulum oluşturmayan tübüler yapılara sahiptir.

D. Zarf iki katlı gibi görünür ve ekzospora noktasal olarak bağlanmıştır. Dış katman homojen elektron yoğunluğuna sahiptir, c. 5 nm kalınlığındadır. İç katman yan yana dizilmiş, c. 20 nm çapında tübüllerden oluşmuştur.

Tip V. Olgun sporları çevreleyen keselerin zarfları her yerde eşit şekilde elektronca yoğun, 5-30 nm kalınlığında, sporont tarafından oluşturulan tüm sporlar tek bir kese içinde bulunur. Sıklıkla lifli, tübüler, granüler veya kristalimsi yapılara sahiptir.

- A. Episporontal boşluk sadece ince tübüler yapılar içerir.
- B. Episporontal boşluğun içinden ekzospordan gelen az sayıdaki (2-6) kalın lifli projeksiyon geçmektedir.
- C. Episporontal boşluk c. 20 nm çapında dar tübüllere sahiptir.
- D. Episporontal boşluk 60 nm'den daha geniş çaplarda, bazen dar da olabilen, genellikle septalı tübüllere sahiptir.
- E. Episporontal boşluk sporogoni esnasında çok sayıda kristal benzeri yapıya sahipken sporun olgunlaşmasıyla beraber bunlar genellikle sayı ve boyut olarak küçülür.
- F. Episporontal boşluğun materyali sporogoninin başlangıcında lamellidir. Sporlar olgunlaştığında materyal Şekil değiştirerek tübüller haline gelir.
- G. Episporontal boşluğun tübülleri yay kıvrımları benzeri görünüme sahiptir.

1.2. Tezin Amacı

Yukarıda detaylı bir şekilde anlatıldığı üzere ülkemizde de önemli bir kabuk zararlısı olan *D. micans* ile mücadelede halen aktif bir şekilde kullanılmakta olan türe özgü predatörü *R. grandis*'in üretilerek biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmasını olumsuz etkileyebilecek parazit ve patojenlerinin araştırılması son derece önemlidir. Bu tezin amacı böcek yetiştirilen laboratuvarlarda yayılması halinde *R. grandis*'in üretimini olumsuz etkileyebilecek parazit ve patojenleri belirleyerek bunlara karşı üreticileri uyarmaktır. Bal arısı *Apis mellifera* ve ipek böceği *Bombyx mori*'de görülen microsporidian hastalıkları bu faydalı böceklerin yetiştirilmesini yukarıda da anlatıldığı gibi olumsuz yönde etkilemektedir. Bunlara benzer bir şekilde *R. grandis*'te de hastalık yapan bir microsporidian patojeni olması ihtimali söz konusudur. Microsporidian hastalıkları diğer bazı parazit ve patojenlerin aksine daha öldürücü ve bulaşıcı olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada microsporidian türlerine daha fazla ağırlık verilmektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Böceklerin Elde Edilmesi

2006 – 2008 yılları arasında yapılan bu çalışmada incelenen *R. grandis* erginleri iki şekilde elde edildi. Böceklerin bir kısmı üretildikleri laboratuarlardan talep edildi ve bir kısmı da doğal ortamlarından; ladin ağaçlarındaki *D. micans* galerilerinden bizzat toplandı.

Bir kısım *R. grandis* ergini Türkiye Orman Bakanlığı tarafından dört ilde kurulmuş beş farklı laboratuardan alındı. Bu laboratuvarlar *D. micans*'ın yaygın olduğu ve biyolojik mücadele için *R. grandis*'lerin üretildiği Artvin, Giresun, Ordu ve Trabzon illerinde bulunmaktadır. Bu laboratuvarlarda yukarıda anlatıldığı gibi kültürlerde üretilmiş olan *R. grandis*'ler kullanılacakları zamana kadar uygun koşullarda saklanmaktadır.

Araziden toplanan böcekler temiz ve kuru tüpler içerisine konuldu. Numunelerin ölmesini ve kaçmasını önlemek için özel delikli tıplar kullanıldı. Kontaminasyonu ve böcekler arası bulaşmayı önlemek amacıyla, bir tüpte sadece bir numune bulundurmaya özen gösterildi. Numuneler serin ve kuru bir yerde saklandı; bakteri üremesi microsporidian sporları hariç diğer evrelerini bozabileceği için, numuneler en kısa zamanda laboratuara ulaştırıldı. Laboratuara getirilen böcekler ya hemen incelendi veya 4°C'de kuru ve karanlık bir ortamda saklandı.

2.2. Makroskobik İncelemeler

Bazı makroskobik olarak gözlemlenebilen semptomlar microsporidian enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilebilir, örneğin renk değişiklikleri, aşırı büyümüş dokular, deri değiştirme anormallikleri veya kütikül üzerinden görülebilen renk değişiklikleri. Bazı microsporidian patojenleri konaklarının davranışlarını ve verimliliklerini de gözle görülür bir şekilde etkileyebilmektedir. Ancak bu çalışmada kayda değer makroskobik semptomlar gözlenmedi. Sadece diseksiyon sırasında hemolenfin belirgin beyaz renk alması diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi yoğun microsporidian enfeksiyonu için de bir belirti sayılabilir. Buna rağmen bazı böceklerde bir mantar türü de hemolenfe aynı beyaz görünümü verebildiğinden, beyaz renk görülen böcekte microsporidian enfeksiyonu varlığına kesin gözüyle bakılamamaktadır.

2.3. Mikroskopik İncelemeler

Bu çalışmada yapılan mikroskopik incelemeler iki başlık altında detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. Microsporidian enfeksiyonu belirtileri ilk olarak ışık mikroskobu ile tespit edilmektedir ancak Giemsa boyaması olmadan kesin olarak microsporidian enfeksiyonu varlığı teşhis edilemez. İkinci aşamada elektron mikroskobu çalışmaları microsporidian sporlarının morfolojik özellikleri ve tür teşhisinde de kullanılan karakteristik özelliklerinin belirlenmesi için önemlidir.

2.3.1. Işık Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar

Işık mikroskobu altında microsporidian patojenin hayat safhaları faz kontrast mikroskobisi ile gözlemlenebilmektedir. En belirgin hayat safhası spordur, sporlar ışık mikroskobu ile rahatlıkla fark edilebilmektedir. Yuvarlak, çoğunlukla çok çekirdekli vejetatif safhalar (merontlar) faz kontrast ile nadiren de olsa görülebilmektedir. Girişte ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi spor şekil ve boyutları türlere göre değişebilir; ancak, bir tür içerisinde göreceli olarak bir örnektirler. Faz kontrastta serbest sporlar ışığı kendine özgü bir şekilde kırarlar. Türüne göre tek başına sporlar halinde ve/veya spor keseleri içinde bulunabilirler.

2.3.1.1. Taze Preparatların Hazırlanması ve İncelenmesi

Taze preparat hazırlanması sırasında öncelikle böcek iki eşit parçaya ayrıldı, parçalardan biri Ringer's solüsyonu içinde disekte edildi. Enfeksiyon gözlenmesi halinde böceğin geri kalan parçaları elektron mikroskobu çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlandı veya daha sonra kullanılmak üzere -2°C'de saklandı. Ringer's solüsyonu böcek dokuları için en ideal izotonik ortamı oluşturduğu için diseksiyon yapılırken bu solüsyon kullanıldı. 8,0 gr Sodyum klorür (NaCl), 0,25 gr Kalsiyum klorür (CaCl₂), 0,25 gr Potasyum klorür (KCl) ve 0,25 gr Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) 1000 ml distil su içinde çözülerek Ringer's solüsyonu hazırlandı. Disekte edilen böcek dokuları ezme preparat hazırlamak için kullanıldı. Taze preparatlar ışık mikroskobu (Olympus CX41) altında 40-1000x büyütme ile incelendi. Bulunan enfeksiyonların ölçümleri DP-25 dijital kamera ve DP2-BSW resim sistemli aparata sahip Olympus BX51 ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı ve resimleri çekildi (Yaman ve Radek, 2007).

2.3.1.2. Microspordian Patojeninin Giemsa ile Boyanması

Pek çok parazitin gelişim aşamalarının çalışılması için açık havada kurutulmuş numuneler Giemsa boyası ile boyanır. Giemsa boyası çekirdek ve sitoplazmadaki yapıların ayırt edilebilmesine olanak sağlayacak özellikte bir boyadır. Microsporidian patojenlerinin teşhisinde sporların çekirdeğini boyayıp spor duvarının beyaz kalmasını sağlayarak önemli bir rol oynamaktadır. Microsporidian türlerinin vejetatif safhaları da Giemsa boyaması ile açığa çıkarılabilir. Özellikle tür teşhisi yapılması gereken durumlarda hayat safhalarının Giemsa boyalı preparatlarda aydınlatılıp fotoğraflanması önemlidir.

Boyama yapılmadan önce numune hazırlandı. Eğer numune ıslaksa, fazla suyu uzaklaştırılmalıdır. Taze materyal ince bir tabaka halinde lamın üzerine yayıldı. Lam doğal yollardan açık havada oda sıcaklığında tamamen kurumaya bırakıldı. Hazırlanan slayt, numune tarafı yukarıda kalacak şekilde boyanacaklar rafına kondu. Metil alkol'de çözünmeyecek şekilde etiketlendirildi. Slayt, numune tarafı boşta kalacak şekilde metil alkol küvetine konuldu. 3 dakika boyunca saf metil alkol içerisinde bekletildi. Metil alkolden çıkarıldı oda sıcaklığında açık havada kurumaya bırakıldı. Distil su içinde %5'lik Giemsa boyası hazırlandı. Boyaya koymadan önce numunenin hidroklorik asit (HCl) ile muamele edilmesi spor duvarını incelterek boyanın spor içerisine daha iyi bir şekilde girmesine ve böylelikle spor içindeki çekirdeğin daha belirgin bir şekilde boyanmasına yardımcı olur. Bazı numunelerde bu işlem uygulandı. Slayt 10 saat boyunca Giemsa boyası içerisinde bekletildi. Bekleme süresi numunenin türüne ve boyanın yoğunluğuna göre değiştirildi. Örneğin, numune hidroklorik asit ile muamele edildiğinde bu süre kısaltıldı. Slaytlar musluk suyuyla yıkandı. Eğer boya çok koyu ise, su ile yıkama süresi uzatılarak boya azaltıldı. Oda sıcaklığında açık havada kurumaya bırakıldı. Boyayı korumak amacıyla slaydın üzerine lamel kapatılabilir. Boyama işlemi sonucunda sitoplazma mavimsi mor boyanırken çekirdek kırmızı boyandı. (Becnel, 1997)

2.3.2. Elektron Mikroskobu ile Yapılan Çalışmalar

2.3.2.1. Diseksiyon ve Fiksasyon

İncelenen böcekler diskte edilirken thorax ve abdomenleri iki eşit parçaya ayrıldı, parçalardan biri taze preparat hazırlanması için kullanıldı ve ışık mikroskobu altında inceledi.

Geri kalan kısım enfeksiyona rastlanması durumunda elektron mikroskobu numuneleri hazırlamak için saklandı. Işık mikroskobu ile enfeksiyon varlığı tespit edilen böceklerin elektron mikroskobu için saklanan kısımları pH'ı 7,2 olacak şekilde ayarlamak için 0.1 M cacodylate tamponu ve %2,5 gluteraldehit çözeltisinde iki saat süreyle fikse edildi. Daha sonra 0,1 M cacodylate tampon çözeltisiyle (pH 7,2) her sefer 10 dakika olmak üzere (toplamda 30 dakika) 3 kere yıkandı. Durulamaların ilk fiksatifle fiksasyon sonrası kimyasalları arasında reaksiyon gerçekleşmemesi için titizlikle yapılmasına dikkat edildi. Fiksasyon sonrasında numuneler %2 OsO₄ ile %3 K₄{Fe(CN₆)} çözeltilerinin 1:1 karışımı içinde yaklaşık 2 saat süreyle bekletilerek zayıflatıldı (Karnovsky, 1971). Bu aşamada tüpler alüminyum folyo ile sarıldı. Her biri 10 dakika olmak üzere 3 kere toplam 30 dakika süreyle 0,1 M cacodylate tampon çözeltisi ile yıkandı. Dehidrasyon işlemine başlandı. (Becnel, 1997)

2.3.2.2. Dehidrasyon

Dehidrasyon, materyali giderek artan alkol serisinden geçirerek saf alkole, daha sonra da saf asetona transfer etmek anlamına gelir. Bu sonuca aşağıdaki işlemler sırayla uygulanarak ulaşıldı. Numuneler sırasıyla 15 dakika, %30 etanol; 15 dakika, %50 etanol; 15 dakika, %70 etanol içinde bekletildi. Daha sonra 3 kere 10'ar dakika, %90 etanol; 3 kere 10'ar dakika, %96 etanol ve 3 kere 10'ar dakika, %100 etanol içinde bekletildi. Ertesi güne bırakılması gerektiğinde ya da 1-2 gün ara verileceği zaman numuneler %70 etanolde veya %25 resinde bırakıldı. (Becnel, 1997)

2.3.2.3. İnfiltrasyon ve Gömme

Numuneler dehidrasyon materyali tamamen gömme materyaliyle yer değiştirmeye kadar bir dizi solüsyondan geçirilmek suretiyle gömme materyaliyle infiltre edildi. Gömme materyali olarak Spurr's resin kullanıldı (Spurr, 1969). Bu işlem küçük tüpler içinde bir karıştırıcıda yapıldı. Bütün seyreltmelerde aktivatörün mutlaka bulunmasına özen gösterildi ve saf resinden sonra, dokular kapsüllere aktarıldı, saf resin ile dolduruldu ve bir fırında polimerize edildi. Öncelikle numuneler 1:1 resin, etanol karışımı içinde 1 saat kadar bekletildi, daha sonra 1:3 resin etanol karışımı içinde 4 saat, son olarak saf resin içinde bütün gece bekletildi. Bu işlemlerden sonra numuneler Beem kapsüllerine gömüldü ve etiketlendi. Etüvde, 70°C'de ortalama 48 saat süreyle sertleşmeye bırakıldı. Daha iyi infiltrasyon için,

özellikle sporlar için, numunenin saf resinde bekleme süresi bir veya birkaç gün daha uzatıldı ancak saf resin her gün değiştirildi. Daha sonra normal gömme işlemi uygulandı. Resinlerden ultra mikrotom kullanılarak kesitler alındı, bu kesitler Pioloform kaplı bakır ızgaralar üzerine yerleştirildi, doymuş uranil asetat ve Reynold's kurşun sitrat (Reynolds, 1963) boya ile boyandı. Boyama için sırasıyla önce bir damla uranil asetat bir petri kabı içerisinde bir parça temiz parafilm üzerine damlatıldı. Pioloform kaplı bakır ızgara damlanın üzerinde yüzecek şekilde, numunenin olduğu taraf altta kalmak suretiyle bırakıldı. 5-10 dakika sonra, ızgara distil su içine daldırılmak suretiyle yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra bir damla kurşun sitrat boyası bir petri kabı içinde temiz bir yüzeye damlatıldı, ızgara numunenin olduğu taraf üstte kalacak şekilde içine yerleştirildi ve 5 dakika süreyle boyandı (Becnel, 1997). Boyanan kesitler Almanya'da Philips JM 280 transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak incelendi ve fotoğraflandı (Yaman ve Radek, 2007).

2.3.2.4. Microsporidian Patojeninin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Microsporidian türleri için en belirgin hayat evresi spor olduğundan sporun morfolojik özelliklerine dayanarak sınıflandırma yapılır. Sınıflandırmada kullanılan morfolojik özelliklerin çoğu ancak elektron mikroskobuyla gözlemlenebilir. Elektron mikroskobu ile belirlenebilen morfolojik özellikler spor boyutları, şekli ve varsa kese içindeki spor sayısı; spor kesesine sahip olup olmama, konak sitoplazmasıyla doğrudan temas etme veya etmeme; çekirdek sayısı, hayat döngüsü evrelerindeki çekirdek sayıları; spor duvarı yapısı; endospor ve ekzospor kalınlıkları; polar filament kıvrım sayısı, kalınlığı, katman sayısı, izofilar veya anizofilar oluşu ve ayrıca polaroplast ve posterior vakuolün morfolojileridir.

3. BULGULAR

3.1. *R. grandis*'te Microsporidian Enfeksiyonunun Belirlenmesi

R. grandis'te microsporidian enfeksiyonunun belirlenmesi aşağıdaki standart yöntem sonucu tesadüf eseri gerçekleşmiştir. Burada bahsedilen bu faydalı predatör böcekte daha önce hiçbir microsporidian patojeni bulunmamış olduğu için böyle bir enfeksiyonun var olabileceği önceden kesin olarak bilinmemekle beraber olasılıklar arasında değerlendirilmiştir. Böcekler tek tek disekte edilerek taze preparatlar hazırlandıktan sonra ışık mikroskobu altında 400x büyütme ile microsporidian enfeksiyonunun en belirgin evresi olan sporların varlığı araştırılmıştır. Işık mikroskobu ile enfeksiyon varlığı tespit edildiğinde fiksasyon ve Giemsa boyaması yapılarak kuru yayma preparatlar hazırlanmıştır. Bu preparatlar ışık mikroskobunda incelenerek enfeksiyon teyit edilmiştir. Son olarak enfeksiyonun belirlendiği böceklerin dokuları gluteraldehit içersinde fikse edildikten sonra dehidrasyon, infiltrasyon, gömme, kesit alma ve boyama işlemleri sonucu elektron mikroskobu ile incelenerek resimleri çekilen microsporidian patojeninin teşhisi, tanımlanması ve isimlendirmesi yapılmıştır.

3.2. Microsporidian Enfeksiyonunun Makroskopik Görünümü

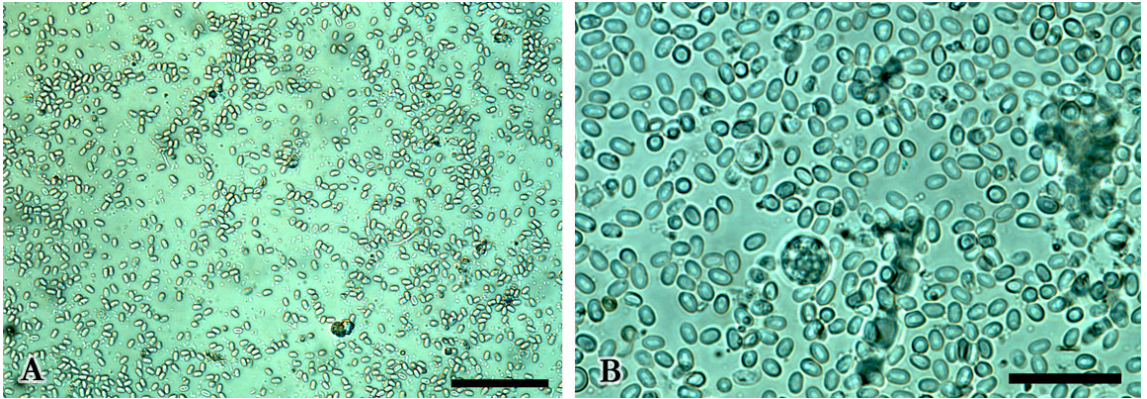
Microsporidian enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilebilecek bazı makroskopik olarak gözlemlenebilen semptomlar; renk değişiklikleri, aşırı büyümüş dokular, deri değiştirme anormallikleri veya kütikül üzerinden görülebilen renk değişiklikleri olarak sıralanabilir. Hatta bazı microsporidian enfeksiyonlarında böceklerin davranışlarında ve genel canlılıklarında farklılıklar görülebilmektedir. Literatürde dişi böceklerin verimliliğinde de azalmaya neden olabilen microsporidian enfeksiyonlarına örnekler vardır (Joudrey ve Bjørnson, 2007). Ancak bu çalışmadaki microsporidian enfeksiyonunun belirgin makroskopik semptomları gözlemlenmemiştir. Diseksiyon sırasında bazı böceklerin hemolenfinin beyaz bir renk aldığı gözlemlendi. Bu durum yoğun microsporidian enfeksiyonu belirtisi varlığına işaret edebilir. Buna rağmen bir mantar türü de hemolenfe aynı beyaz görünümü verebilmektedir, bu nedenle hemolenfinde beyaz renk görülen böceklerde microsporidian enfeksiyonu varlığına kesin gözüyle bakılamamaktadır.

3.3. Microsporidian Enfeksiyonunun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi

Bu çalışmada yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular iki başlık altında detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. İlk olarak ışık mikroskobu kullanılarak taze ve kuru preparatlar incelenmiştir. Işık mikroskobunda microsporidian enfeksiyonu ışığı farklı bir şekilde kıran sporların 400x büyütmede gözlemlenmesi ile tespit edilmiştir. Daha sonra microsporidian enfeksiyonunun varlığını kesin olarak kanıtlamak için gerekli olan Giemsa boyaması yapılmıştır. İkinci başlık altında ise TEM çalışmalarında elde edilen bulgular detaylı olarak anlatılmaktadır. Transmisyon Elektron mikroskobu çalışmaları, Microsporidian patojenin sporlarının morfolojik özellikleri ve tür teşhisinde de kullanılan karakteristik özelliklerinin belirlenebilmesi için yapılmıştır.

3.3.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları

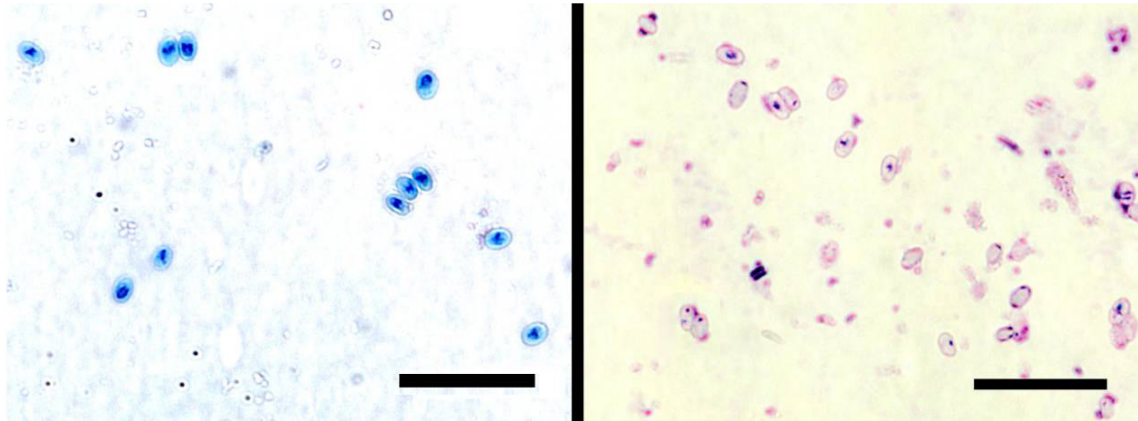
Işık mikroskobu incelemeleri sırasında taze preparatlarda faz kontrast mikroskobisi ile microsporidian patojenin hayat safhaları aranmıştır. En belirgin hayat safhası olan sporlar ışık mikroskobu altında 400-1000x büyütmede gözlemlenmiştir. Laboraturalardan ve araziden alınan toplam 2963 *R. grandis* ergini ve larvası incelenmiştir. Enfeksiyona yalnızca Trabzon ve Artvin kitle üretim laboratuvarlarından elde edilen örneklerde rastlanmıştır. Enfeksiyon oranı ortalama olarak % 0,16 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon 2007'nin Ekim ayında Artvin ilinde % 10'a yükselmiştir.



Şekil 9. Microsporidian sporlarının taze preparatlarının ışık mikroskobu fotoğrafları A. 400x büyütme (Bar: 50 µm), B. 1000x büyütme (Bar: 20 µm).

Gözlemlenen yapıların microsporidian patojenine ait spor evreleri olduğu; ışığı kendilerine has bir şekilde kırmaları ve yaklaşık aynı şekil ve ebatlara sahip olmaları sayesinde doğrulanmıştır (Şekil 9). Sporlar geniş ovaldir, şekil ve boyutları birbirine çok yakın olan sporların boyları $3,75 \pm 0,27$ ($2,91 - 4,24$) μm ($n = 32$) x $2,48 \pm 0,13$ ($2,25 - 2,9$) μm ($n = 34$) olarak ölçülmüştür.

Sporların başka bir mantara değil microsporidian patojenine ait olduğunu kanıtlamak için Giemsa boyaması yapılmıştır. Fiksasyon ve boyama işlemlerinden sonra yapılan ölçümlerde sporların boyları $3,68 \pm 0,26$ ($3,18 - 4,17$) μm ($n = 32$) ve enleri $2,29 \pm 0,21$ ($2 - 2,79$) μm ($n = 33$) olarak kaydedilmiştir. Giemsa ile boyalı sporların büyük çoğunluğunda merkezi tek çekirdeğin belirgin bir şekilde koyu mavi renkte olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 10). Boyalı preparatlarda gözlenebilen bir diğer yapı da sporun posterior kutbunda değişik bir renkte boyanmış tanecikler şeklinde göze çarpan Golgi aygıtının kalıntılarıdır. İncelenen böcekler ölü olduğu için bakteriler tarafından çoğu yok edilmiş olan merogoni evrelerine, Giemsa ile boyanmış yayma preparatlarda rastlanmamıştır. Genç sporlar ve sporoblastlar geniş oval şekildedir ve çekirdekleri boyanmıştır. Nadiren rastlanan geniş oval şekilli sporoblastları bir arada bulduran morula-benzeri evrelerin geçici sporofor keseleri olduğu tahmin edilmektedir. Sporlar bu yapılardan olgunlaşmanın erken safhalarında salıverilirler.



Şekil 10. Giemsa boyalı microsporidian sporlarının ışık mikroskobu fotoğrafları (Bar: 20 μm).

3.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Çalışmaları

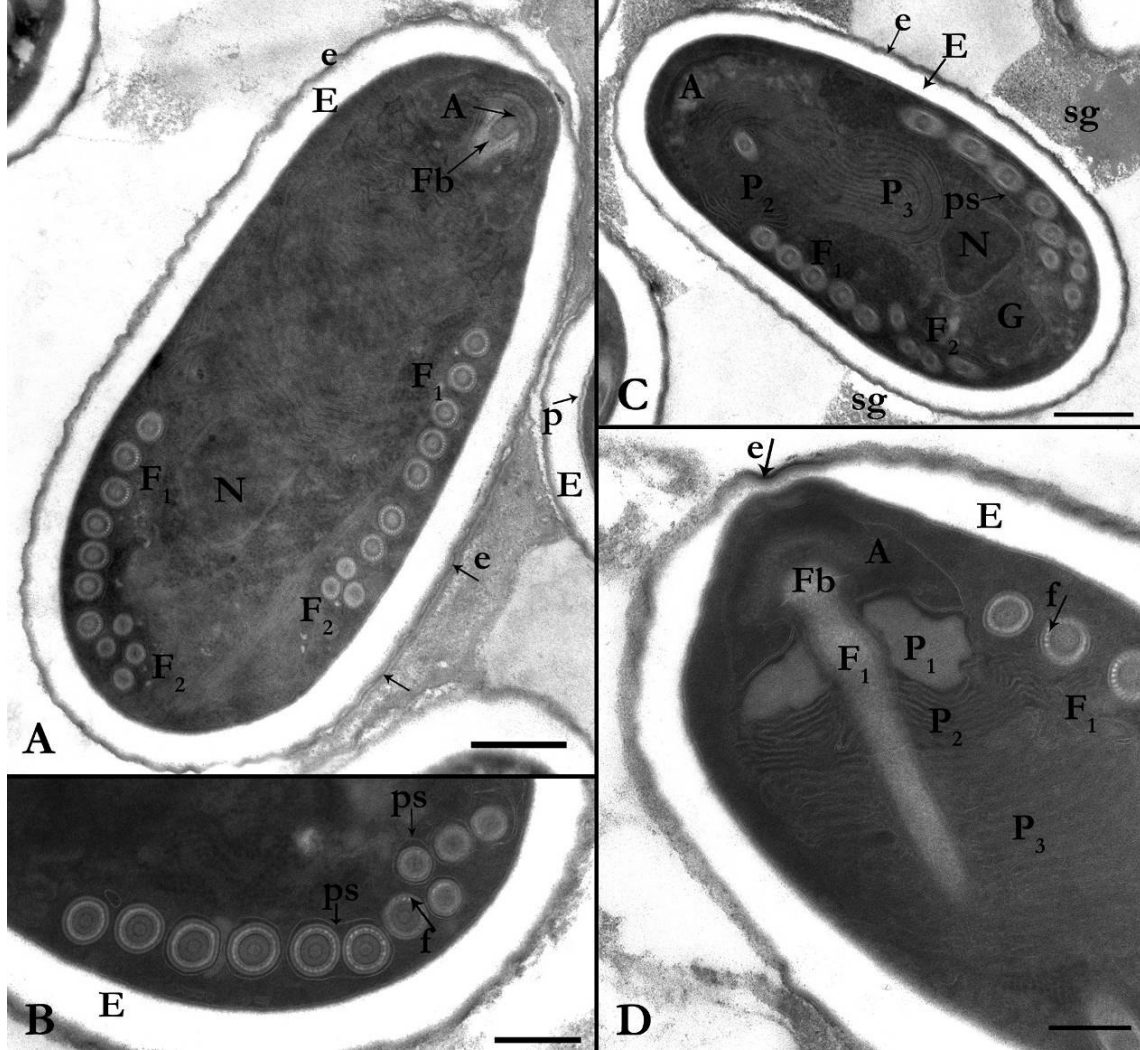
Yukarıda detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi elektron mikroskobu için hazırlanarak kesit alınan numunelerde sporlar daha zarif, uzun oval şekilde görülmektedir. Spor duvarı 200-280 nm kalınlığında, elektron yoğunluğu fazla dalgalı bir ekzospor (60-80 nm) (Şekil 11, 12, e) ve

elektron yoğunluğu düşük pürüzsüz bir endospordan (200-210 nm) meydana gelmiş bir yapıdır. Sporun apikal ucunda polar filamentin subapikal birleşme noktasında endospor 80 nm'ye incelir (Şekil 11-D, Ok). Sporun içeriği bir plazma zarı ile çevrelenmiştir (Şekil 11-A, p). Anchoring disk (A) ince bir zar ile çevrelenmiş, vakuollü, kalın bir çerçeveye sahip hacimli bir kâseye benzetilebilir. Polaroplast (Şekil 11, P) üç yapı içermektedir. En üst tabaka (P_1) birbirine karışan loblu bir küttedir, orta kısım (P_2) 8 ile 10 arası bir dizi yoğun lamelden meydana gelir ve posterior tübüler kısım (P_3) sporun orta kısmına kadar yayılan daha geniş halka ve tabakalardan meydana gelmiştir. Polar filament (F) bazal, manubrial kısmında soğan benzeri bir yapı (Şekil 11, Fb) ile anchoring diske bağlanır ve 150-160 nm çapında düz bir boru şeklinde, sporun posterior kısmına ilerler orada derin bir açılı ile bükülerek 10-11 anisofilar kıvrım yapacak şekilde döner (Şekil 11-B). İlk yedi kıvrım, içyapılarının eksiksiz bir şekilde görülebildiği enine kesitlerde, polar filamentin duvarı içinde 20-23 parlak fibrille sahiptir. Polar filamentin bu kısımda çapı 150-160 nm'dir. Filamentin son üç veya dört kıvrımı sadece 60-80 nm çapındadır ve fibrillerden oluşmuş bir halka yapısına sahip değildir, sadece polar tüpün amorf yüzey tabakaları görülebilmektedir. Yanal görünümdeki, elektron yoğunluğu düşük fibriller filament boyunca gevşek kıvrımlar ile dolanan tespih benzeri bir yapıdan (Şekil 11-B,D, f) meydana gelmektedir. Apikal uçta fibriller çift katlı sıkı bir bulbustan oluşmuştur (Şekil 11-A,D, Fb). Polar filament Golgi sistemiyle bağlantılı bir polar kese içerisinde meydana gelmektedir (Şekil 11-B, ps). Genç sporlarda polar filament polar kese ile astarlanmış vakuoller içinde oluşmaktadır (Şekil 11-B, ps), daha sonra polar kese, kıvrımlanan polar filamentte yapışık halde kalmaktadır (Şekil 11-B, ps).

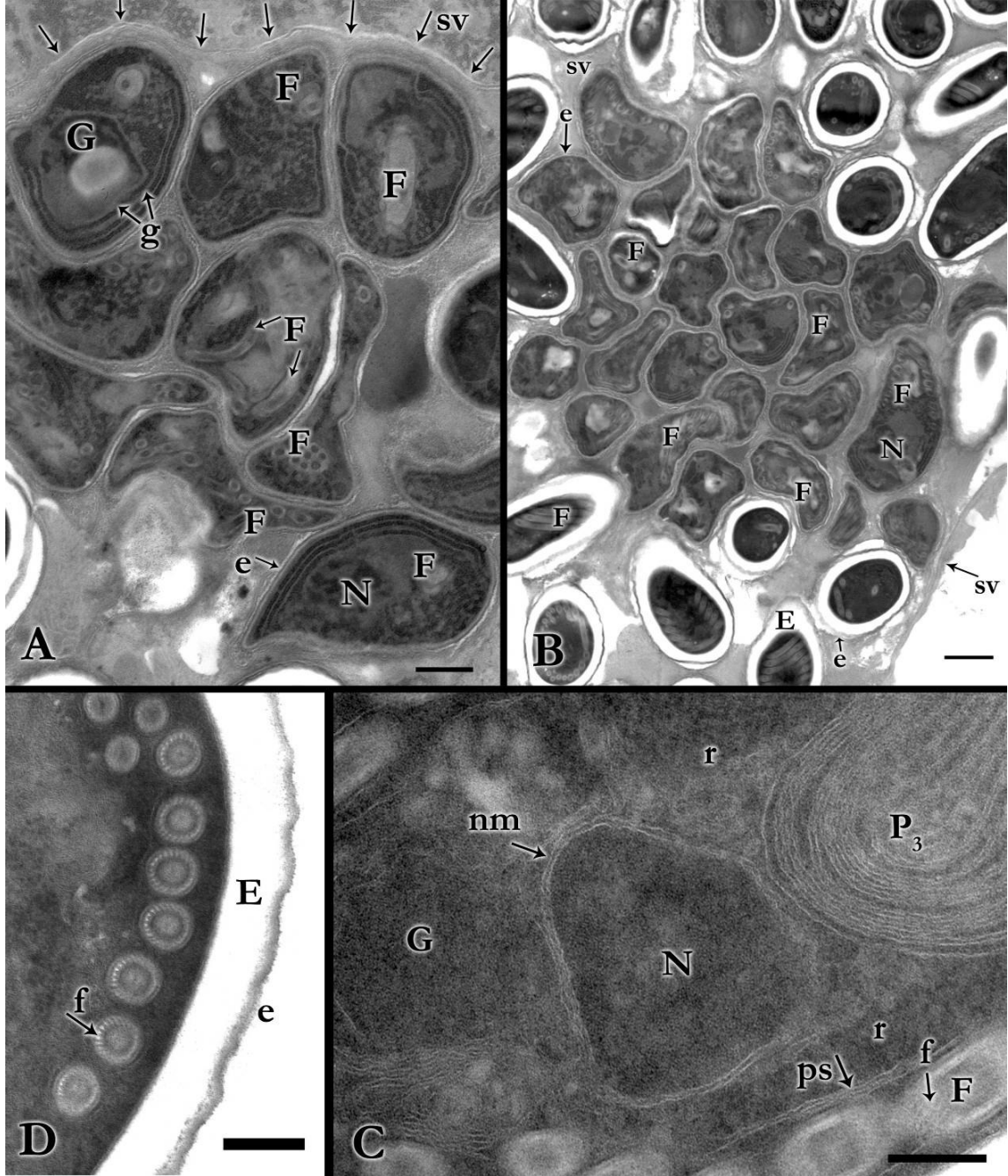
Küresel bir şekle sahip olan çekirdek, sporun merkezinde bulunmaktadır (Şekil 11, 12, N). Sporun posterior kısmında Golgi (G) aygıtının, Giemsa ile boyalı preparatlarda farklı boyanmış bir granül olarak göze çarpan, yuvarlak kütleli bulunmaktadır (Şekil 11, 12, G). Bu yapı polar filamentin uç kısmını çevreleyen lameller ile bağlantılıdır (Şekil 12-A, g).

Olgun sporlar granüllü salgılardan oluşmuş köprüler ile birbirlerine bağlanmaktadır (Şekil 11-C, sg). Bunlar böceğin vücudunda sporlar ile dolu parazitofor kesesinin içini dolduran ince granüllü maddenin kurumuş kalıntılarıdır. Olgun spor yoğunluğunun arasında, genç sporlar ve ileri sporoblastlardan oluşan, 30 veya daha fazla üyenin sporofor keseleri içinde bir arada bulunduğu gruplar vardır (Şekil 12). Bu gruplar kalıcı bir duvara sahip değildir. Sporların olgunlaşması sırasında elektron yoğunluğu düşük endospor meydana gelmeden önce kaybolan sporofor kesesinin kalıntıları Şekil 12, sv'de görülebilmektedir. Bu grupların kesitlerinde sporoblastlar birbirlerine yapışık halde yumuşak ve deforme olmuş haldedir. Sporoblastlar, nihayetinde merkezi Golgi sarmalının (G) yapılarıyla birleşen, 30 nm kalınlığında, granüllü,

elektron yoğunluğu yüksek bir ekzospor (Şekil 12-A, e) altında, Golgi membranlarının bir ile üç arasında değişen elektron yoğunluğu fazla tabakalarını (Şekil 12-A, g) içermektedir. Bunlar polar filamentin meydana geldiği polar keseyi (ps) beslemektedirler.



Şekil 11. Microsporidian sporlarının elektron mikroskobu fotoğrafları 1 A. Olgun sporun enine kesiti normal (F_1) ve ince (F_2) filament kıvrımlarının tamamı görülebilmektedir. B. Bir başka kesitte polar filament kıvrımlarının büyütülmüş görünümü. C. Genç sporun yanal kesitinde çekirdek belirgin olarak görülebilmektedir. D. Bir başka kesitte anchoring diskin büyütülmüş görünümü. (Ölçekler: A ve C: 1000 μm , B ve D: 500 μm . A: anchoring disk, F_1 , F_2 : polar filament, P_1 , P_2 , P_3 : polaroplast bölgeleri, E: endospor, Fb: filament tutunma bölgesi, e: ekzospor, f: filament fibrilleri, sg: granüllü salgı köprüleri, N: nükleus, G: golgi, ps: polar kese, p: plazma zarı).



Şekil 12. Microsporidian sporlarının elektron mikroskobu fotoğrafları 2 A. Sporofor kesesi içinde filamentin oluşumu aşamasındaki sporoblastlar. B. Olgunlaşmakta olan sporlar ile spor öncesi evreler, sporofor kesesinin duvarı parçalanmış. C. Olgun sporun orta kısmının yakından görünümü. D. Polar filament kıvrımlarının yakından görünümü. (Ölçekler: A: 50 μ m, B: 1000 μ m, C: 200 μ m, D: 500 μ m. N-çekirdek, A-anchoring disk, F-polar filament, G-Golgi aygıtı, g-Golgi membranları, E-endospor, e-ekzospor, P₁,P₂,P₃-polaroplast bölgeleri, sv-sporofor kesesi, nm-çekirdek zarı, ps-polar kese, r-ribozomlar, f-filament fibrilleri)

4. TARTIŞMA

İncelenen ergin *R. grandis*'ler arasında enfeksiyona yalnızca laboratuarlardan elde edilen ölü böceklerde rastlandı. Araziden toplanan canlı böceklerde 2006 – 2008 yılları arasındaki tez çalışmaları süresince microsporidian enfeksiyonuna rastlanmadı. Bunun nedeni muhtemelen araziden toplanan böcek sayısının az olmasıdır, çünkü bu çalışmada üretim laboratuvarlarındaki böcekler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu nedenle bu çalışma süresince canlı dokuda enfeksiyonun etkilediği dokuları ve patojenin hayat safhalarının bir kısmını gözlemek mümkün olmadı. Ancak, bundan sonra doktora çalışmaları sırasında arazi incelemeleri sürdürülecek buna ek olarak patojenin enfekte ettiği dokular, merogoni evreleri ve konak spektrumu, bioassay deneyleri yapılarak aydınlatılacaktır. Sporların konak dokuya ait kalıntılar içermeyen parazitofor keseleri (pv) içinde yoğunlaşmış olduğu gözlemlendi. Bu durum sistematikte kullanılacak çok önemli bir karakteristik özelliktir. TEM kesitlerinde görüldüğü kadarıyla içyapılarının detaylarından sporların enfeksiyon yapma özelliklerini kaybetmedikleri anlaşılmaktadır. Enfeksiyonun son evresi sporların, aralarında ince granüllü bir salgı ile birlikte, konak dokusunun bazı kısımlarını bir bütün halinde istila ettiği evredir. Kesitlerde ince granüllü bir salgı içersinde 30 veya daha fazla bireyin bir arada bulunduğu genç spor grupları şeklinde tekli sporogoni evreleri gözlemlendi. Bu nedenle enfeksiyonun *R. grandis*'te son evrelerine kadar ilerlemiş olduğu tahmin edilmektedir. Merogoni evrelerinin gözlemlenmemesinin muhtemelen enfeksiyonun ilerlemiş olması ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Sporontlar polar filamentlerini, endosporlarını oluşturmadan önce meydana getirirler bu da sporların şişmesine neden olur. Şekil 12-D'deki gibi tek başına duran pek çok olgun sporun çok sayıda spor içeren bir sporofor kesesi (pansporoblast) içinde meydana geldiğine dair herhangi bir kanıt yoktur. Genç sporlar endospor oluşmadan deforme olup enfeksiyon oluşturma özelliklerini kaybetmişlerdir. Orijinal bir kese zarının kalıntıları serbest sporlarla temas bölgesinde pansporoblastların üzerinde görülebilmektedir (Şekil 12-B, sv). Genç sporlarda polar filamentin oluşması elektronca yoğun Golgi zarlarının (g) yapışık olduğu polar kesenin (Şekil 12-C, ps) içinde boş bir bölgede olmaktadır. Bu durum polar kesenin meydana gelen filament ile birlikte spiral şekilde dolandığının kanıtıdır. Polar filamentin normal kıvrımı olgun sporun katı boşluğunda oluşmaktadır. Filamentin enine kesitlerinde görülen elektron yoğunluğu düşük parçacıklar, polar tüpün duvarı içinde kıvrılan uzunlamasına fibrilli yapılarıdır. Bunlar boru benzeri bir yapı içinde bulunan küresel parçacıklardan meydana gelmektedir (Şekil 12-C, f). Filamentin yapısı Vávra ve Larsson,

1999 tarafından verilen bilgilerle tutarlıdır. İpliklerin spiral yerleşimi Thiery (1972) tarafından yapılan *Nosema whitei*'nin ve *Artemia salina*'dan izole edilen bir başka microsporidian patojenin fibrillerinin karbonhidrat reaksiyonu ile ilgili çalışmalar sayesinde doğrulanmıştır. Şekil 11-B ve 11-C'deki kesitler Vávra ve Larsson'a göre polar kesenin meydana gelmesi ile ilgili daha fazla detay barındırmaktadır. Polar kese sporun dış kenarlarında polar filamentin kıvrımını çevreler (Şekil 11-B, ps).

Bütün enfekte böcekler ölü olduğu için *R. grandis*'te microsporidian patojenin enfekte ettiği dokular tespit edilememiştir. Bu nedenle parazitin hayat döngüsünün merogonial evreleri çalışılmamıştır. Literatürde *R. grandis*'te daha önce microsporidian enfeksiyonuna rastlandığına dair bir kayıt bulunmamaktadır ve bu böcekten bu güne kadar bildirilen tek diğer patojen Yaman ve Radek (2007) tarafından bildirilen *Helicosporidium* sp.'dir. Bu patojen aynı zamanda *R. grandis*'in özgün avı *D. micans*'ta da hastalık yapmaktadır. Yaman ve Radek (2007) *Helicosporidium*'un her iki böcek için ortak bir patojen olduğunu öne sürmektedir. *Helicosporidium*'un taşınımı detaylar açısından microsporidian türlerinin taşınımından farklıdır, bu da muhtemelen *D. micans*'tan henüz bir microsporidian patojeni bulunamamasının sebebidir. Pek çok microsporidian türü oldukça geniş bir konak spektrumuna sahiptir ve özdeş ekolojik koşullara sahip farklı zoo-coğrafi bölgelerde ortaya çıkarlar. Bu patojenler istilaya uğramış ağaçlardaki eski galerilerde genellikle yeni yumurtadan çıkmış böceklerin olgunlaşması sürecinde, eski ve yeni galeri sistemlerinin iç içe geçtiği kalabalık koşullar altında, bir böcekten ötekine bulaşır. Bulaşma için bir başka fırsat da uçuş zamanları ve hayvanların hasarlı ağaçlarda kümelenmesidir. Farklı kabuk böceği türleri aynı ağacın farklı bölgelerinde yaşarlar ve enfeksiyonların bir konak türünden bir başka konak türüne geçme ihtimali vardır. Buna benzer bir durum *D. micans* ve *R. grandis* için de söz konusudur ve *Helicosporidium*'un her iki böcekte de bulunması da bunu desteklemektedir.

Diğer *Dendroctonus* türlerindeki microsporidium patojenlerinin varlığı araştırıldığında karşımıza iki kayıt çıkmaktadır. Knell ve Allan (1978) *Dendroctonus frontalis*'ten *Unikaryon minutum* olarak isimlendirdikleri bir microsporidian patojeni tanımlamışlardır, bu tür daha sonra Unikaryonidae familyasına ait *Canningia* cinsine dâhil edilmiştir. *U. minutum* muhtemelen bu tez çalışmasında tanımlanan microsporidian patojeni ile yakın akrabadır. Weiser (1970) *Dendroctonus pseudotsugae*'den iki microsporidian patojeni bildirilmiştir: *Nosema dendroctoni* ve *Chytridiopsis typographi*. *N. dendroctoni* çekirdeğinin diplokaryotik olması, *C. typographi* ise sporlarının şekli nedeniyle bu çalışmada bulunan patojenden kolaylıkla ayırt edilebilir.

Değişik kabuk böceklerinden bugüne kadar 18'den fazla microsporidia tanımlanmıştır. Bunlardan, Unikaryonidae familyasında bulunan ve kabuk böceklerini enfekte eden tek çekirdekli patojenler, bu çalışmada kaydedilen microsporidian patojeni ile benzerlik gösterirler, karşılaştırma Tablo 1'de verilmektedir. Tablo 1'de açıkça görülebildiği gibi, *R. grandis*'te enfeksiyona yol açan microsporidian patojeni, diğer kabuk böceklerinden bulunmuş Unikaryonidae familyası dâhilindeki microsporidian türlerinden, polar filament kıvrım sayısı ve spor ebatları bakımından farklılık gösterir.

Tablo 1. Kabuk böceklerini enfekte eden bazı tek çekirdekli microsporidian türleri

Patojen	Konak	Kıvrım sayısı	Spor ebatları (µm)	Referanslar
<i>Unikaryon montanum</i>	<i>Ips typographus</i>	7-8 ve 5-6	2 x 1 ve 1.5 x 1	Weiser vd. 1998
<i>Unikaryon amitini</i>	<i>Ips amitinus</i>	5-6	1.8 x 1	Händel 2001
<i>Unikaryon polygraphi</i>	<i>Polygraphus poligraphus</i>	6-7 ve 5-6	2.8 x 1 ve 2.2 x 1	Weiser vd. 2002
<i>Unikaryon minutum</i>	<i>Dendroctonus frontalis</i>	6-7	2.2 x 0.9	Knell ve Allen 1978
<i>Larssoniella duplicati</i>	<i>Ips duplicatus</i>	6-7 ve 5-6	3.5 x 2 ve 2 x 1.5	Weiser vd. 2006
<i>Canningia tomici</i>	<i>Tomicus piniperda</i>	5-6 ve 4-5	2.8 x 1.4 ve 3.8 x 2	Kohlmayr vd. 2003
<i>Canningia spinidentis</i>	<i>Pityocteines spinidens</i>	5-6	1.9 x 0.9	Weiser vd. 1995
<i>Canningia rhizophagi</i>	<i>Rhizophagus grandis</i>	10-11	4.2 x 2.4	Bu çalışma

4.1. Taksonomi

Polar filamentleri subapikal bir şekilde tutunmuş tek çekirdekli sporlar Weiser vd., 1995 tarafından önerildiği gibi *Canningia* cinsi için tipik bir özelliktir. *D. frontalis*'ten tanımlanan *Unikaryon minutum* (*Canningia minuta*) (Knell ve Allen, 1978) ve *Tomicus piniperda*'dan tanımlanan *Canningia tomici* (Kohlmayr vd., 2003), *Pityocteines spinidens*'ten tanımlanan *Canningia spinidentis* (Weiser vd., 1995) tiptürünün yanı sıra *Canningia* cinsine dâhil olan diğer microsporidian türleridir. Bu üç microsporidian türü de kabuk böceklerinin patojenleridir. Patojenler farklı ağaçlardaki değişik konakları enfekte ederler ve enfeksiyonun etkilediği organ ve dokular arasında orta bağırsak, Malpighi tüpleri, kas ve yağ dokusu bulunmaktadır. *Canningia* cinsine ait microsporidian türlerinin ortak özelliklerinin en göze çarpanı polar filamentin subapikal bağlanma bölgesidir. Diğer bir ortak özellik ise anchoring diskin kalınlaşmış çerçeveye sahip küseli bir yapı olmasıdır. Polaroplastın üç bölgeden oluşması da *Canningia* cinsi için karakteristiktir: apikal uca yakın amorf bölge, orta kısımda

bir dizi yoğun tabaka ve posterior bölgede geniş tabakalar oluşturan tübüler yapılar. *Canningia* cinsine ait türlerin yuvarlak çekirdekleri sporun ikinci yarısında polaroplastın arkasında bulunmaktadır. Bu yapılar *R. grandis*'teki de dâhil bütün üyeleri karakterize etmektedir. Bu konak aslında spesifik avı olan *Dendroctonus* türüne yakın bir türdür. Ayrıca Yaman ve Radek (2007)'in kaydında bahsedildiği gibi *Helicosporidium*'un iki böcek arasındaki olası taşınımı, microsporidian patojeni için de benzer bir geçiş olabileceğine işaret etmektedir.

Weiser vd. (1995) *Canningia* cinsini tanımlarken aşağıdaki ortak özellikler üzerinde durmuşlardır.

Şizogoni tek çekirdekli, merontlar tek başlarına, konak sitoplazmasıyla doğrudan temas halinde, sporofor kesesi yok. Sporontların etrafındaki elektronca yoğun kılıf ince. Sporlar uzun oval ile çubuğumsu, polar filament isofilar, 5-7 kıvrımlı, subapikal, yanal bir konumda bağlanmış. Anchoring disk globüler. Polaroplast iki bölümlü, lamelli anterior kısım anchoring diske yapışık ince tabakalar halinde dizilmiş, basık keselerden yapılma. Posterior kısım daha kısa ve geniş lamelli. Endospor duvarı anchoring kuytusunda incelmış. Kabuk böceklerinin parazitleri (Weiser vd., 1995).

Bu çalışmadaki microsporidian patojeni şizogoni evrelerinde tek çekirdekli olması, sporların şekilleri, polar filamentin subapikal, yanal bağlantı şekli, anchoring diskin yapısı ve endospor duvarının bağlantı bölgesindeki incilmesi bakımından *Canningia* cinsinin ortak özelliklerini taşımaktadır. Ancak, bu çalışmada bulunan microsporidian patojeni 10-11 kıvrım yapan anisofilar polar filamente, sporofor kesesiyle çevrili sporogoni evrelerine ve kabuk böceği olmayan bir konağa sahip olması nedeniyle *Canningia* cinsine ait diğer türlerden farklılık göstermektedir. Bu nedenle daha kesin bir taksonomi için moleküler çalışmalara ve enfekte ettiği dokuların, merogoni evrelerinin, konak spektrumunun çalışılması için bioassay deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmalar ileriki dönemlerde bizim tarafımızdan yapılacaktır ve doktora çalışmalarının temelini oluşturacaktır.

Bu çalışmada tanımlanan *Canningia* türü gruptaki diğer türlerden ve bugüne kadar tanımlanan diğer microsporidian türlerinden farklıdır. Genel olarak bakıldığında bu çalışmada tanımlanan microsporidian patojenin farklı olan özellikleri spor boyut ve şekilleri, elektron mikroskopundaki yapısının detayları ve konağıdır. Bu nedenle yeni bir tür olduğu sonucuna varılmıştır. Türkiye'de *R. grandis*'te enfeksiyona neden olan microsporidian patojeni için *Canningia rhizophagi* n. sp. binomeni önerilmektedir.

Teşhis: Sporları ovaldır, boyları $3,75 \pm 0,27$ (2,91 – 4,24) μm (n = 32) ve enleri $2,48 \pm 0,13$ (2,25 – 2,9) μm (n = 34) ortalamaya sahiptir, tek çekirdekli, polar filament subapikal,

yanal bir şekilde bağlanmıştır. Anisofilar polar filament 7 normal 3-4 dar kıvrım yapmaktadır. Polaroplast; amorf bölge, yoğun tabakalar ve sporun orta kısmına kadar ulaşan lamelli-tübüler bölge olmak üzere üç bölgeden oluşmuştur.

Tip konak: *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera, Rhizophagidae)

Konak lokalitesi: Trabzon ve Artvin'deki *R. grandis* üretim laboratuvarları

Tip materyal: Giemsa-boyalı kuru yayma preparatlar ve elektron mikrokobu için hazırlanmış kesitler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Trabzon, Türkiye'de saklanmaktadır.

Etimoloji: Tür ismi enfekte konağın cins ismi olan *Rhizophagus*'tan yola çıkılarak belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans tezi çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmektedir:

1. *R. grandis* kitle üretim laboratuvarlarında yetiştirilmeyi ve biyolojik mücadele çalışmalarını olumsuz etkileyebilecek olası bir enfeksiyonun varlığını araştırmak amacıyla bu laboratuvarlardan ve araziden elde edilen 2963 adet *R. grandis* ergini ve larvası disekte edilerek ışık mikroskobu altında incelendi.
2. Işık mikroskobu çalışmaları ile *R. grandis*'te yeni bir microsporidian patojeni varlığı belirlendi.
3. Tespit edilen microsporidian enfeksiyonunun oval şekilli sporlarının boyları, ışık mikroskobu altında, $3,75 \pm 0,27$ (2,91 – 4,24) μm (n = 32) ve enleri ise $2,48 \pm 0,13$ (2,25 – 2,9) μm (n = 34) olarak ölçüldü.
4. Bulunan microsporidian patojeni Giemsa boyama yöntemi ile teyit edildi. Giemsa boyalı preparatlarda sporların boyları $3,68 \pm 0,26$ (3,18 – 4,17) μm (n = 32) ve enleri $2,29 \pm 0,21$ (2 – 2,79) μm (n = 33) olarak ölçüldü.
5. Elektron mikroskobu ile *R. grandis*'teki microsporidian patojeninin detaylı morfolojisi çalışıldı.
6. Işık ve elektron mikroskobu çalışmalarıyla elde edilen bilgiler ışığında karakteristik özellikleri literatürdeki diğer kabuk böceklerini enfekte eden microsporidian türleriyle karşılaştırılarak *R. grandis*'teki microsporidian patojeninin yeni bir tür olduğu sonucuna varıldı.
7. *R. grandis*'teki microsporidian patojeni morfolojik özelliklere ve diğer bulgulara dayanarak tanımlandı.
8. Bu tez çalışmasında bulunan microsporidian patojeninin taksonomisi literatürdeki diğer kabuk böceği patojeni microsporidian türleriyle karşılaştırılarak yapıldı.

6. ÖNERİLER

Bu tez için yapılan çalışmalar sırasında *R. grandis* kitle üretim laboratuvarlarında kullanılan yöntemler diğer ülkelerde kullanılan yöntemler ile kıyaslanmıştır. Sonradan geliştirilmiş ve İngiltere’de hala kullanılmakta olan modern yöntemlerin, ülkemizde de kullanılması, verimi artırmak, yer, kütük ve larva ihtiyacını azaltmak ve hastalıklar üzerinde daha etkili bir kontrol sağlamak amacıyla önerilmektedir. Bildiğimiz kadarıyla üretimde kullanılacak *R. grandis* erginleri üretim laboratuvarlarından elde edilmektedir. Bu nedenle üretimde kullanılacak *R. grandis* erginlerinin alınacağı laboratuvarlardaki böcek popülasyonlarının tarafımızdan incelenerek hastalık oranlarının en düşük olduğu laboratuvarların belirlenmesi önerilmektedir. Böylelikle sağlıklı bireylerden üretilen nesiller de sağlıklı olacaktır.

Bu çalışmada tanımlanan, *R. grandis*’te enfeksiyona neden olan microsporidian patojeni için, *Canningia rhizophagi* sp. n. binomeni önerilmektedir. Patojen yeni bir tür olduğu için biyolojisi, konağa bulaşma şekilleri, konak üzerindeki etkisi ve histopatolojisi bilinmemektedir. Bundan sonra bu bilinmeyenlerin aydınlatılması hem *R. grandis* üretimine, hem de dünya literatürüne katkı sağlayacaktır. Ayrıca, moleküler çalışmalar ile yeni türün taksonomisinin kesinleştirilmesi de öneriler arasındadır.

7. KAYNAKLAR

- Anderson, D.L. ve Giacomini, H., 1992. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus, J. Econ. Entomol. 85, 47-51.
- Andreadis, T.G., 1983. Life cycle and epizootiology of *Amblyospora* sp. (Microspora: Amblyosporidae) in the mosquito, *Aedes cantator*, J. Protozool., 30, 509-518.
- Aydın, L., Güleğen, E., Girişgin, O. ve Kurtaraner, L., 2007. Türkiye ipekböceklerinde *Nosema bombycis* (Naegeli, 1857) Olgusu, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31, 1, 72-74.
- Bailey, L., 1981. "Honey Bee Pathology." Academic Press, London. Cantwell, G. E., ve Lehnert, T. 1968. Mortality of *Nosema apis* and the greater wax moth, *Galleria mellonella* L, caused by heat treatment, Am. Bee J. 108, 56-57.
- Bailey, L. ve Ball, B.V., 1991. Honey Bee Pathology, Academic Press, London.
- Barker, R.J., 1975. Ultrastructural observations on *Encephalitozoon cuniculi*, Levaditi, Nicolau et Schoen, 1922, from mouse peritoneal macrophages, Fol. Parasitol., Praha, 22, 1-9, Pls. I-VI.
- Barras, S.J., 1972. Improved White's solution for surface sterilization of pupae of *Dendroctonus frontalis*, J. Econ. Entomol., 65, 1504.
- Batson. B.S., 1983. A light and electron microscopic study of *Hirsutusporos austrosimulii* gen. et sp. n., (Microspora: Nosematidae), a parasite of *Austrosimulium* sp. (Diptera: Simuliidae) in New Zealand, Protistologica, 19, 263-280.
- Becnel, J.J., 1997. Complementary Techniques: Preparations of Entomopathogens and Diseased Specimens for more Detailed Study using Microscopy. In: "Manual of Techniques in Insect Pathology" (L. A. Lacey, ed), Academic Press., 337-353.
- Bevan, D. ve King, C.J., 1983. *Dendroctonus micans* Kug. – a new pest of spruce in the U.K., Commonwealth Forestry Review, 62, 41-51.
- Bhat, S.H.A. ve Nataraju, B., 2007. A comparative study on artificial germination of two microsporidia under the neutralization method, Caspian Journal of Environmental Sciences, 5, 1, 105-109
- Burges, H.D., Canning, E.U. ve Hulls, I.K., 1974. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament, J. Invertebr. Pathol., 23, 135-139.
- Canning, E.U. ve Hazard, E.I., 1982. Genus *Pleistophora* Gurley, 1893: An assemblage of at least three genera, J. Protozool., 29, 38-49.

- Canning, E.U. ve Nicholas, I.P., 1980. Genus *Pleistophora* (phylum Microspora): Redescription of the type species, *Pleistophora typicalis* Gurley, 1893 and ultrastructural characterization of the genus, J. Fish Diseases, 3, 317-338.
- Canning, E.U., Hazard, E.I. ve Nicholas, J.P., 1979. Light and electron-microscopy of *Pleistophora* sp. from skeletal muscle of *Blennius pholis*, Protistologica, 15, 317-332.
- Canning, E.U., Lom, J. ve Nicholas, J.P., 1982. Genus *Glugea* Thélohan 1891 (phylum Microspora): Redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes), Protistologica, 18, 193-210.
- Canning, E.U., Wigley, P.J. ve Barker, R.J., 1983. The taxonomy of three species of microsporidia (Protozoa: Microspora) from an oakwood population of winter moths *Operophtera brumata* (L.) (Lepidoptera: Geometridae), Syst. Parasitol., 5, 147-159.
- Carle, P., 1975. *Dendroctonus micans* Kug. (Col: Scolytidae), l'hylésine géant où dendroctone de l'épicéa (note bibliographique), Revue Forestière Française, 27, 115-128.
- Codreanu, R. ve Vávra, J., 1970. The structure and ultrastructure of the microsporidian *Telomyxa glugeiformis* Leger and Hesse, 1910, parasite of *Ephemera danica* (Müll) nymphs, J. Protozool., 17, 374-384.
- Dall, D J., 1983. A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora, J. theor. Biol., 105, 647-659.
- D.P.T., 2001. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Plânı, Ormancılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu Devlet Planlama Teşkilatı Yayın No, 2531, Ormancılık Özel İhtisas Komisyonu Yayın No, 547, Başbakanlık Basımevi, Ankara, 199-201.
- Erickson, B.W. Jr. ve Blanquet, R.S., 1969. The occurrence of chitin in the spore wall of *Glugea weissenbergi*, J. Invertebr. Pathol., 14, 358-364.
- Eroğlu, M., 1995. *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera, Scolytidae)'ın Populasyon Dinamiğine Etki Eden Faktörler Üzerine Araştırmalar, 148-159. I. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi (23-25 Ekim 1995, Trabzon) Bildirileri, 3. cilt, 298 s.
- Eroğlu, M., 1997. Interactions between *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera, Rhizophagidae) and *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera, Scolytidae), 195, XI World Forestry Congress (13-22 October 1997, Antalya, Turkey) Proceedings, I, 240 s.
- Evans, W.F., 1985. Great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans*: An exotic pest new to Britain, Antenna, 9, 117-121

- Evans, H.F. ve Fielding, N. J., 1994. Integrated management of *Dendroctonus micans* in the UK., Forest Ecology and Management, 65, 17-30.
- Farrar, C.L., 1947. Nosema losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields, J. Econ. Entomol. 40, 333–338.
- Fielding, N. J., O'Keefe, T. ve King, C. J., 1991. Dispersal and host-finding capability of the predatory beetle *Rhizophagus grandis* Gyll. (Col: Rhizophagidae), Journal of Applied Entomology, 112, 89-98.
- Fielding, N.J. ve Evans, H.F., 1997. Biological control of *Dendroctonus micans* (Scolytidae) in Great Britain, Biocontrol News and Information, 18, 2, 51-60.
- Fléché, C., 1997. Risks of spreading bee diseases through the international movement of bees and bee products. Rev. Sci. Tech., 16, 177–186.
- Fries, I., 1988. Contribution to the study of *Nosema* disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Rapport 166. University of Agricultural Sciences, Sweden.
- Fries, I., 1993. *Nosema apis* - A parasite in the honey bee colony, Bee World 74, 5–19.
- Fries, I., 1997. Protozoa. In: Morse, R.A., Flottum, K. (Eds.), Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 57–76.
- Goodwin, M., Ten Houten, A., Perry, J. ve Blackmann, R., 1990. Cost benefit analysis of using fumagillin to treat *Nosema*, N.Z. Beekeeper 208, 11–12.
- Govindan, R., Narayanaswamy, T.K. ve Devaiah, M.C., 1998. Principles of silkworm pathology. ser., Scientific Publishers, Banagalore, India, 420.
- De Graaf, D.C. ve Jacobs F.J., 1991. Tissue specificity of *Nosema apis*, J. Invertebr. Pathol. 58, 277–278.
- Gray, F.H., Cali, A. ve Briggs, J.D., 1969. Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*, J. Invertebr. Pathol., 14, 391-394.
- Grégoire, J.C., 1984. *Dendroctonus micans* in Belgium: the situation today. In: Grégoire, J.-C.; Pasteels, J.M. (eds), Biological control of bark beetles (*Dendroctonus micans*). Brussels, Belgium; Commission of the European Communities, 48-62.
- Grégoire, J.C., 1988. The greater European spruce beetle, 455-478. Dynamics of forest insect populations: patterns, causes and implications., Plenum Publishing Corporation, New York, 624s.
- Grégoire, J.C., Merlin, J., Pasteels, J.M., Jaffuel, R., Vouland, G. ve Schvester, D., 1984a. Mass-rearings and releases of *Rhizophagus grandis* in Lozere. In: Grégoire, J.-C.; Pasteels, J.M. (eds), Biological control of bark beetles (*Dendroctonus micans*)., Brussels, Belgium, Commission of the European Communities, 122-128.

- Grégoire, J.C., Merlin, J. ve Pasteels, J. M., 1984b. Mass-rearing of *Rhizophagus grandis* for the biological control of *Dendroctonus micans*: an interplay between technical requirements and the species biological characteristics., Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, 49, 763-769.
- Grégoire, J.C., Merlin, J., Pasteels, J. M., Jaffuel, R., Vouland, G. ve Schvester, D., 1985. Biocontrol of *Dendroctonus micans* by *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae) in the Massif Central (France): A first appraisal of the mass rearing and release methods, Z. ang. Entomol., 99, 182-190.
- Grégoire, J.C., Merlin, J., Jaffuel, R., Denis, P., Lafont, P. ve Schvester, D., 1986. Elevage a petite moyenne échelle du prédateur *Rhizophagus grandis* Gyll. envue de la lutte biologique contre *Dendroctonus micans* Kug., Revue Forestière Française, 38, 457-464.
- Grégoire, J.C., Baisier, M., Merlin, J. ve Naccache, Y., 1989. Interactions between *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae) and *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae) in the field and the laboratory: their application for the biological control of *Dendroctonus micans* in France, p. 95-108. Potential for biological control of *Dendroctonus* and *Ips* bark beetles, Stephen F. Austin University, Nacogdoches, Texas, 255s.
- Grégoire, J.C., Baisier, M., Drumont, A., Dahlsten, D.L., Meyer, H. ve Francke, W., 1991. Volatile compounds in the larval frass of *Dendroctonus valens* and *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae) in relation to oviposition by the predator, *Rhizophagus grandis* (Coleoptera: Rhizophagidae), Journal of Chemical Ecology, 17, 2003-2019.
- Grégoire, J.C., Couillien, D., Drumont, A., Meyer, H. ve Francke, W., 1992. Semiochemicals and the management of *Rhizophagus grandis* Gyll. (Col: Rhizophagidae) for the biocontrol of *Dendroctonus micans* Kug. (Col: Scolytidae), Journal of Applied Entomology, 114, 110-112.
- Göktürk, T., 2007. *Rhizophagus grandis* üretimi ve ormanda micansın arız olduğu ağaçlara verilmesi. <http://ormanci.net/content/view/20/29/05> Haziran 2008
- Gurley, R.R., 1893. On the classification of the Myxosporidia, a group of protozoan parasites infesting fishes, Bull. U.S. Fish Com. for 1891, 11, 407-420.
- Haque, A., Hollister, W.S., Willcox, A. ve Canning, E.U., 1993. The Antimicrosporidial Activity of Albendazole, J. Invertebr. Pathol., 62, 2, 171-177.
- Hatakeyama, Y. ve Hayasaka, S., 2002. Specific Amplification of microsporidian DNA Fragments Using Multiprimer PCR, JARQ, 36, 2, 97-102.
- Hatakeyama, Y. ve Hayasaka, S., 2003. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR, J. Invertebr. Pathol., 82, 148-151.

- Hazard, E.I. ve Oldacre, S.W., 1975. Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species, U.S. Dept. Agric. Techn. Bull., 1530, 1-104.
- Hazard, E.I., Fukuda, T. ve Becnel, J.J., 1984. Life cycle of *Culicosporella lunata* (Hazard ve Savage, 1970) Weiser, 1977 (Microspora) as revealed in the light microscope with a redescription of the genus and species, J. Protozool., 31, 385-391.
- Hazard, E.I., Fukuda, T. ve Becnel, J.J., 1985. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora, J. Invertebr. Pathol., 46, 63-69.
- Ishihara, R., 1968. Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*, J. Invertebr. Pathol., 12, 245-258.
- Ishihara, R. ve Hayashi, Y., 1968. Same properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*, J. Invertebr. Pathol., 11, 377-3-5.
- Joudrey, P. ve Bjørnson, S., 2007. Effects of an unidentified microsporidium on the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Coleoptera: Coccinellidae), used for biological control, J. Invertebr. Pathol., 94, 140-143.
- Jyothi, N.B., Patil, C.S. ve Dass, C.M.S., 2004. Action of carbendazim on the development of *Nosema bombycis* Naegeli in silkworm *Bombyx mori* L. JEN, 129, 4, 205-210.
- Karnovsky, M.J., 1971. Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. In: Proc. 14th Ann. Meet. Am. Soc. Cell Biol., 146.
- Keeling, P.J. ve Fast, N.M., 2002. Microsporidian: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites, Ann Rev Microbiol, 56, 93-116.
- Khobakhidze, D.N., 1965. Some results and prospects of the utilization of beneficial entomophagous insects in the control of insect pests in Georgian SSR (USSR), Entomophaga, 10, 4, 323-330.
- Khobakhidze, D.N., Tvaradze M.S., Yashvili G.U. ve Kraveishvili I.K., 1968. Artificial rearing of *Rhizophagus grandis* Gyll. for the control of *Dendroctonus micans* Kug. in Georgia, Soobschenie Akademii Nauk Gruzinskoi SSR, Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR, 51, 435-440.
- Khobakhidze, D.N., Tvaradze, M.S. ve Kraveishvili, I.K., 1970. Preliminary results of introduction, study of bioecology, development of methods of artificial rearing and naturalization of the effective entomophage, *Rhizophagus grandis* Gyll., against the European spruce beetle, *Dendroctonus micans* Kugel., in spruce plantations in Georgia, Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR, Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR, 60, 205-208.
- King, C. J., Fielding, N. J. ve O'Keefe, T., 1991. Observations on the life cycle and behavior of the predatory beetle, *Rhizophagus grandis* Gyll. (Col: Rhizophagidae) in Britain, Journal of Applied Entomology, 111, 286-296.

- Knell, J.D. ve Allen, G.E., 1978. Morphology and ultrastructure of *Unikaryon minutum* sp.n. (Microsporida : Protozoa) a parasite of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. Acta Protozool, 17, 271-278
- Kohlmayr, B., Weiser, J., Wegensteiner, R., Händel, U. ve Žižka, Z., 2003. Infection of *Tomicus piniperda* (Col., Scolytidae) with *Canningia tomici* sp.n. (Microsporidia, Unikaryonidae). J. Pest Science, 76, 65 – 73.
- Kramer, J.P., 1976. The extra-corporeal ecology of microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr ve Cheng, T.C., eds., *Comparative Pathobiology*, Plenum Press, New York and London, 1, 127-135.
- L'Arrivee, J.C.M., 1965. Sources of *Nosema* infection, Am. Bee J. 105, 246–248.
- Larsson, R., 1980. Ultrastructural study of *Toxoglugea variabilis* n. sp. (Microsporida: Thelohaniidae), a microsporidian parasite of the biting midge *Bezzia* sp. (Diptera: Ceratopogonidae), Protistologica, 16, 17-32.
- Larsson, R., 1981a. The ultrastructure of the spore and sporogonic stages of *Telomyxa glugeiformis* Leger and Hesse 1910 (Microsporida: Telomyxidae), Zool. Anz., Jena, 206, 137-153.
- Larsson, R., 1981b. A new microsporidium *Berwaldia singularis* gen. et sp. nov. from *Daphnia pulex* and a survey of microsporidia described from Cladocera, Parasitology, 83, 325-342.
- Larsson, R., 1982. Cytology and taxonomy of *Helmichia aggregata* gen. et sp. nov. (Microspora, Thelohaniidae), a parasite of *Endochironomus* larvae (Diptera, Chironomidae), Protistologica, 18, 355-370.
- Larsson, R., 1983. A revisionary study of the taxon *Tuzetia* Maurand, Fize, Fenwick and Michel, 1971, and related forms (Microspora, Tuzetiidae), Protistologica, 19, 323-355.
- Larsson, R., 1984. Ultrastructural study and description of *Chapmanium dispersus* n. sp. (Microspora, Thelohaniidae), a microsporidian parasite of *Endochironomus* larvae (Diptera, Chironomidae), Protistologica, 20, 547-563.
- Larsson, R., 1985. On the cytology, development and systematic position of *Thelohania asterias* Weiser, 1963, with creation of the new genus *Bohuslavia* (Microspora, Thelohaniidae), Protistologica, 21, 235-248.
- Larsson, R., 1986. Ultrastructure, Function and Classification of Microsporidia, Progress in Protistology, 1, 325-390.
- Levine, N.D., 1971. Uniform terminology for the protozoan subphylum Apicomplexa, J. Protozool., 18, 352-355.

- Liu, T.P. ve Davies, D.M., 1973. Ultrastructure of the frozen-etched polar filament in a microsporidian *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913), Can. J. Zool., 51, 217-219.
- Lom, J. ve Vávra, J., 1963a. Mucous envelopes of spores of the subylum Cnidospora (Doflein, 1901), Vest. Cs. spol. zool., 27, 4-6.
- Lom, J. ve Vávra, J., 1963b. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores, Acta Protozool., 1, 81-89.
- Loubès, C. ve Maurand, J., 1975. Etude ultrastructurale de *Gurleya chironomi* n. sp. Microsporidie parasite des larves d'*Orthocladus* (Diptera-Chironomidae). Protistologica, 11, 233-244.
- Matheson, A., 1996. World bee health update 1996, Bee World, 77, 45-51.
- Mimioğlu, M., Göksu, K. ve Sayın, F., 1969. Veteriner ve Tıbbi Protozooloji II, Ankara Ün.Veteriner Fak.Yayınları, 1039-1040.
- Moser, J.C., 1989. An exotic predator for the biological control of the black turpentine beetle., 189-200, Kulhavy, D.L. ve Miller, M.C., Potential for Biological Control of *Dendroctonus* and *Ips* Bark Beetles., Center for Applied Studies, School of Forestry, Stephen F. Austin State University, Nacogdoches, TX, 255s.
- Özcan, G.E., Eroğlu, M. ve Alkan-Akıncı, H., 2006. Ladin ormanlarında *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Scolytidae)'in zarar durumu ve *Rhizophagus grandis* (Gyllenhal) (Coleoptera: Rhizophagidae)'in zararlının popülasyonuna etkisi, Türk. Entomoloji Dergisi, 30, 1, 1-12.
- Patil, C.S., Jyothi, N.B. ve Dass, C.M.S., 2001. Faecal pellet examination of silkworm, *Bombyx mori* as a diagnostic method to detect pebrine disease, J Experiment Zool, India, 4, 2, 311-315.
- Petri, M. ve Schjødt, T., 1966. On the ultrastructure of *Nosema cuniculi* the cells of the Yoshida rat *Ascites sarcoma*, Acta path. microbiol. scand., 66, 437-446.
- Purrini, K. ve Weiser, J., 1984. Light- and electron microscopic studies of *Chytridiopsis typographi* (Weiser, 1954) Weiser, 1970 (Microspora), parasitizing the bark beetle *Hylastes cunicularius* Er., Zool. Anz., 212, 369-376.
- Purrini, K. ve Weiser, J., 1985. Ultrastructural study of the microsporidian *Chytridiopsis typographi* (Chytridiopsida: Microspora) infecting the bark beetle, *Ips typographus* (Scolytidae: Coleoptera), with new data on spore dimorphism, J. Invertebr. Pathol., 45, 66-74.
- Raikov, I.B., 1982. The protozoan nucleus, morphology and evolution, Cell Biology Monographs, 9, Springer-Verlag, Wien and New York, 474 s.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17, 208-212.

- Ritter, W., 2001. *Acrobasis* S.A., Enfermedades de las abejas, Zaragoza, Spain.
- Sprague, V. ve Vernick, S.H., 1974. Fine structure of the cyst and some sporulation stages of *Ichthyosporidium* (Microsporida), J. Protozool., 21, 667-677.
- Sprague, V., Ormières, R. ve Manier, J.F., 1972. Creation of a new genus and a new family in the Microsporida, J. Invertebr. Pathol., 20, 228-231.
- Spurr, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Clin. Microbiol. Res. 3, 197-218.
- Takizawa, H., Vivier, E. ve Petitprez, A., 1975. Recherches cytochimiques sur la Microsporidie *Nosema bombycis* au cours de son developpement chez le ver a soie (*Bombyx mori*), J. Protozool., 22, 359-368.
- Thélohan, P., 1892. Observations sur les Myxosporidies et essai de classification de ces organismes, Bull. Soc. Philom., Paris, 4, 165-178.
- Thiery, J.P., 1972. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique, J. Microsc. 6, 987 – 1018.
- Tømmerås, B.A., Mustaparta, H. ve Grégoire, J.-C., 1985. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in *Dendroctonus micans* and *Rhizophagus grandis*. In *Animals and Environmental Stress*, R. Gilles, ed. Pergamon Press, 98-106.
- Van Averbek, A. ve Grégoire, J.-C., 1995. Establishment and spread of *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera: Rhizophagidae) 6 years after release in the Forêt domaniale du Mezenc (France), Annales des Sciences Forestières, 52, 243-250.
- Vávra, J., 1965. Etude au microscope electronique de la morphologie et du developpement de quelques Microsporidies, C. R. Acad. Sci., Paris, 261, 3467-3470.
- Vávra, J., 1972. Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate test, J. Microscopie, 14, 357-360.
- Vávra, J., 1976a. The occurrence of paramural bodies in microsporidia. (Abstr.) J. Protozool., 23, 21A.
- Vávra, J., 1976b. Structure of the microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr. ve Cheng, T.C, eds., Comparative Pathobiology. Plenum Press, New York and London, 1: 1-85.
- Vávra, J., 1976c. Development of the microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr. ve Cheng, T.C, eds., Comparative Pathobiology. Plenum Press, New York and London, 1: 87-109.
- Vávra, J. ve Barker, R.J., 1980. The microsporidian mucocalyx as seen in the scanning electron microscope. Fol. Parasitol., Praha, 27: 19-21.
- Vávra, J. ve Larsson, R.. 1999. Structure of the Microsporidia. In Wittner & Weiss,(eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, 7 – 84.

- Vávra, J., Canning, E.U., Barker, R.J. ve Desportes, I., 1981. Characters of microsporidian genera, (Workshop Proceedings, EMPO 3), Parasitology, 82, 131-142.
- Vernick, S. H., Sprague, V. ve Krause, D., 1977. Some ultrastructural and functional aspects of the Golgi apparatus of *Thelohania* sp. (Microsporida) in the shrimp *Pandalus jordani* Rathbun, J. Protozool., 24, 94-99.
- Vivarès, C. P., 1975. Etude comparative faite en microscopies photonique et electronique de trois especes de Microsporidies appartenant au genre *Thelohania* Henneguy, 1892, parasites de Crustaces Decapodes marins, Ann. Sci. Nat. Zool., Paris, 17, 141-178,
- Vivarès, C.P., Bouix, G, ve Manier, J.-F., 1977. *Ormieresia carcini* gen. et sp. n. Micrasporidie du Crabe mediterraneen, *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884: Cycle evolutif et etude ultrastructurale. J. Protozool., 24: 83-94.
- Vivier, E. ve Schrevel, J., 1973. Etude en microscopie photonique et electronique de differents stades du cycle de *Metchnikovella hovassei* et observations sur la position systematiques des Metchnikovellidae, Protistologica, 9, 95-118.
- Wainhouse, D., Wyatt, T., Phillips, A., Kelly, D.R., Barghain, M., Beech-Garwood, P. ve Howell, R.S., 1991. Response of the predator *Rhizophagus grandis* to host plant derived chemicals in *Dendroctonus micans* larval frass in wind tunnel experiments (Coleoptera: Rhizophagidae, Scolytidae), Chemoecology, 2, 55-63.
- Wainhouse, D., Beech-Garwood, P., Howell, R.S., Kelly, D.R. ve Orozco, M.P., 1992. Field response of the predator *Rhizophagus grandis* to prey frass and synthetic attractants., Journal of Chemical Ecology, 18, 1693-1705.
- Webster, T.C., 1993. *Nosema apis* spore transmission among honey bees, Am. Bee J., 133, 869-870.
- Weidner, E., 1972. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells, Z. Parasitenk., 40, 227-242.
- Weidner, E., 1976. The microsporidian spore invasion tube, The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube, J. Cell Biol., 71, 23-34.
- Weidner, E., 1982. The microsporidian spore Invasion tube, III. Tube extrusion and assembly, J. Cell Biol., 93: 976-979.
- Weidner, E. ve Byrd, W., 1982. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge, J. Cell Biol., 93, 970-975.
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A., Pleshinger, J. ve Sibley, D., 1984. Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane, J. Protozool., 31, 195-198.
- Wilde, J. ve Bratkowski, J., 1995. *Nosema* disease in honey bee colonies and pollen trapping. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 39, 99-105.

- Woyke, J., 1984. Increases in life span, unit honey productivity and honey surplus with fumagillin treatment of honey bee, J. Apicult. Res., 23, 209–212.
- Weiser, J., 1970. Three New Pathogens of the Douglas Fir Beetle, *Dendroctonus pseudotsugae*: *Nosema dendroctoni* n. sp., *Ophryocystis dendroctoni* n. sp. and *Chytridiopsis typographi* n. comb., J. Invertebr. Pathol, 16, 436 – 441.
- Weiser, J., 1977. Contribution to the classification of microsporidia, Vest. Cs. spol. zool., 41, 308-320,
- Weiser, J., Wegensteiner, R. ve Žižka, Z., 1995. *Canningia spinidentis* gen. et sp. n. (Protista : Microspora): new pathogen of the fir bark beetle, *Pityocteinus spinidens*. Folia parasitologica , 42, 1 – 10.
- Yaman, M. ve Radek, R. 2007. Infection of the predator beetle *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera, Rhizophagidae) with the insect pathogenic alga *Helicosporidium* sp. (Chlorophyta: Trebouxiophyceae). Biological Control 41: 384-388.
- URL-1, www.ogm-giresunobm.gov.tr, Orman Zararlıları ile Mücadele Çalışmaları ile İlgili Haber, 113, 1 Temmuz 2008.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ankara'da doğdu. İlkokulu Özel Arı Koleji'nde, ortaokulu İngiltere Wooten Upper School'da bir sene okuduktan sonra Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi'nde ve lise eğitimini Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1997 – 1998 öğretim yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Fen Bilgisi Eğitimi bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında İlköğretim Fen Bilgisi Öğretmeni unvanı ile mezun oldu. 2005 – 2006 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji bölümünde yüksek lisansa başladı. 2006 yılında TÜBİTAK destekli 107T166 no'lu projede çalışmaya başlamıştır ve halen devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.