

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÜYÜK LAHANA KELEBEĞİ (*PIERIS BRASSICAE* L.; LEPIDOPTERA:
PIERIDAE)'NDE YENİ BİR MİKROSPORİDİUM (PROTİSTA) TÜRÜNÜN
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Çağrı BEKİRCAN

HAZİRAN 2012
TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÜYÜK LAHANA KELEBEĞİ (*PIERIS BRASSICAE* L.; LEPIDOPTERA:
PIERIDAE)’NDE YENİ BİR MİKROSPORİDİUM (PROTİSTA) TÜRÜNÜN
KARAKTERİZASYONU**

Biyolog Çağrı BEKİRCAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nce
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 01.06.2012**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa YAMAN

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Çağrı BEKİRCAN Tarafından Hazırlanan

BÜYÜK LAHANA KELEBEĞİ (*PIERIS BRASSICAE* L.; LEPIDOPTERA:
PIERIDAE)'NDE YENİ BİR MİKROSPORİDİUM (PROTİSTA) TÜRÜNÜN
KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 15 / 05 / 2012 gün ve 1456 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mahmut EROĞLU

Üye : Prof. Dr. Mustafa YAMAN

Üye : Prof. Dr. Bilal KUTRUP

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera: Pieridae)’nde Yeni Bir Mikrosporidium (Protista) Türünün Karakterizasyonu” adlı bu yüksek lisans tezi, gerek dünya gerekse ülkemizde lahana türlerinin yetiştiriciliğinde büyük zararlara neden olan Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae* L.)’nin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeline sahip yeni bir mikrosporidium türünün karakterizasyonu üzerine önemli bilgiler sunmaktadır.

Lisansüstü eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mustafa YAMAN’a, sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışması süresince yardımlarını esirgemeyen Zooloji II laboratuvarı çalışanlarına yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım ve değerli hocalarım; Mustafa CÜCE, Onur TOSUN, Mutlu GÜLTEPE, Ersan BEKTAŞ, Aykut SAĞLAM, Halil İbrahim GÜLER ve Mehmet DEMİRALAY’a, ayrıca desteklerini esirgemeyen tüm dostlarım ve meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım ve tez çalışmam süresince her türlü fedakârlıkla yanımda bulunan sevgili eşim Tuba BEKİRCAN ve başta annem, babam olmak üzere diğer aile bireylerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çağrı BEKİRCAN
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera: Pieridae)’nde Yeni Bir Mikrosporidium (PROTİSTA) Türünün Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Mustafa YAMAN‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01 /06 / 2012

Çağrı BEKİRCAN

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|-----------------|
| ÖNSÖZ..... | III |
| TEZ BEYANNAMESİ..... | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| ÖZET..... | VII |
| SUMMARY | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | IX |
| TABLolar DİZİNİ..... | X |
| SEMBOLLER DİZİNİ | XI |
| 1. GENEL BİLGİLER | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. <i>Pieris brassicae</i> L. (Lepidoptera: Pieridae) (Büyük Lahana Kelebeği) | 3 |
| 1.2.1. Biyolojisi..... | 3 |
| 1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı..... | 5 |
| 1.2.3. Mücadele Yöntemleri ve Doğal Düşmanları | 7 |
| 1.3. Microsporidia..... | 9 |
| 1.4. Tezin Amacı..... | 10 |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 11 |
| 2.1. Örneklerin Elde Edilmesi..... | 11 |
| 2.2. Mikroskopik Çalışmalar..... | 11 |
| 2.2.1. Işık Mikroskopu Çalışmaları..... | 11 |
| 2.2.1.1. Giemsa Boyama | 12 |
| 2.2.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları..... | 12 |
| 2.2.2.1. Resine Gömme İşlemi ve Elektron Mikroskobu Çalışması..... | 13 |
| 2.2.3. Moleküler Çalışmalar..... | 13 |
| 2.2.3.1. DNA İzolasyonu ve rDNA Amplifikasyonu..... | 14 |
| 3. BULGULAR..... | 15 |
| 3.1. <i>Pieris brassicae</i> 'de Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi | 15 |
| 3.1.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Makroskopik Görünümü..... | 15 |
| 3.1.2. Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi | 16 |
| 3.1.2.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları ile Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi . | 16 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.1.2.2. | Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi | 22 |
| 3.2. | <i>P. brassicae</i> Larvalarında Tespit Edilen Mikrospor Patojeni Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar | 26 |
| 4. | TARTIŞMA | 32 |
| 5. | SONUÇLAR | 39 |
| 6. | ÖNERİLER | 40 |
| 7. | KAYNAKLAR | 41 |
| 8. | EKLER | 47 |
| ÖZGEÇMİŞ | | |

Yüksek Lisans

ÖZET

BÜYÜK LAHANA KELEBEĞİ (*PIERIS BRASSICAE* L.; LEPIDOPTERA:
PIERIDAE)'NDE YENİ BİR MİKROSPORİDİUM (PROTİSTA) TÜRÜNÜN
KARAKTERİZASYONU

Çağrı BEKİRCAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa YAMAN
2012, 59 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Bu yüksek lisans tezinde; dünyada ve ülkemizde lahana yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıpları meydana getiren Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera: Pieridae)'nde doğal enfeksiyona neden olan bir mikrosporidium türünün karakterizasyonu yapıldı. 2011 yılında Trabzon ilinde yapılan arazi çalışmaları sonucu toplanan *P. brassicae* larvaları üzerinde ışık mikroskopu ile 40X ve 1000X'lik büyütmelemlerde incelemeler yapıldı. Larvaların disekte edilmesi ile hazırlanan taze preparatlarda patojenin boyu $5,29 \pm 0,55$ ($3,71 - 7,26$; $n = 250$) μm , eni ise $2,31 \pm 0,30$ ($1,65 - 3,30$; $n = 250$) olarak ölçüldü. Enfeksiyonun konağın yalnızca bağırsak dokusunda geliştiği ve yapılan Giemsa çalışmaları ile patojenin hayat safhaları tespit edildi. Elektron mikroskopisi (TEM) ile patojenin ultrastrüktürel yapısı belirlendi. Spor safhası üzerinde yapılan ultrastrüktürel incelemeler sonucunda patojenin; diplokaryotik, polarfilament sayısı 6, spor duvarı kalınlığı 100 – 125 nm ve polar filament çapının 57 – 71 nm olduğu tespit edildi. Ultrastrüktürel karakterler bu patojenin, *Pieris brassicae*'de daha önceden tespit edilen mikrosporidium türlerinden farklı yeni bir tür olduğunu göstermektedir. Yapılan moleküler çalışmaların sonuçları da elektron mikroskopisi sonuçlarını desteklemektedir. Yapılan ışık, elektron mikroskopisi ve moleküler çalışmalar; *P. brassicae* larvalarında tespit edilen bu patojenin *Nosema* cinsine ait yeni bir tür olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pieris brassicae* L., Biyolojik mücadele, Mikrosporidium, *Nosema*, Karakterizasyon, Entomopatojen

Master Thesis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF NEW MICROSPORIDIUM (PROTISTA) FROM LARGE
CABBAGE BUTTERFLY (*PIERIS BRASSICAE* L.; LEPIDOPTERA: PIERIDAE)

Cagri BEKIRCAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Mustafa YAMAN
2012, 59 Pages, 2 Appendix Pages

A microsporidium species detected from large cabbage butterfly (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera: Pieridae) which cause important product losses in cabbage farming in our country and worldwide was characterized in this study. The larvae were collected from the province of Trabzon in 2011. The larvae collected from field studies were dissected and fresh preparations were examined under the light microscope with magnifications 40x-1000x. Pathogen dimensions were measured as $5,29 \pm 0,55$ ($3,71 - 7,26$; $n = 250$) x $2,31 \pm 0,30$ ($1,65 - 3,30$; $n = 250$) in fresh preparations of dissected larvae. Infection was found only in the intestine of larvae and the life cycle of the microsporidian was determined with Giemsa stain. Ultrastructural features of the pathogen were determined with electron microscopy. According to ultrastructural studies on pathogen spore; this pathogen is diplocharyotic and it has 6 polar filament coils, 100 – 125 nm spore wall thickness and 57 – 71 nm polar filament dimension. Ultrastructural details showed that the microsporidian is a new species and differ from other microsporidia previously characterized from *Pieris brassicae*. Molecular studies were also completed in order to confirm the microsporidian pathogen is a new species. According to light, electron microscopy and molecular studies, this pathogen in the genus *Nosema* was confirmed as a new type of microsporidium detected in *P. brassicae* larvae.

Key Words: *Pieris brassicae* L., Biological control, Microsporidium, *Nosema*, Characterization, Entomopathogen

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Şekil 1. <i>Pieris brassicae</i> 'ye ait ergin, yumurta, larva ve pupa safhaları | 5 |
| Şekil 2. <i>P. brassicae</i> 'nin <i>Brassicae</i> türleri üzerinde meydana getirdiği zarar | 7 |
| Şekil 3. Mikrospor sporları ile enfekte olmuş <i>P. brassicae</i> bağırsağı | 17 |
| Şekil 4. Giemsa boyalı böcek dokusu, mikrospor sporları ve çeşitli hayat safhaları..... | 19 |
| Şekil 5. Mikrospor hayat döngüsünün karakteristik meront safhası | 20 |
| Şekil 6. <i>P. brassicae</i> 'de tespit edilen mikrospor patojenine ait sporont safhası | 21 |
| Şekil 7. <i>P. brassicae</i> 'de tespit edilen mikrospor patojenine ait diplokaryotik sporoblast safhası | 22 |
| Şekil 8. <i>P. brassicae</i> 'de tespit edilen diplokaryotik mikrospor sporları | 23 |
| Şekil 9. <i>P. brassicae</i> 'de belirlenen diplokaryotik mikrospor | 24 |
| Şekil 10. Mikrospor sporlarında polaroplast ve anchoring disc yapıları | 25 |
| Şekil 11. Tespit edilen mikrospor patojenin de ekzospor, endospor, plazma zarı ve polar filament yapıları..... | 26 |
| Şekil 12. <i>P. brassicae</i> 'de belirlenen mikrospor patojenine ait rDNA'nın agaroz jel görüntüsü | 27 |
| Şekil 13. MEGA 5.0 programı ile yapılmış MaximumLikelihood analizi | 31 |

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

| | | |
|----------|--|----|
| Tablo 1. | Günümüzde <i>P. brassicae</i> . ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitler..... | 8 |
| Tablo 2. | Filogenetik analizlerde kullanılan SSU rRNA baz dizileri..... | 29 |
| Tablo 3. | <i>Pieris</i> cinsinde kaydedilen mikrospor türleri..... | 34 |
| Tablo 4. | Tespit edilen <i>Nosema</i> sp. (Bu Çalışmada) ve <i>Nosema mesnili</i> ' nin ultrastrüktürel karakterlerinin karşılaştırılması..... | 35 |

SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|------------------|---|
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| ERL | Epoxy resin |
| M | Molar |
| ml | mililitre |
| mm | milimetre |
| OsO ₄ | Osmium tetroksit |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| TEM | Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu |
| UV | Ultra Violet |
| µl | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| rRNA | Ribozomal RNA |
| SSU | Küçük alt birim |
| bp | Baz çifti |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Lahana bitkisi bugün hem Türkiye’de hem de dünyada üretimi ve tüketimi en çok yapılan sebzelerden biridir. 2003 yılı dünya lahana üretim miktarı 65.956.162 ton iken ülkemizde yine aynı yıl 721.000 ton üretim gerçekleşmiştir (Hekimoğlu ve Altındeğer, 2010). Yine TÜİK’in 2009 verilerine göre ülkemizde 693.002 ton lahana türlerinin üretimi yapılmış ve bu üretimin Türkiye ekonomisine katkısı 346.493.371 TL olmuştur. Söz konusu bu rakamlar üretimi yapılan lahana türlerinin dünya ve ülke ekonomisinde nedenli büyük bir öneme sahip olduğunu göz önüne sermektedir.

Günümüzde tarımsal üretimi yapılan lahana türleri Turpgiller (Brassicaceae) familyasından olup, Avrupa'nın güneybatı kesimlerinde kendiliğinden yetişen yabancı lahanadan (*Brassica oleracea*) türetilmiştir (URL-1, 2011). Ülkemizde yetiştirilen lahana türlerine baktığımızda bölgesel bir değişim söz konusudur. Örneğin Karadeniz bölgesinde yaprak lahana (*Brassice oleraceae var. acephala*), Doğu Anadolu’da beyaz baş lahana (*Brassice oleraceae var. capitata*), batı ve güney bölgelerimizde ise kırmızı baş lahana (*Brassice oleraceae var. rubra*) yetiştiriciliği yapılmaktadır (MEGEP, 2008).

Besin içeriği bakımından değerlendirildiğinde; 100 gr. taze beyaz baş lahanada 1,7 g protein, 0,2 g yağ, 91,4 g su, 5,1 g karbonhidrat, 1,0 g selüloz bulunmaktadır. Kalori değeri 33 kJ’ dir. Baş lahanada A, B1, B2, B3 ile bol miktarda C vitamini vardır (MEGEP, 2008). İnsan beslenmesi yönünden önemli bir yeri olan Brassicaceae sebzeleri, özellikle içerdiği besin maddeleri ve fitokimyasallar (glukosinolat, isotiyosiyonat, indol bileşikleri) bakımından zengin olmaları yanında, kolesterolü ve şekeri azaltmaları, kemik erimesi, kalp hastalıkları ve kansere karşı koruyucu etkilere sahip olmalarıyla da ayrı bir öneme sahiptirler (Vural vd., 2000).

Tarım, ekonomi ve insan sağlığı açısından bu kadar büyük öneme sahip olan lahana türlerinin üretimini etkileyen olumsuz etmenler mevcuttur. Söz konusu bu etmenler biyotik ve abiyotik etmenler olarak temelde iki guruba ayrılmaktadır. Lahana yetiştiriciliğine olumsuz etki eden biyotik etmenlerin başında pest olarak adlandırılan zararlı böcekler gelmektedir.

Büyük lahana kelebeği *Pieris brassicae* L.en önemli lahana zararlılarından biridir. Bitki üzerindeki zararı larva döneminde bitkinin yapraklarını yemesiyle gerçekleştiren büyük lahana kelebeği, bu beslenmesine lahana yapraklarının kalın ana damarları kalana kadar devam etmektedir. Büyük lahana kelebeği, zarar gören bitkinin yapraklarının yenilebilir kısımları tükendikten sonra beslenmeye devam etmek için yeni bitkilere geçmekte ve hızlı bir şekilde çok geniş bir alana yayılabilmektedir. Yapraklarını kaybeden lahana bitkisi gelişimi için gerekli ışık ve nem gibi hayati unsurlardan yoksun kalmakta ve gelişimini tamamlayamamaktadır. Bu durumda lahana türlerinin üretiminde büyük miktarda yıllık ürün kayıpları oluşmaktadır.

Türkiye’de ve dünyada büyük lahana kelebeğinin verdiği zararı engellemek için büyük çaba ve maddi güç sarf edilmektedir. Zararlı böcek mücadelesinde diğer tarımsal ürünler de olduğu gibi kimyasal insektisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal ilaçların zararlı böcekler üzerindeki etkisinin dışında çevreye ve dolaylı olarak insan sağlığına oldukça büyük zararları mevcuttur. Kimyasal insektisit kullanımı ile hedeflenen böcek dışında, ortamda bulunan birçok yararlı hayvan da zarar görmektedir. Yağmur rüzgâr gibi abiyotik etmenlerle kimyasallar; toprağa, ekim alanındaki tarım ürünlerine hatta akarsular aracılığı ile içme sularına bulaşmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Ecevit, 1988). Ayrıca lahana yaprağı yenen sebze olduğu için kalıntı sorunu gibi arzu edilmeyen bazı hususların da ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Avcı ve Özbek, 1990).

Kimyasal mücadelenin bir diğer olumsuz yanı ise uygulandığı böcek türünün kimyasala karşı direnç geliştirmesidir. Kazanılan bu direnç sayesinde bir sonraki böcek nesli uygulanan kimyasal insektisitlerden etkilenmemektedir. Kimyasal mücadele yöntemlerinde insektisit kullanımının bu olumsuzluklarından dolayı birçok bilim adamı ve devlet çalışanı alternatif mücadele teknikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Alternatif mücadele tekniklerinin başında çevreye ve insanlara olan zararlı etkisinin minimum, maliyetinin düşük olduğu yöntemler tercih edilmelidir (Özcan, 2010). Bu amaçla özellikle son yıllarda biyolojik mücadele alanında kayda değer çalışmalar yapılmaktadır (Yaman ve Radek, 2003, 2005; Tosun vd., 2008). Bu çalışmalar doğrultusunda zararlı böcek üzerinde doğal hastalık oluşturan etmenler ilgi odağı olmuştur.

Bu yüksek lisans tezinde dünyada ve ülkemizde önemli bir tarım zararlısı olan büyük lahana kelebeğinde doğal olarak enfeksiyon oluşturan bir mikrospor türünün izolasyonu ve başta ışık mikroskopisi olmak üzere elektron mikroskopisi ve moleküler çalışmalarla karakterizasyonu amaçlanmıştır.

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

Pieris brassicae L; hayvanlar (Animalia) aleminin, eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesinde yer almaktadır. Büyük Lahana Kelebeği olarak da bilinen bu tür, böcekler (Insecta) sınıfının pul kanatlılar (Lepidoptera) takımına ait olup Pieridae familyasının *Pieris* cinsinin içinde yer almaktadır.

Alem: Hayvanlar (Animalia)

Altalem: Bilateria

Üstşube: Panarthropoda

Şube: Eklem bacaklılar (Arthropoda)

Alt Şube: Hexapoda

Sınıf: Böcekler (Insecta)

Altsınıf: Dicondylia

Üsttakım: Panorpida

Takım: Pul kanatlılar (Lepidoptera)

Familya: Pieridae

Altfamilya: Pierinae

Cins: *Pieris*

Tür: *Pieris brassicae*

1.2.1. Biyolojisi

Büyük lahana kelebeğinin ergin kanat açıklığı 40-60 mm civarındadır. Kanatların esas rengi kremimsi beyazdır. Üst kanadın ön kenarının dış köşesinden başlayıp aşağı doğru inen yarım ay şeklinde siyah bir leke vardır (Şekil 1 A). Ayrıca ön kanadın ortasına doğru dışlarda iki siyah yuvarlak leke bulunur. Erkeklerde alt kanadın üzerinde küçük siyah bir leke bulunur (MEGEP, 2008). Büyük lahana kelebeği kışı pupa olarak geçirir. Ülkemizde ergin çıkışları iklim şartlarına bağlı olarak bölgesel değişim göstermektedir. Ege Bölgesinde ergin çıkışı Şubat ayının ikinci yarısından itibaren görülürken, diğer bölgelerde ise Nisan ayından itibaren ergin çıkışı gerçekleşmektedir. İklim şartlarına bağlı

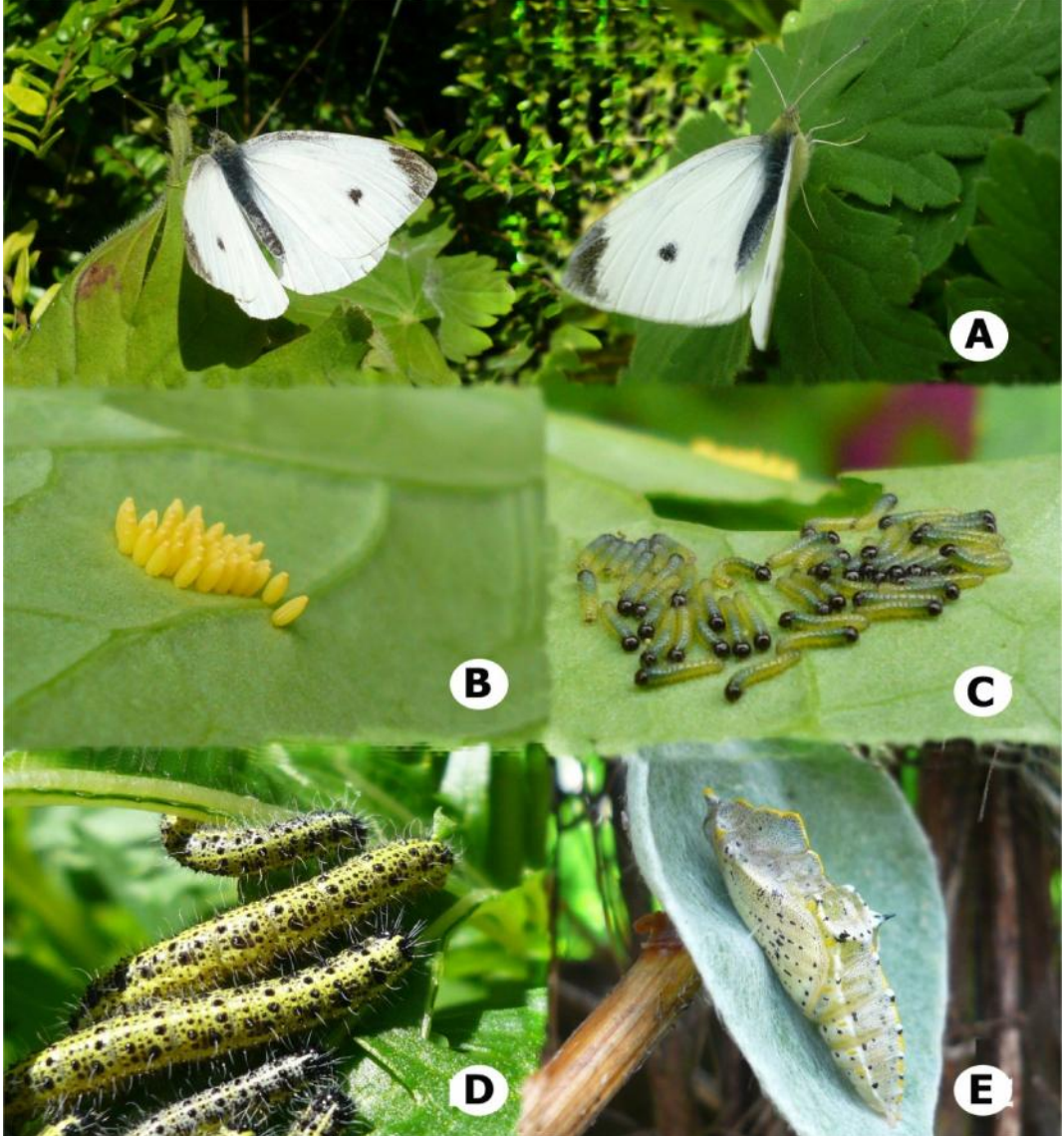
olarak döl sayısı değişkenlik gösterir ve büyük lahana kelebeği ülkemizde iklim şartlarına bağlı olarak 2-6 döl verir (TKİB, 2010).

Yumurtalar 20-50'li gruplar halinde yaprak altına bırakılır. İlk bırakıldığında yumurtalar açık saman sarısı renktedir, sonradan limon sarısına dönüşür ve yumurtalar birbirine paralel sıralar şeklinde dizilmiştir. Yumurta üzerinde 12 sıra çizgi bulunur, bu çizgiler üst uçta birleşir ve kendi aralarında enine çok sayıda çizgilerle bağlanmıştır (MEGEP, 2008) (Şekil 1 B).

Yumurtadan 6-10 gün sonra larva çıkışı gerçekleşir. Yumurtadan yeni çıkan larvalar sarımtırak renkli, esmer başlı ve 1 mm uzunluğundadır (Şekil 1 C). İlk çıkan larvalar yaprak epidermisinde koloniler halinde beslenmeye başlar. İkinci gömlek değişiminden sonra ise koloniler dağılır ve larvalar 4-5 bireylik gruplar oluşturup beslenmelerine devam ederler. Olgun larvalar ise 40-50 mm boyunda, yeşilimsi gri renkli ve baş siyahtır. Vücutta uzunluğuna üç sarı bant bulunur. Karın sırta göre daha açık renkli ve ince siyah noktalıdır (MEGEP, 2008) (Şekil 1 D).

Gelişmesini tamamlayan larvalar, bitkiyi terk ederek duvar, çit, ağaç gövdesi veya çeşitli bitkisel atıklar üzerinde pupa olur ve büyük lahana kelebeği pupaları göğüs kısmından zemine tutunur. Pupaların üzeri sivri çıkıntılı, yeşil renkli, üzeri siyah-sarı lekelerle işli olup, 30 mm boyundadır (TKİB, 2010) (Şekil 1 E). Pupa dönemi iklim şartlarına bağlı olarak 10-15 gün sürer.

Bu türün hayat döngüsü larvaların yumurtadan çıkması ile başlar. Larvalar, konak bitki üzerinde beslenmeye başladıktan 20 gün sonra uygun bir yer bulup metamorfoz sürecini geçireceği pupayı oluşturur. Bu değişim süreci yaklaşık 20 gün sürer ve kelebek halinde kozadan çıkan bireyler 1-2 ay yaşar. Ergin bireyin yumurta bırakması ile döngü tekrardan başlar (URL-2, 2011).



Şekil 1. *Pieris brassicae*' ye ait ergin, yumurta, larva ve pupa safhaları; A: Ergin, B: Yumurta, C: İlk larvalar, D: Olgun larvalar, E: Pupa (URL-3, 2011)

1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Büyük lahana kelebeğinin bitki üzerinde zarara neden olan safhası larva safhasıdır. Yumurtadan çıkan larvalar ilk iki dönem yaprakların kenarlarında toplu halde bulunurlar ve damar aralarını yüzeysel olarak kemirirler. Daha sonraki dönemlerde larvalar bitkinin her tarafına dağılarak çok oburca beslenir ve buldukları bitkinin yapraklarını tamamen yiyerek sadece kalın damarlarını bırakırlar. Zararın yoğun olduğu bahçelerde bitkilerde çalılışmış bir görünüm ortaya çıkar (Sönmez, 2005) (Şekil 2). Çıkardıkları pislikler de yağmur ve çiğ damlacıkları ile bitkinin orta kısmına birikerek bitkinin yenmez hale

gelmesine neden olur. Neticede larvalar, bitkinin yapraklarını yiyerek, pislikleri ile kirleterek, ürün kayıplarına ve bitkinin pazar değerinin düşmesine neden olurlar (MEGEP, 2008). Büyük lahana kelebeği larvaları bitki üzerinde direk zarar oluşturabildikleri gibi şalgam sarı mozaik ve şalgam kırışıklık virüsü gibi bazı virüs hastalıklarının vektörlüğünü de yaparlar (TKİB, 2010).

Büyük lahana kelebeği beslenme şekli olarak polifag bir böcektir. Bu nedenle büyük lahana kelebeği dünya genelinde sebze üretiminde büyük zararlara neden olmaktadır. Sadece Hindistan'da farklı sebze türlerinin üretiminde yıllık % 40' dan fazla ürün kayıplarına neden olmaktadır (Ali ve Rizvi, 2007). 1985 ve 1986 yılları arasında Türkiye'nin bazı bölgelerinde yapılan çalışmaya göre sadece lahana türlerinde yaklaşık % 40 civarında ürün kayıplarına neden olmuştur (Atalay ve Hıncal, 1992).

Büyük lahana kelebeği, batıda İngiltere'den doğuda Çin'e, Afrika'nın güney sahillerinden kuzeyde Kuzey Buz Denizi'ne kadar ülkemizin de içinde bulunduğu 41 eski dünya ülkesinde yayılım göstermektedir. Amerika kıtasında ise başta Şili olmak üzere birçok yeni dünya ülkesinde büyük lahana kelebeği yayılım gösterir (Feltwell, 1978). Larvalar, aynı ekim alanında bir konak bitkiden diğer konak bitkiye kolaylıkla geçerken, geniş alanlara yayılım ise ergin bireylerin toplu halde göçleri ile gerçekleşir (URL-2, 2011).



Şekil 2. *P. brassicae*'nin *Brassicae* türleri üzerinde meydana getirdiği zarar A: *P. brassicae*'nin *Brassicae oleraceae* var. *gemmifera* üzerinde oluşturduğu zarar (URL-1, 2011), B: *P. brassicae*'nin *Brassicae oleraceae* var. *acephala* üzerinde oluşturduğu zarar (Bekircan, 2011)

1.2.3. Mücadele Yöntemleri ve Doğal Düşmanları

Dünyada ve ülkemizde büyük lahana kelebeğinin mücadelesinde yoğun olarak kimyasal mücadele teknikleri kullanılmaktadır. Günümüzde bu zararlının mücadelesinde farklı kimyasal pestisitler kullanılmaktadır (Tablo 1). Ancak kullanılan bu pestisitler; çevre kirliliği, kalıntı problemi ve hedef organizma dışında ortamda bulunan diğer canlıları etkilemek gibi çeşitli olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Bu zararlının mücadelesinde kimyasal mücadelenin yanı sıra mekanik mücadele teknikleri de kullanılmaktadır. Daha çok küçük alanlarda toplu halde bulunan büyük lahana kelebeği yumurtalarının ve larvalarının toplanıp imha edilmesi şeklinde yapılan bu mücadele, uygulama zorluğu ve fazla iş gücü gereksiniminden dolayı pek tercih edilmemektedir.

Tablo 1. Günümüzde *P. brassicae* ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitler (URL-4, 2011).

| Etkili Madde Adı ve Oranı | Formülasyonu | Dozu (Preparat) Dekara 100 lt suya |
|------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| Dichlorvos, 550 g/l | EC | 200 ml |
| Malathion, 190 g/l | EC | 500 ml |
| Malathion, % 25 | WP | 400 g |
| Malathion, 650 g/l | EC | 170 ml |
| Malathion, % 5 | Toz | 3 kg |
| Diazinon, 185 g/l | EC | 200 ml |
| Carbaryl, % 50 | WP | 250 g |
| Carbaryl, % 5 | Toz | 3 kg |
| Fenitrothion, % 3 | Toz | 3 kg |
| Cartap, % 95 | SP | 125g |
| Fenitrothion, % 40 | WP | 200 g |
| Chlorpyrifos-methyl, 227 g/l | EC | 150 ml |
| Bromophos, % 36 | EC | 100 ml |

Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu zararlının çok sayıda paraziti, (yumurta, larva ve pupa) parazitoidleri ve patojenleri tespit edilmiştir. Bu nedenle bu zararlının mücadelesinde üçüncü bir mücadele şekli olan biyolojik mücadele, yapılan çalışmalarla her geçen gün önem kazanmaktadır.

Büyük lahana kelebeğinin mücadelesinde kullanılan ve kullanım potansiyeline sahip organizmalara baktığımızda; larva parazitoidi, yumurta parazitoidi, pupa parazitoidi ve entomopatojenik bakteri, nematod ve mikrospor türleri dikkat çekmektedir.

Larva parazitoidi olarak, *Cotesia glomeratus*, *C. nothus*, *Cotesia rubecula*, *Exorista larvarum*, *Exorista segregata*, *Hyposoter ebeninus*, *Allothrombium sp*, *A. glomeratus*, *Hyposoter didymator*, *Chelonus oculator*, *Chrysoperla carnea*, *Pontia dablidice*, *Phryxe vulgaris* günümüze kadar tespit edilen türlerdendir (Akdağcık, 2010; Avcı ve Özbek, 1990).

Yumurta parazitoidi olarak *Trichogramma sp*, *Tetrastichus galactopus*, pupa parazitoidi olarak ise *Aprostocetus taxi*, *Agrothereutes adustus*, *Blapsidotes vicinus*,

Brachymeria femorata, *Hyposoter clauses*, *Phryxe vulgaris*, *Pteromalus puparum*, *Pteromalus semotus*, *Baryscapus galactopus*, *Pimpla instigator*, *Compsilura concinnata*, *Exorista segregata* türleri tespit edilmiştir (Tozlu vd., 2002; Razmi vd., 2011).

Büyük lahana kelebeğinde hastalık oluşturan entomopatojenik bakteriler ise *Bacillus* spp. suşları, *Xanthomonas campestris*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Yaman, 2000)'dir. Bir entomopatojenik nematot türü olan, *Steinernema carpocapsae* türü de büyük lahana kelebeğinin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeline sahiptir (URL-5, 2011). Örnekleri verilen patojen ve parazitoidlerin dışında, son yıllarda yapılan çalışmalar büyük lahana kelebeğinin kontrolünde diğer bir entomopatojen türü olan mikrosporlara dikkat çekmektedir.

1.3. Microsporidia

Protista alemine ait olan, ökaryotik mikrosporodiyalar, zorunlu hücre içi parazitlerdir. Mitokondrileri bulunmayan mikrosporodiyalar, hücre dışında kalın protein ve kitin yapıda duvarla çevrili sporlar halinde bulunurlar. Sarmal yapıda polar filament içerirler (Vavra, 1976 a, b).

Mikrosporların gelişimi, merogoni ve sporogoni safhalarını içerir. Merogoni sayesinde vejetatif çoğalma gerçekleşirken, sporogoni ile sporlar meydana gelir. Merogoni ile sporogoni aşamaları ve hayat döngüsündeki evrelerin çekirdek sayıları, türden türe değişiklik gösterir.

Mikrosporlar iki çeşit spor oluştururlar. Bunlardan ilki daha kalın spor duvarına sahip olan eksternal sporlardır. İkincisi ise konak içinde farklı dokulara bulaşmaya yarayan internal sporlardır. Eksternal sporlar konak tarafından vücuda ağız yoluyla alınır. Besin yoluyla meydana gelen bu taşınım horizontal taşınım olarak adlandırılır. İnternal sporlar ise hastalıklı dişi tarafından yumurta aracılığıyla bulaştırılır. Sporların bu yolla bulaştırılmasına ise vertikal taşınım denir.

Genellikle tek tip olan sporları çok küçüktür (1-20 µm). Mikrosporlar ışık mikroskopunda ışığı kıran, neredeyse aynı boyut ve şekilde çok sayıda spor ile kendini belli eder. Spor şekil ve boyutları türden türe değişmekle birlikte, çoğu 2-7 µm aralığındadır ve genellikle oval şekle sahiptir.

Mikrospora ait sporlar, konak tarafından vücut içine alınıp bağırsağa ulaştıktan sonra polar filamentlerini dışarı çıkarıp polar tüp oluştururlar ve konağın hücre zarını delerek

içine girerler. Mikrosporidialar konak hücrenin tüm bağışıklık sistemini bu şekilde aşarlar. Sporun içindeki çekirdek ve sitoplazmadan oluşan sporoplazma tüp vasıtasıyla konak hücre içine aktarılır (Hazard vd., 1984, 1985).

Konak hücreyi enfekte eden mikrosporların ilk vejetatif hayat safhası, meront safhasıdır. Küre şeklinden oval şekle değişiklik gösteren merontlar ince bir hücre duvarına sahiptir. Merontlar hızla ve çok sayıda mitoz bölünme geçirerek sporontları oluştururlar. Küre ya da uzun şekilli sporontların hücre duvarının kalınlaşmaya başladığı gözlenir. Bir sonraki safhada organelleri belirginleşen hücre duvarı oldukça kalın sporoblastlar göze çarpar. Sporoblastlar, patojenin tanımlanmasında karakteristik özelliğe sahip olan olgun sporları oluşturan son vejetatif safhadır.

Mikrosporlar, konak spesifitesi olan canlılardır, yani doğada tek bir konağı tercih ederler. Bununla birlikte enfeksiyon gerçekleştirdikleri zararlının ölümüne sebep olmazlar. Bunun yerine buldukları konağın hayat süresinin kısılmasını, canlılıklarının azalmasını, iştah ve kilo kaybını ve aynı zamanda üreme potansiyellerinin azalması gibi belirtileri olan kronik bir hastalığa yol açarlar. Mikrosporidialar genel olarak tek bir konağa özgü olmaları nedeniyle biyolojik mücadelede kullanıma uygun patojenlerdir. Böylelikle sadece hedef organizmayı etkilerler, çevreye ve diğer organizmalara zarar vermezler. Bu özellikleri ile tercih edilmesi gereken biyolojik mücadele ajanlarıdır.

İnsanlarda da hastalığa sebep olabildikleri için mikrosporidiaların teşhis edilmesi ve karakterizasyonu son derece önemlidir. Mikrosporidiaların kesin teşhisi için Giemsa boyaması yöntemi kullanılır. Boyanan sporlar kayda değer bir küçülmeye maruz kalırlar ancak çekirdeğin oldukça belirgin bir şekilde boyanması sayesinde bu yöntem çok etkilidir. Giemsa boyama yöntemiyle teşhis edilen mikrosporların elektron mikroskobu çalışmaları sayesinde detaylı karakterizasyonunu yapmak mümkündür (Yaman ve Radek, 2003).

1.4. Tezin Amacı

Çalışmaları yapılan bu yüksek lisans tezinde, başta Brassicaceae familyasına ait sebzelerin üretiminde büyük zararlara neden olan Pieridae familyasından Büyük Lahana Kelebeği (*P. brassicae* L. Lepidoptera: Pieridae)'nde doğal olarak hastalık oluşturan, dünya literatürü için de yeni bir kayıt olan mikrospor patojeninin tespiti, izolasyonu ve çeşitli metodlarla karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Tez çalışması boyunca lahana türlerinde zarara neden olan Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae*)'nde doğal enfeksiyon oluşturan bir entomopatojenin tür seviyesinde teşhisinin yapılabilmesi için ışık, elektron (TEM) mikroskopisi ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.1. Örneklerin Elde Edilmesi

Bu çalışmanın konusunu oluşturan büyük lahana kelebeği larvaları 2011 yılı Haziran-Ağustos ayları arasında Trabzon'un belirli lokalitelerinden toplanmıştır. Arazi çalışmaları sırasında zararlıya ait larvalar dikkatlice uygun kaplara toplanmıştır. Larvaların elde edildiği yer, tarih ve önemli olarak nitelendirilebilecek her türlü bilgi bir arazi defterine not edilmiştir ve toplanan bireyler en kısa sürede, güvenli bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

2.2. Mikroskopik Çalışmalar

Büyük Lahana Kelebeği'nin larvalarında enfeksiyon gerçekleştirdiği belirlenen bu yeni mikrospor türünün; morfolojik, anatomik ve histopatolojik özelliklerini ortaya koymak için ışık ve elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları yapılmıştır.

2.2.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucunda elde edilen büyük lahana kelebeği larvaları, hazırlanan Ringer solüsyonu içinde disekte edilmiştir. Diseksiyon, larvaların iç organlarının dışarı çıkarılması ile yapılmıştır. Tüm doku ve organları içerecek şekilde hazırlanan preparat ışık mikroskobu (Olympus CX41) altında 40X'ten 1000X'e kadar olan büyütmelemlerle incelenmiştir. Enfeksiyon tespit edilen preparatlar, DP-25 dijital kamera ve DP2-BSW resim sistemine sahip Olympus BX51 mikroskobuyla yeniden incelenmiş, patojenin

fotoğrafları çekilmiş ve karakterizasyonu için gerekli olan ölçümler yapılmıştır (Yaman vd., 2009a, 2009b; Yaman ve Radek, 2011).

Larva dokularıyla hazırlanan preparatlarda, enfeksiyon yapan patojenler çoğu zaman, preparatta mevcut olan besin artıkları ile morfolojik bakımdan benzerlik gösterebilir. Ortaya çıkabilecek bu karışıklığı gidermek için Giemsa boyama tekniği kullanılmıştır. Tespit edilen tüm mikrospor enfeksiyonlu preparatlar gerekli işlemlerden geçirilerek Giemsa ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar incelenmiş ve var olan sporlar boyanma şekilleri ile ayırt edilip ölçümleri tekrar yapılmıştır.

2.2.1.1. Giemsa Boyama

Giemsa boyası sayesinde hücrenin sitoplazması ve çekirdeği farklı renklere boyanır. Sitoplazmik kısım açık mavi ve kırmızıya boyanırken nüklear kısım pembe renkte boyanır. Böylece detaylı bir inceleme ortamı sağlanarak patojen ya da parazitin hayat döngüsü safhalarıyla birlikte ortaya konulur. Bununla birlikte Giemsa boyası spor duvarını boyamadığı için tespit ve teşhis de çok önemli bir rol oynar.

Enfeksiyon tespit edilen preparatların boyama işlemi sırasıyla şu aşamalardan geçirilerek yapıldı; öncelikle preparat oda sıcaklığında kurutuldu, % 100'lük metil alkolde 3 dakika bekletilerek fikse edildi ve tekrar oda sıcaklığında kurutulup saf suyla hazırlanan % 5'lik Giemsa boyasında 16 saat boyamaya bırakıldı. Boyanan preparat steril suyla yıkayıp kurutuldu ve incelemeye hazır hale getirildi. Son olarak da immersiyon yağı ile birlikte 1000X'lik büyütmede preparatlar incelendi (Toguebaye vd., 1988; Undeen ve Vavra, 1997; Yaman vd., 2009a, 2009b; Yaman ve Radek, 2011).

2.2.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) çalışmaları, incelenmesi istenen yapıların morfoloji ve iç yapılarının ayrıntılı bir şekilde açığa çıkarılması bakımından çok önemlidir. Bu tez çalışmaları sırasında tespit edilen mikrosporun, *Nosema* cinsine ait yeni bir tür olduğunun kanıtlanmasında elektron mikroskobunun katkısı büyüktür. Büyük lahana kelebeği larvalarından izole edilen *Nosema* sp'nin detaylı yapısı Almanya, Berlin

Üniversitesi, Zooloji Enstitüsü Laboratuvarı'nda Philips JM 208 elektron mikroskopunda incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.2.2.1. Resine Gömme İşlemi ve Elektron Mikroskobu Çalışması

Işık mikroskobu altında enfeksiyon olduğu tespit edilen preparattaki dokular dikkatlice alınarak birtakım işlemlerden geçirilmiş ve resine gömülmüştür. Böylece dokular elektron mikroskopunda incelenmek için hazır hale getirilmiştir.

Yukarıda bahsedilen işlemler şunlardır; ayrılan doku materyali pH 7,2'de 0,1 M kakodilat tamponu ile seyreltilen % 2,5'lik glutaraldehit içinde iki saat boyunca fikse edilmiş, pH 7,2'de 0,1 M kakodilat tamponu içerisinde üç kez 10'ar dakika yıkanmıştır. Daha sonra O_3O_4 ile 2 saat süreyle muamele edilmiş, yeniden pH 7,2'de 0,1 M kakodilat tamponu içerisinde üç kez 10'ar dakika yıkanmıştır.

Numuneler sırasıyla % 30'luk, % 50'lik ve % 70'lik etanolla 15'er dakika, % 90'lık, % 96'lık ve % 100'lük etanol ile 10'ar dakika üçer kez muamele edilip dehidrasyona uğratılmıştır. Daha sonra 1:1 oranında hazırlanan ERL:Etanol karışımı ile 1 saat, 3:1 oranında hazırlanan ERL:Etanol karışımı ile 4 saat muamele edilen numuneye Epoxy resin emdirilmiştir. Saf ERL içerisinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Taze saf ERL ile beem tüplerine aktarılmış ve ortalama 48 saat 70 °C'de etüv içerisinde sertleşmeye bırakılmıştır. Resinlerden ultra mikrotom kullanılarak kesitler alınmış, bu kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır (Radek ve Fabel, 2000; Yaman ve Radek, 2003).

2.2.3. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalarda, enfekte olduğu önceden ışık mikroskobu ile belirlenen büyük lahana kelebeği larvaları kullanıldı. İlk olarak ependorf homojenizatörü ile birlikte, mikrospor sporları ile enfekte olmuş larvalar bir ependorf tüp içerisinde homojenize edildi. Saf su ilave edilen homojenizat, kaba böcek parçalarından içinde pamuk bulunan enjektör ile ayrıldı. Ayırma işleminin ardından sporları tamamen saflaştırmak için elde edilen süspansiyon 3000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernetant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pellet saf su ile sulandırılarak 3000 rpm'de 2 dakika tekrar santrifüj edildi ve bu işlem mikrospor sporlarını iyice saflaştırana kadar birkaç kez tekrar edildi. Saflaştırma işleminin sonunda sporlar hemositometre ile sayıldı ($7,6 \times 10^8/ml$).

Sayımı tamamlanan sporlar bir ependorf tüp içerisinde +4°C' de moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere depolandı.

2.2.3.1. DNA İzolasyonu ve rDNA Amplifikasyonu

Bu tez çalışmasında; ışık ve elektron (TEM) mikroskobu incelemeleri tamamlanan mikrospor patojeninin filogenetik açıdan incelenebilmesi için önceden saflaştırılmış mikrospor sporlarından DNA izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodu kullanılarak rDNA amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylelikle bu mikrospor patojeni filogenetik analizlere hazır hale gelmiştir.

Yukarıda bahsedilen DNA izolasyonu ve rDNA amplifikasyonu işlemlerine sırası ile değinecek olursak; önceden böcek dokularından arındırılan ve +4°C' de depolanan mikrospor sporlarından 50 µl alınarak bir ependorf tüp içerisine aktarıldı ve bu sporların spor duvarlarının parçalanması için 50 µl % 0,3' lük H₂O₂ (Hidrojenperoksit) eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi (Higes vd., 2006). Hidrojenperoksit ile kimyasal yolla inceltile spor duvarları mekanik yıkım için cam bilyelerle vortekslendi (Hylis vd., 2005). Bu işlemlerin ardından ticari DNA izolasyon kiti (QIAGEN, No; 69504) kullanılarak üreticinin kit içerisinde belirtmiş olduğu direktiflere uygun şekilde DNA izole edildi.

DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra Multiplex PZR tekniği kullanılarak rDNA amplifikasyonu gerçekleştirildi. Multiplex PZR çalışmalarında 18F 5'-CACCAGGTTGATTCTGCC-3' ve 1537R 5'-TTATGATCCTGCTAATGGTTC-3' primerleri kullanıldı (Baker vd., 1995). PZR reaksiyonları, Qiagen Multiplex PCR Kit, No: 206143 kullanılarak üretici talimatlarına uygun şekilde toplam hacim 50 µl olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirildi. Yine ticari kitin (QIAGEN Multiplex PCR Kit, No: 206143) kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi PZR amplifikasyonları; 95°C' de 15 dakika, her biri 45 döngü olacak şekilde 94 °C' de 30 saniye, 61°C' de 90 saniye, 72 °C' de 90 saniye ve son döngüyü takiben son uzama reaksiyonu 72 °C' de 10 dakika olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünü % 0,9' luk, etidyum bromür (EtBr) ilaveli agaroz jelde yürütülerek UV transilluminatörde varlığı belirlendi. Varlığı belirlenen PZR ürünü, baz dizin analizleri için Macrogen Inc. firmasının Hollanda şubesine gönderildi ve baz dizin analiz sonuçları, NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzü kullanılarak GenBank' taki verilerle karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

3. BULGULAR

Brassicae türlerinin en önemli zararlılarından biri olan Lepidoptera takımına ait, büyük lahana kelebeği (*Pieris brassicae*) ile mücadelede kullanılmak amacıyla zararlının doğal düşmanı olan mikrosporidium patojeninin varlığı araştırıldı. Bu amaçla yapılan arazi çalışmalarında böceğin larvaları Trabzon'un farklı bölgelerinden toplandı. Toplanan 30 larvadan 2'sinde mikrospor enfeksiyonuna rastlanılmıştır. Tez çalışması süresince bu patojenin tanımlanması, karakterizasyonu ve büyük lahana kelebeğindeki varlığının tespiti için gerekli çalışmalar yapıldı. Tespit edilen mikrosporidium patojeni ile ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verildi.

3.1. *Pieris brassicae* L.' de Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi

Söz konusu bu çalışmada, büyük lahana kelebeğinde doğal enfeksiyon oluşturan bir mikrosporidium türünün tespiti ve karakterizasyonu için ışık ve elektron mikroskobu çalışmalarının yanı sıra, yine büyük lahana kelebeğinde enfeksiyon oluşturan bilinen diğer mikrospor türleri ile karşılaştırma yapabilmek için filogenetik çalışmalarda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Makroskobik Görünümü

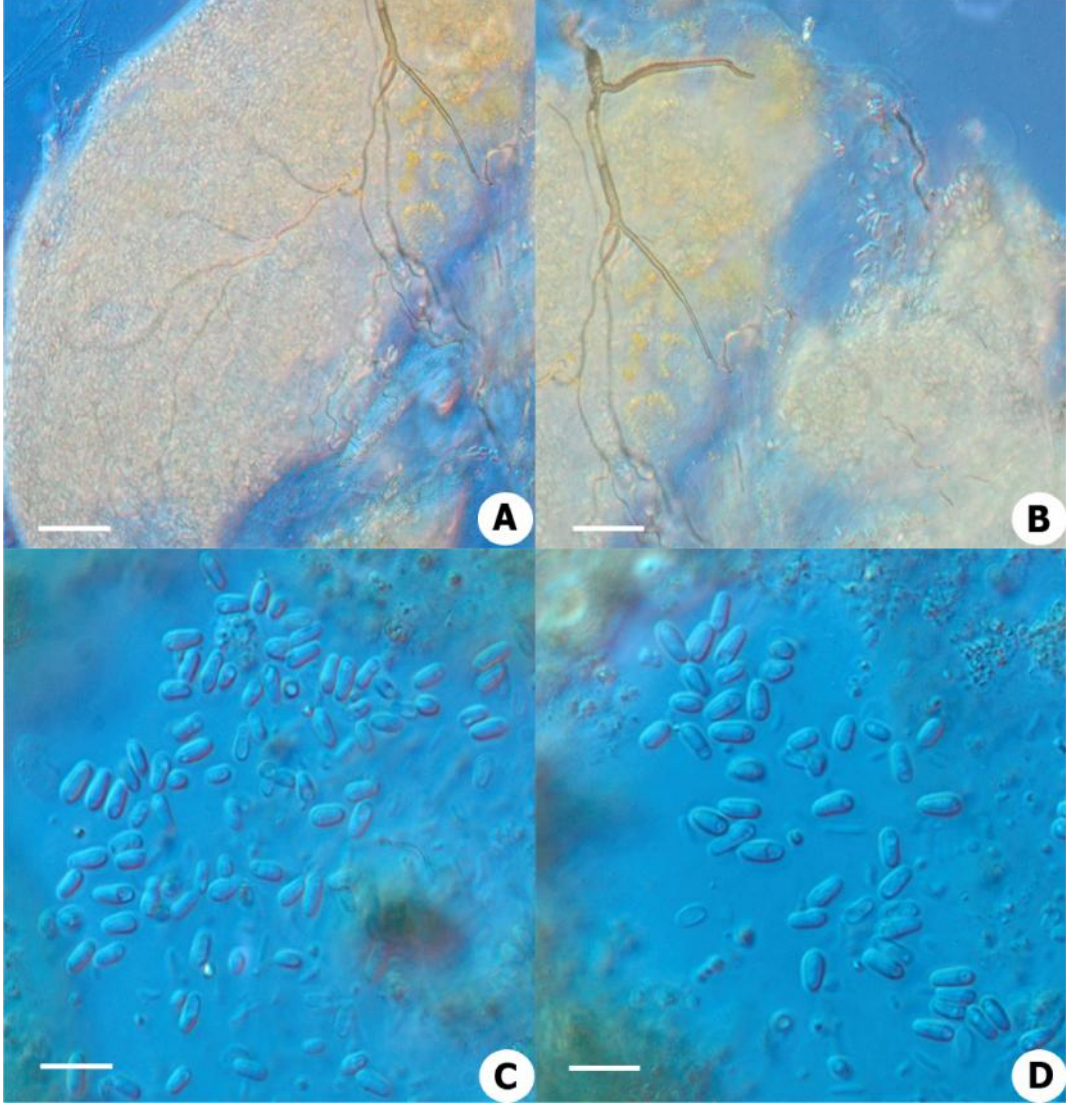
Mikrospor enfeksiyonunun konağı üzerinde makroskobik olarak gözlenebilen birkaç semptom mevcuttur. Bu belirtiler arasında aşırı genişlemiş vücut kısımları, deride renk değişimi, hareket yeteneğinde azalma, iştahsızlık, kütikül üzerinde belirgin leke benzeri renklenmeler ve larvaların instar değişimindeki anormallikler sayılabilir. Ayrıca dişi böceklerin yumurtlama veriminde azalmanın gerçekleştiği de bilinmektedir (Joudrey ve Bjørnson, 2007). Her ne kadar şüphelenilen enfeksiyonun belirlenmesinde makroskobik bulgular önemli olsa da, kesin yargıya varabilmek için mikroskobik düzeydeki bulguların önemi büyüktür.

3.1.2. Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, tespit edilen mikrospor patojeninin mikroskopik olarak incelemeleri; ışık mikroskobu çalışmaları ile direkt olarak dokunun incelenmesi, enfeksiyon belirtisi gösteren numunelerin Giemsa boyama teknikleri ile incelenmesi ve tespit edilen enfeksiyonun elektron mikroskobu (TEM) incelenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen mikrospor patojeni, önce ışık mikroskobu altında incelendi. Taze preparatlardaki mikrospor patojeninin karakteristik hayat safhası olan ve ışığı farklı açıdan kıran sporlar incelenmiştir. Daha sonra entomopatojenlerin detaylı bir şekilde ele alınmasında yaygın olarak kullanılan Giemsa boyama tekniği ile spor yapıları tekrar incelenmiş ve mikrospor varlığı teyit edilmiştir. TEM çalışmaları ile mikrospor patojeninin ultrastrüktürel yapısı ortaya çıkarılmış ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi açısından detaylı olarak irdelenmiştir. Bu çalışmalar sayesinde tür tespiti sağlanmıştır.

3.1.2.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları ile Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi

Işık mikroskobu çalışmalarında incelenmek üzere diseksiyonu yapılan örneklerde mikrospor patojenine ait önemli hayat safhaları dikkatli şekilde tespit edilmeye çalışılmıştır. Doğrudan taze dokuların incelenmesi sırasında, mikrospor enfeksiyonunun bulunduğu dokulardaki morfolojik farklılıklar, normal dokular ile karşılaştırılarak enfeksiyon varlığı saptanmıştır. Taze preparatlarda konağın dokularında gerçekleşen tahribat gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu çalışmaları sonucunda mikrospor enfeksiyonunun böceğin bağırsak dokusunda enfeksiyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 3). Özel kamera ve resim sistemlerine sahip mikroskop kullanılarak, daha önce ışık mikroskobunda tespit edilen mikrosporların enfekte ettiği dokular fotoğraflanmış ve sporlarının ölçümü yapılmıştır.



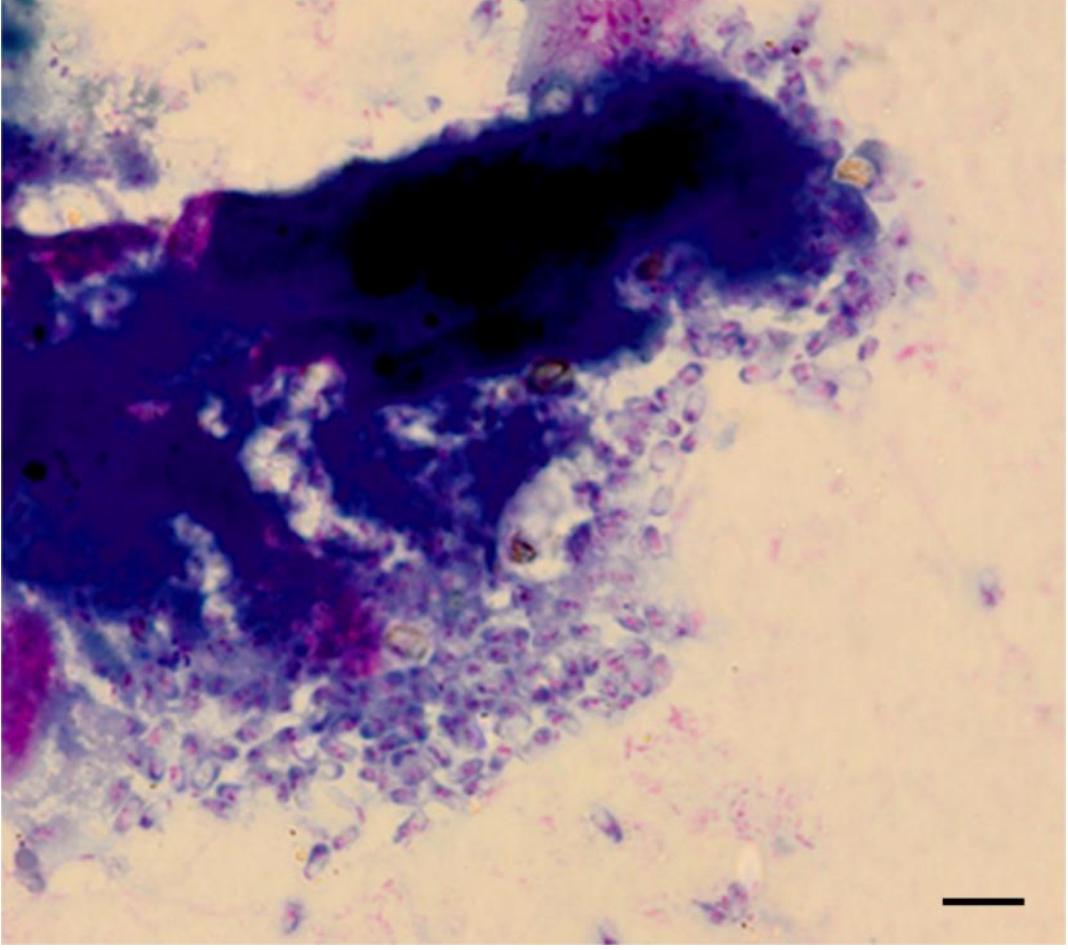
Şekil 3. Mikrospor sporları ile enfekte olmuş *P. brassicae* bağırsağı. A ve B: Mikrospor sporları ile dolu böcek bağırsağı, 40X'lik büyütme, bar: 30 μm ; C ve D: Mikrospor sporları, 100X'lik büyütme, bar: 10 μm

Mikrospor patojeninin karakteristik özelliklerini taşıyan sporlar ışığı farklı şekilde kırmaları, aynı boyut ve şekle sahip olmaları ile konakçının diğer dokularından ayırt edilmektedir. Taze praperatlarda ışık mikroskobu ile tespit edilen patojenin sporları $5,29 \pm 0,55$ ($3,71 - 7,26$; $n = 250$) μm boyunda ve $2,31 \pm 0,30$ ($1,65 - 3,30$; $n = 250$) μm enindedir. Böceklerde enfeksiyona neden olan entomopatojenler ışık mikroskobu altında morfolojik olarak birbirlerine benzemektedir. Çeşitli patojen türleri farklı özellikteki yapılarının varlığı ile karakterize edilebilmektedir. Özellikle birçok mantar türü morfolojik yapıları ile mikrospor patojeninin karakteristik spor safhasına benzerlik göstermektedir. Işık mikroskobu çalışmalarında patojenlerinin neden olabileceği karışıklığı gidermek ve

mikrospor patojenini diğer dokulardan ve patojenlerden ayırt edebilmek için çeşitli boyama teknikleri kullanılmaktadır. Entomopatojenlerin tespitinde yaygın olarak kullanılan Giemsa boyası ile preparatlar boyanarak mikrospor patojeninin karakteristik safhası olan sporlar ile hayat döngüsündeki diğer meront, sporont ve sporoblast gibi karakteristik öneme sahip safhalar boyanarak tespit edildi (Şekil 4, 5, 6, 7). Giemsa boyama metodu ile enfeksiyon kapmış böcek dokularında mikrospor enfeksiyonu teyit edildi.

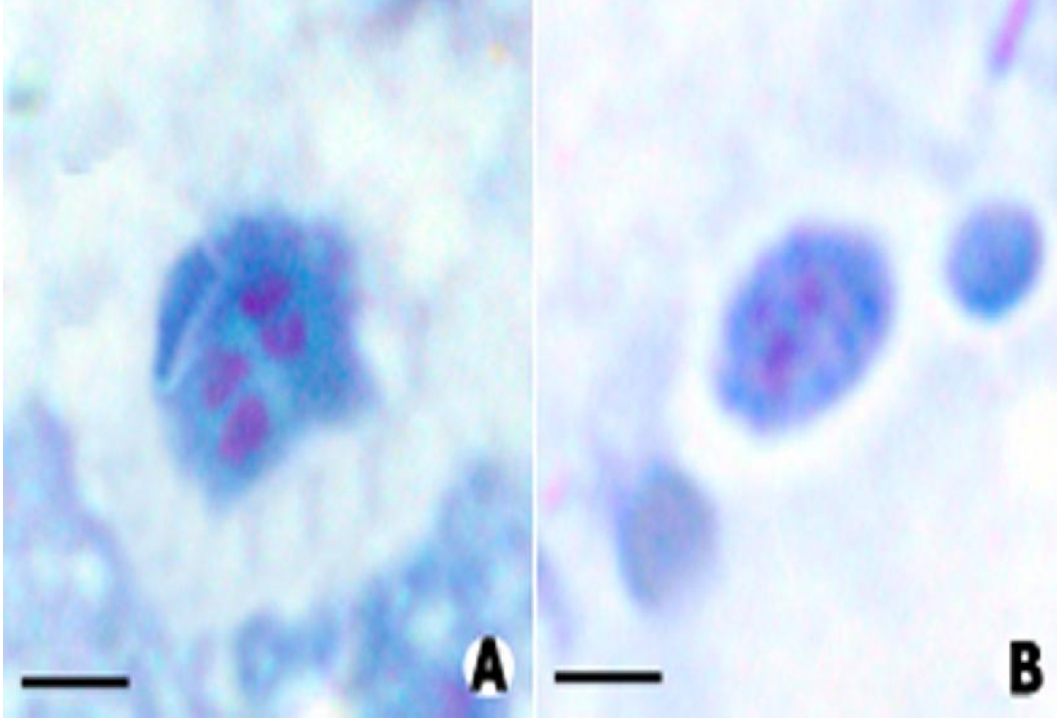
Giemsa ile boyanan numunelerde çift çekirdekli sporlar, kalın spor duvarları nedeni ile renksiz veya oldukça açık renkte, sporun posterior kutbu, farklı bir renkte, tanecikler şeklinde göze çarpan Golgi aygıtının kalıntıları da koyu mavi renkte boyandı. Hayat safhasının diğer önemli safhalarında sitoplazmanın belirgin mavi renkte, çekirdeklerin koyu mor renkte boyandığı gözlemlendi.

Mikrospor patojeninin tanımlanmasında karakteristik safhası spor safhasıdır. Sporlar oval şekillidir (Şekil 5). Giemsa ile boyama işleminden sonra mikrospor patojenine ait sporlar tekrar ölçüldü, ölçümler sonrasında sporların boyu $4,21 \pm 0,50$ ($3,13 - 5,47$; $n = 50$) μm , eni ise $1,91 \pm 0,24$ ($1,31 - 2,45$; $n = 50$) μm olarak tespit edildi.



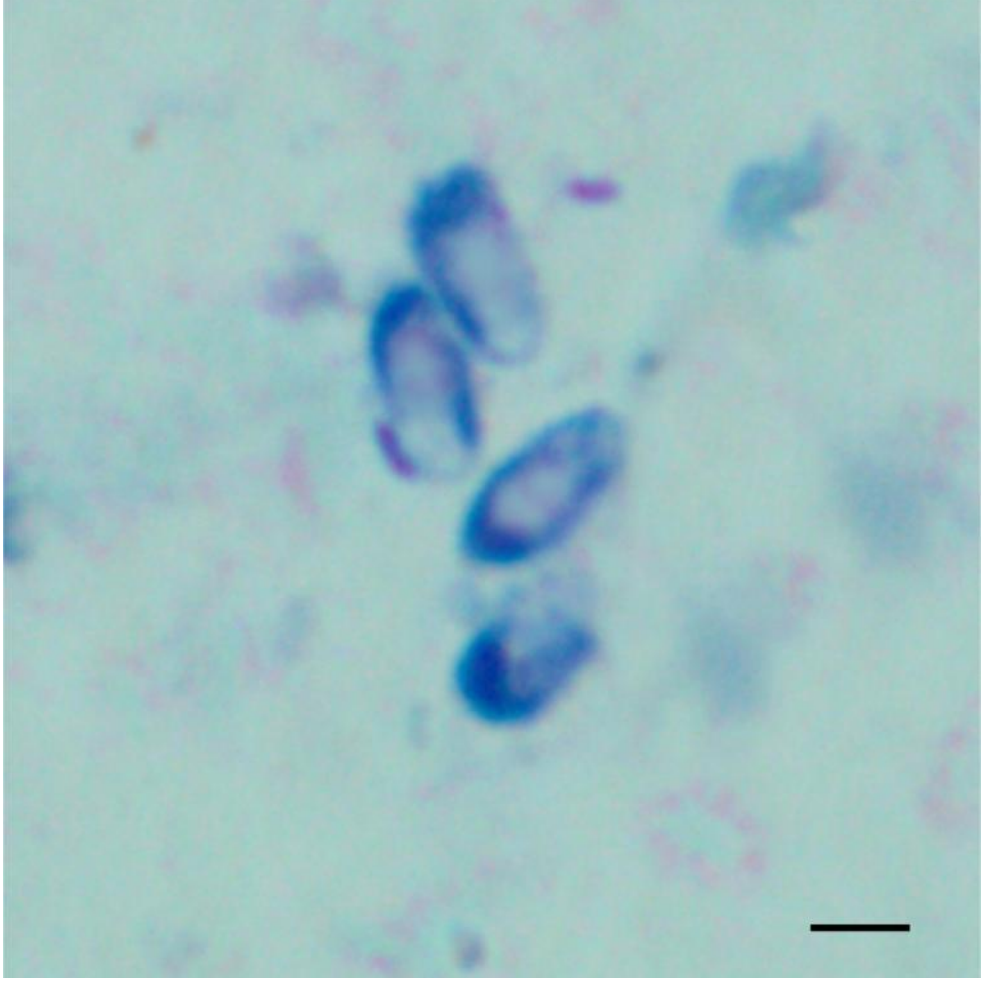
Şekil 4. Giemsa boyalı böcek dokusu, mikrospor sporları ve çeşitli hayat safhaları, bar; 20 μ m

Tespit edilen mikrospor patojenine ait ilk hayat safhası meront safhasıdır. Giemsa ile boyanan numunelerde bulunan merontların sitoplazması kısmen mavi renkte, nukleuslar ise belirgin mor renkte boyanmıştır. Tek bir diplokaryona sahip merontlar küresel veya oval şekillidir (Şekil 5). Küre şeklindeki merontlar $3,68 \pm 0,73$ ($2,89 - 4,78$; $n = 8$) x $3,32 \pm 1,09$ ($2,13 - 4,97$; $n = 8$) μ m ölçülürken, oval merontlar $4,04 \pm 0,74$ ($3,02 - 6,32$; $n = 30$) x $2,63 \pm 0,49$ ($1,66 - 4,09$; $n = 30$) μ m olarak ölçüldü.



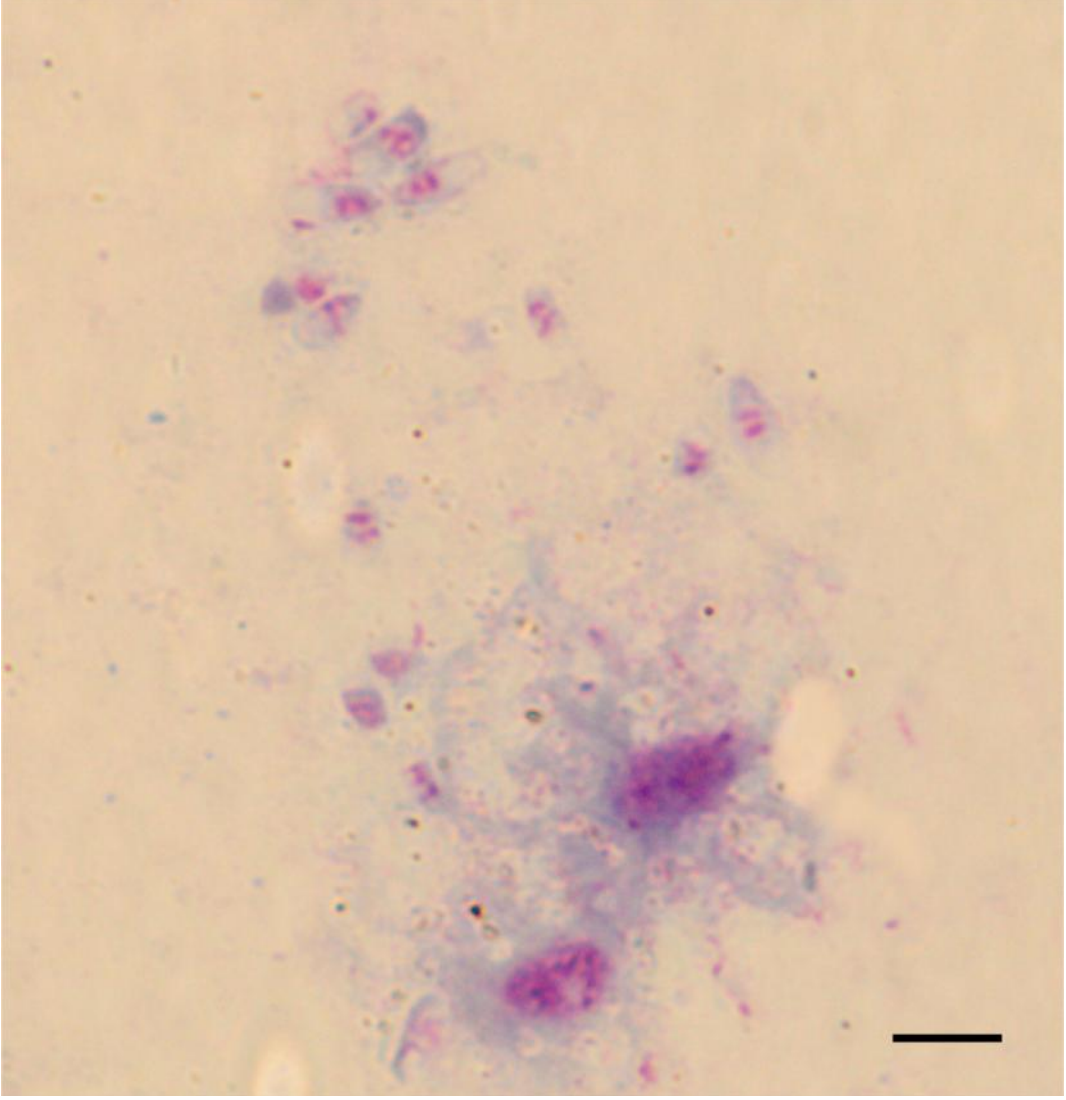
Şekil 5. Mikrospor hayat döngüsünün karakteristik meront safhası, A: Küresel meront, bar: 3 µm, B: Oval meront, bar: 2 µm.

Mikrospor patojeninin merontları birçok bölünme geçirerek sporontları meydana getirir. Giemsa ile boyanan sporontların sitoplazmaları, merontlara oranla daha açık mavi renkte, çekirdekleri ise mor renkte boyandı. Sporontlar küresel şekilden uzamış şekle değişen yapıdadır (Şekil 6). Boyalı numunelerde gözlemlenen sporontlar $4,52 \pm 0,48$ ($3,46 - 5,62$; $n = 60$) x $2,16 \pm 0,27$ ($1,65 - 3,38$; $n = 60$) µm ölçülerine sahiptir. Diplokaryotik sporlar sporoblastları oluşturmak için tek bir bölünme geçirirler (Şekil 6).



Şekil 6. *P. brassicae*'de tespit edilen mikrospor patojenine ait sporont safhası, bar: 2 μm

Olgun sporları oluşturacak olan sporoblast safhası, mikrosporun hayat döngüsünün son vejetatif safhasıdır. Giemsa ile boyandıktan sonra sporoblastların sitoplazmaları çok açık mavi, nükleusları açık mor renkte gözlemlendi. Tespit edilen diplokaryotik sporoblastlar uzamış şekildedir. Giemsa boyalı numunelerde sporoblastlar $4,67 \pm 0,60$ ($3,48 - 5,98$; $n = 35$) x $2,30 \pm 0,30$ ($1,85 - 2,94$; $n = 35$) μm boyutlarında ölçüldü (Şekil 7).



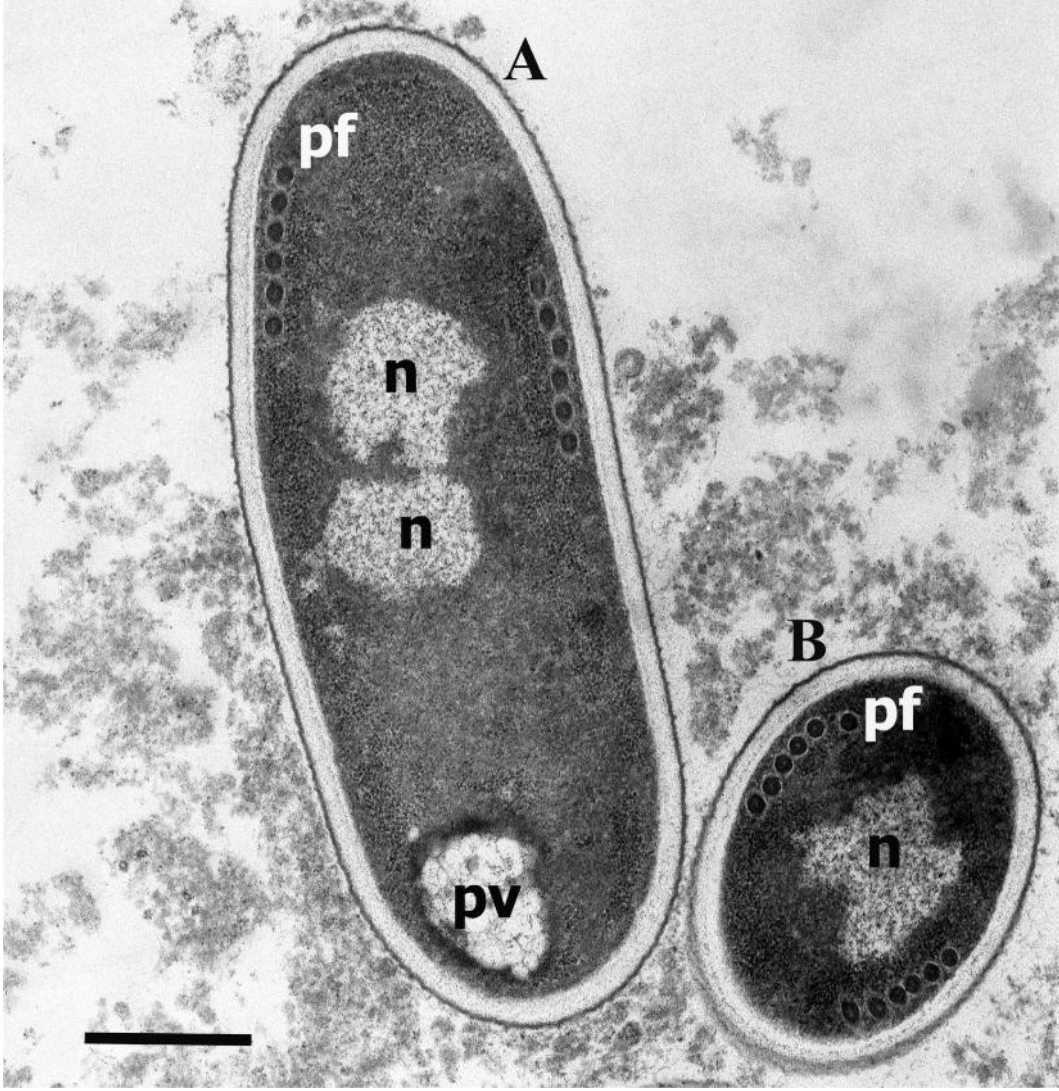
Şekil 7. *P. brassicae*'de tespit edilen mikrospor patojenine ait diplokaryotik sporoblast safhası, bar: 7 μ m

3.1.2.2 Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi

Yukarıda bahsedildiği gibi büyük lahanaya keleşleri larvalarında hastalık oluşturan patojenin ışık ve giemsa boyalı incelemeleri sonrası patojenin mikrospor olduğu tespit edilmiştir. Mikrospor patojenlerinin tür düzeyinde sınıflandırılmasında ultrastrüktürel yapılar büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle büyük lahanaya keleşleri larvalarında tespit edilen mikrosporun tür düzeyinde teşhisi için TEM çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda mikrosporların tür düzeyinde sınıflandırılmalarında kullanılan ve yaygın şekilde kabul gören spor şekli, polar filament sayısı, çekirdek sayısı, spor duvarı

kalınlığı gibi bu mikrospora ait çeşitli özellikler TEM’ de resmedilerek teyit edilmiştir (Şekil 8, 9, 10). Bu tez çalışmasında büyük lahana kelebeği larvalarında hastalık oluşturan mikrospor patojeninin *Nosema* cinsine ait yeni bir tür olduğu tespit edilmiştir.

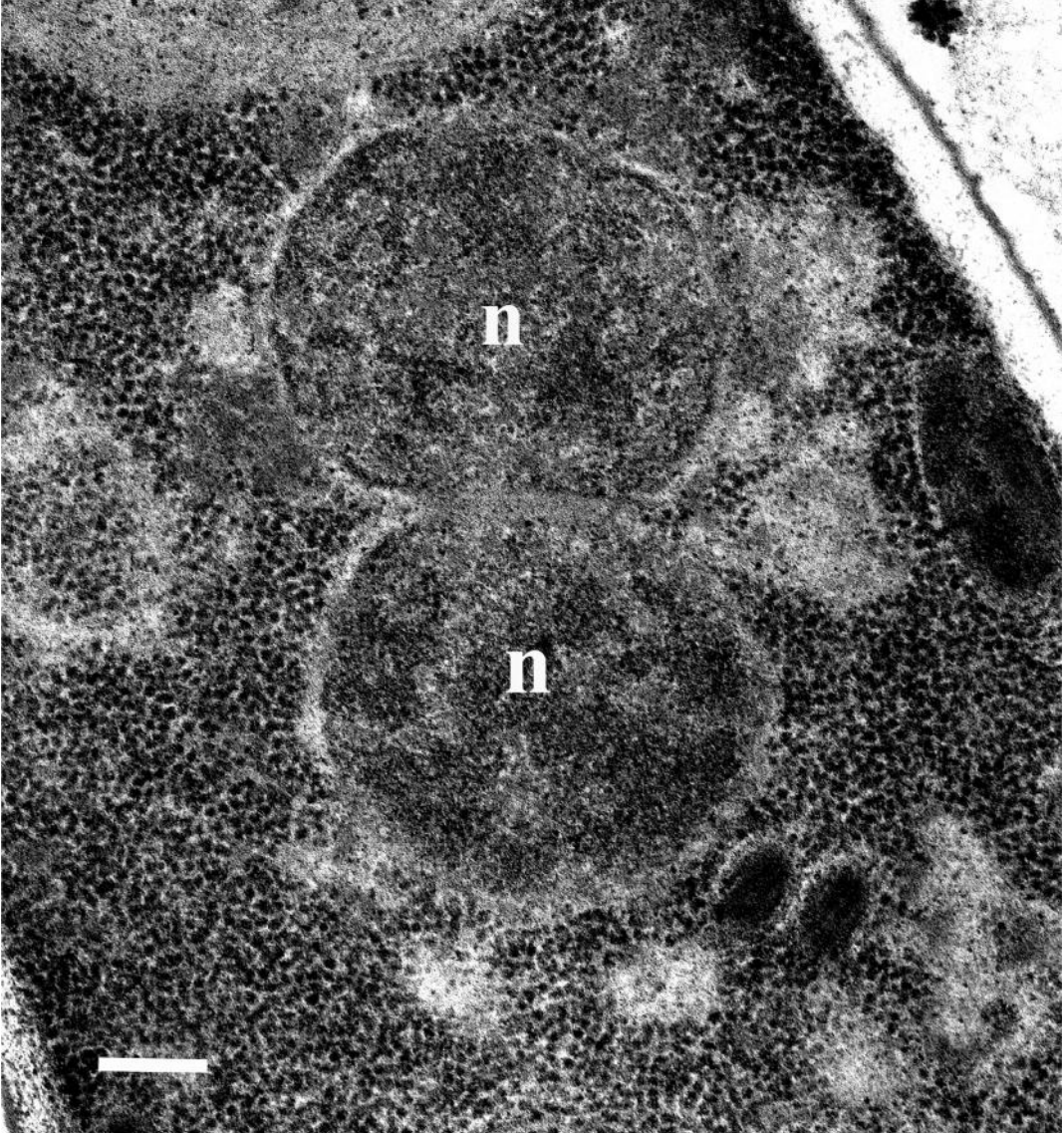
Mikrospor enfeksiyonlarının teşhisinde ve tür tanımlamalarında kullanılan karakteristik safha spor safhasıdır (Şekil 8).



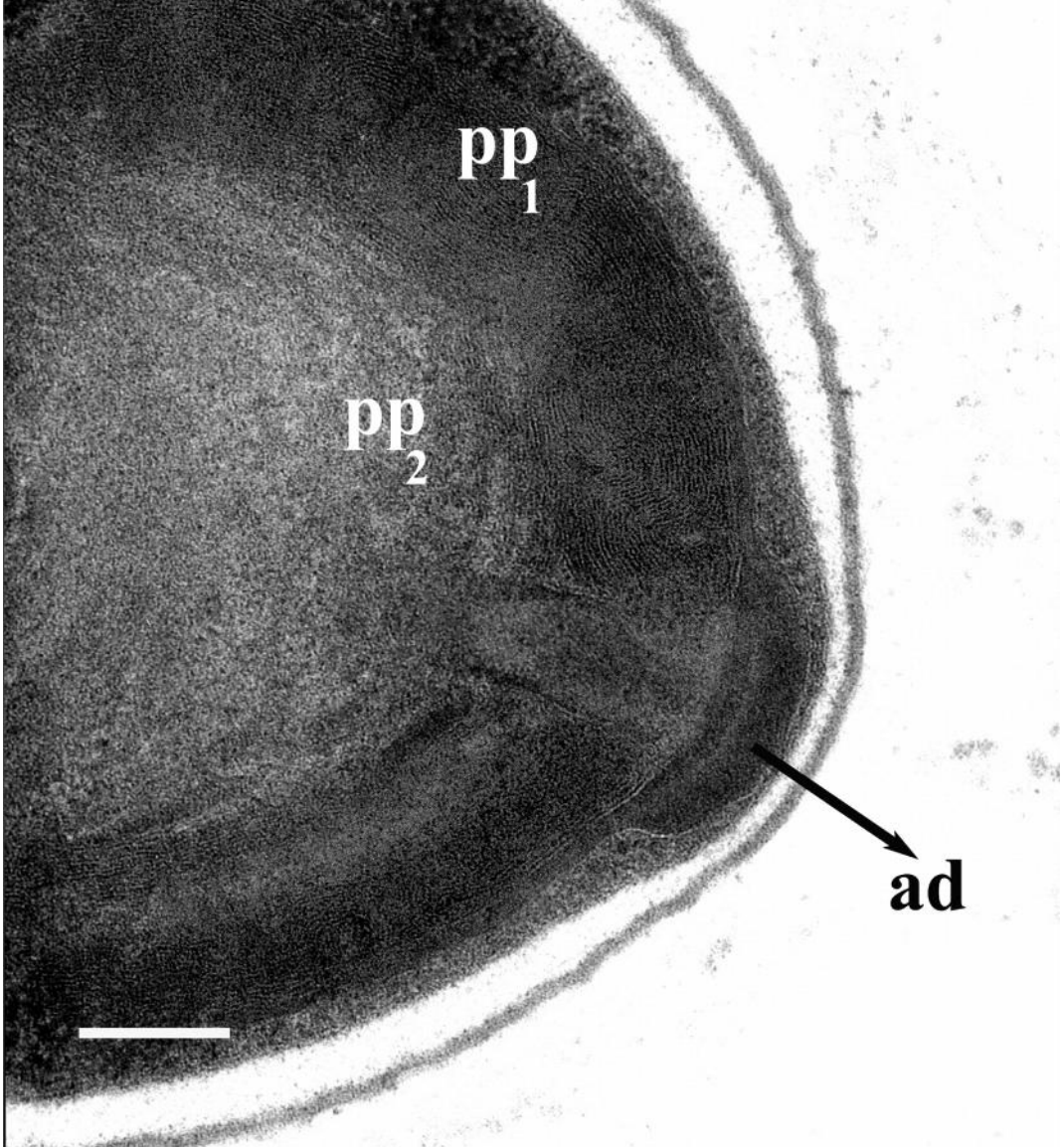
Şekil 8. *P. brassicae*'de tespit edilen diplokaryotik mikrospor sporları, A; boyuna kesit, B; enine kesit, pf: polar filament, n: çekirdek, pv: posterior vakuol, bar; 800 nm

Günümüzde mikrosporların sınıflandırılmasında; spor şeklinin yanı sıra; çekirdek sayısı, spor duvarı kalınlığı, polar filament sayısı, polar filament çapı, polaroplast şekli,

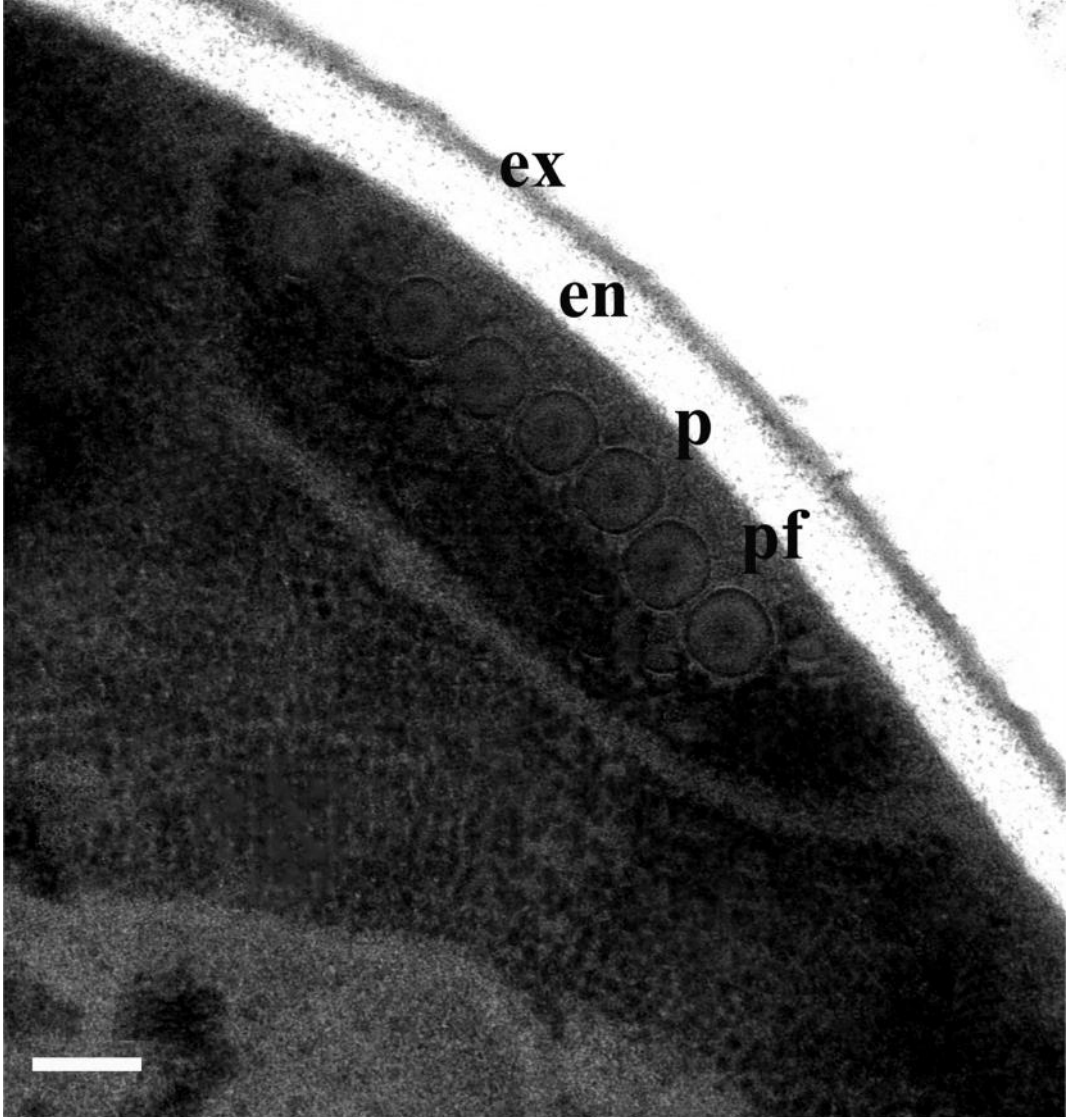
spor büyüklüğü ve hayat döngüsü gibi farklı sistematik karakterler önem arz etmektedir (Larsson, 1986) (Şekil 9, 10, 11).



Şekil 9. *P. brassicae*'de belirlenen diplokaryotik mikrospor, n: Çekirdek, bar 250 nm



Şekil 10 Mikrospor sporlarında polaroplast ve anchoring disc yapıları, pp₁; ince lamellar tip polaroplast, pp₂; kalın lamellar tip polaroplast, ad; anchoring disc yapısı, bar: 200 nm

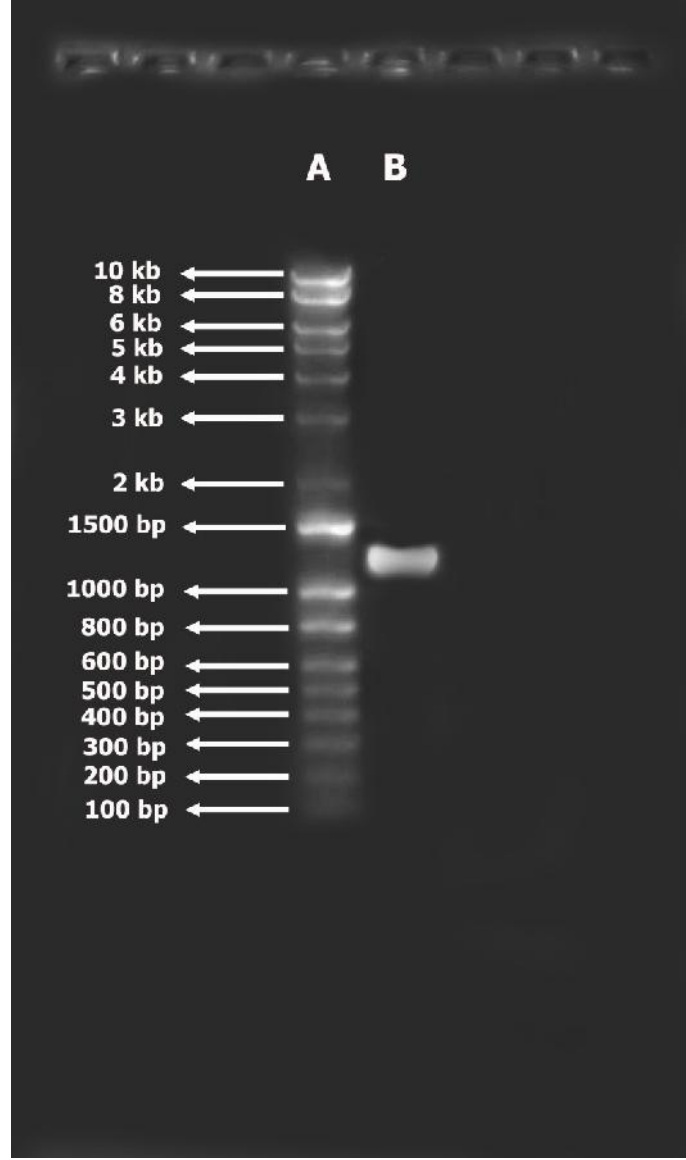


Şekil 11. Tespit edilen mikrospor patojenin de ekzospor, endospor, plazma zarı ve polar filament yapıları; ex: Ekzospor, en: Endospor, p: Plazma zarı, pf: Polar filament, bar: 200 nm

3.2. *P. brassicae* L. Larvalarında Tespit Edilen Mikrospor Patojeni Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar

Büyük lahana kelebeği larvalarında tespit edilen mikrospor patojenine ait sporlar üzerinde DNA izolasyonu ve rDNA amplifikasyonu işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlemler sonucunda elde edilen rDNA' nın varlığının tespiti ve büyüklüğünün hesaplanabilmesi için etidyum bromür (EtBr) ilave edilmiş % 0,9' luk agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen PZR ürününün büyüklüğü hesaplanırken, 100 baz çiftinden (bp) başlayıp 10 kilo baza (kb) varan 16 bantlık bir skala oluşturan DNA ladder kullanıldı. Yürütme işleminin sonunda

elde edilen sonuçlar UV transilluminatörde görüntülendi ve tez konusu olan mikrospor patojenine ait rDNA' nın 1000 bp ile 1500 bp arasında bir büyüklüğe sahip olduğu belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. *P. brassicae*'de belirlenen mikrospor patojenine ait rDNA'nın agaroz jel görüntüsü; A: 16 bantlık DNA ladder, B: Mikrospor patojenine ait rDNA

Tespit edilen mikrospor patojenini diğer mikrosporlarla kıyaslamak için baz dizin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler PZR ürünlerini Macrogen Inc. firmasına doğrudan okutularak gerçekleştirildi. Bu işlem için elde edilen PZR ürünlerinden 30 µl hacminde alınarak örnek başına 2'şer µl 18F ve 1537R primerleri ile beraber

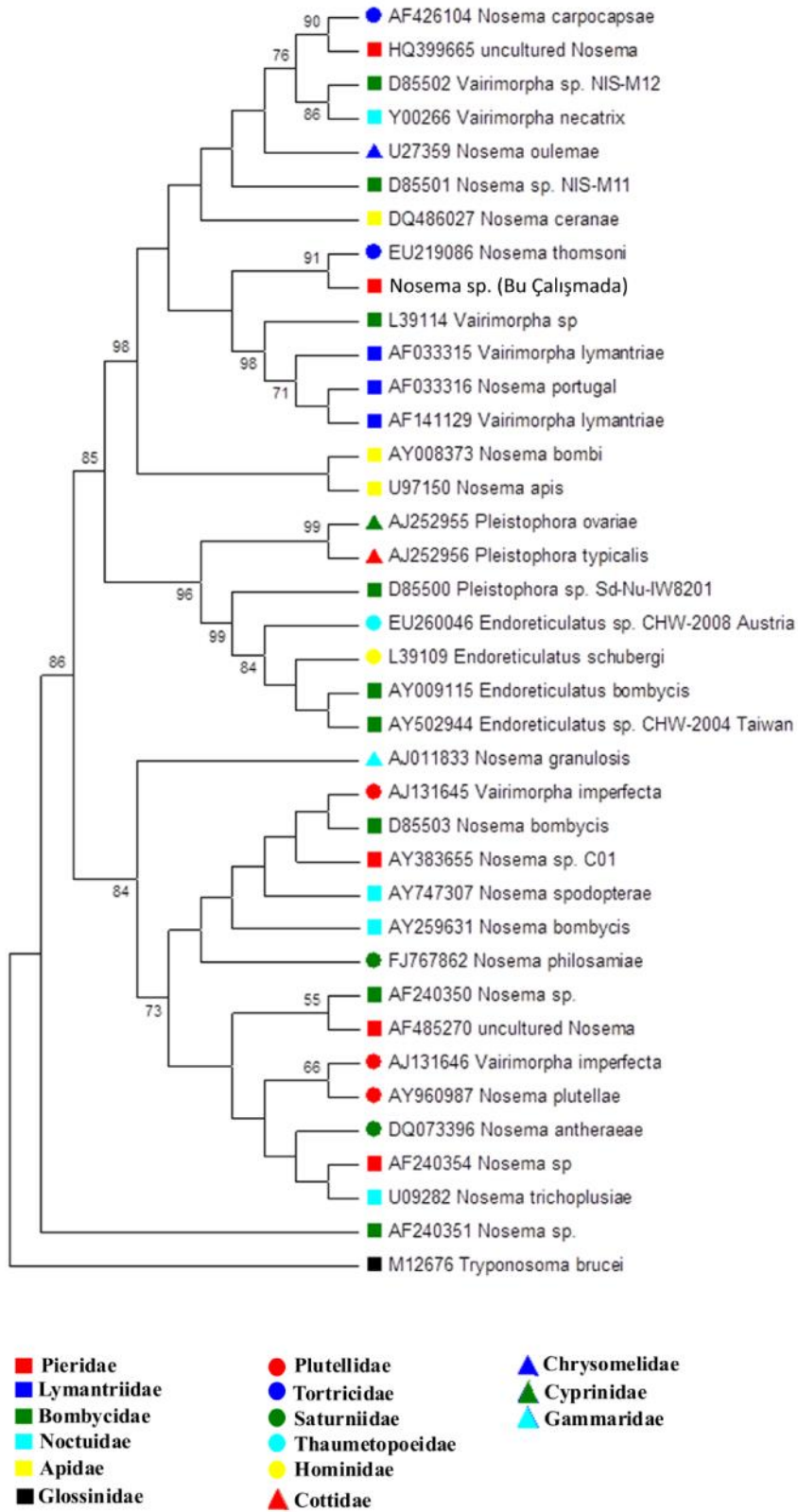
gönderilmiştir. Çalışmayı gerçekleştiren firma PZR ürününü kalıp olarak kullanarak 18F ve 1537R primerleri vasıtası ile rDNA' nın ssrRNA geninde bulunan V4 bölgesindeki kısmı baz dizilimini elde etmiştir (EK-1). Elde edilen kısmı baz dizilimi 1167 bp'lik bir dizidir. Tespit edilen baz dizilimindeki % G+C içeriği Fast PCR programı kullanılarak % 36,5 olarak belirlendi.

Baz dizin analiz sonucu, NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzü kullanılarak GenBank'taki verilerle karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi (Tablo 2).

Tablo 2. Filogenetik analizlerde kullanılan SSU rRNA baz dizileri

| Kabul Kodu | Organizma Adı | Konak | Takım | Familiya |
|------------|---|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| AF426104 | <i>Nosema carpocapsae</i> | <i>Cydia pomonella</i> | Lepidoptera | Tortricidae |
| EU260046 | <i>Endoreticulatus</i> sp. CHW-2008 Austria | <i>Thaumetopoea processionea</i> | Lepidoptera | Thaumetopoeidae |
| L39109 | <i>Endoreticulatus schubergi</i> | <i>H. sapiens</i> | Primates | Hominidae |
| AY009115 | <i>Endoreticulatus bombycis</i> | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| AY502944 | <i>Endoreticulatus</i> sp. CHW-2004 Taiwan | <i>Ocinara lida</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| AJ011833 | <i>Nosema granulosis</i> | <i>Gammarus duebeni</i> | Amphipoda | Gammaridae |
| DQ073396 | <i>Nosema antheraeae</i> | <i>Antheraea pernyi</i> | Lepidoptera | Saturniidae |
| FJ767862 | <i>Nosema philosamiae</i> | <i>Philosamia cynthia</i> | Lepidoptera | Saturniidae |
| D85502 | <i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12 | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| Y00266 | <i>Vairimorpha necatrix</i> | <i>Psuedaletia unipuncta</i> | Lepidoptera | Noctuidae |
| U27359 | <i>Nosema oulemae</i> | <i>Oulema melanopus</i> | Coleoptera | Chrysomelidae |
| D85501 | <i>Nosema</i> sp. NIS-M11 | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| DQ486027 | <i>Nosema ceranae</i> | <i>Apis cerana</i> | Hymenoptera | Apidae |
| AF033315 | <i>Vairimorpha lymantriae</i> | <i>Lymantria dispar</i> | Lepidoptera | Lymantriidae |
| AF033316 | <i>Nosema portugal</i> | <i>Lymantria dispar</i> | Lepidoptera | Lymantriidae |
| EU219086 | <i>Nosema thomsoni</i> | <i>Choristoneura conflictana</i> | Lepidoptera | Tortricidae |
| AY008373 | <i>Nosema bombi</i> | <i>Bombus terrestris</i> | Hymenoptera | Apidae |
| U97150 | <i>Nosema apis</i> | <i>Apis mellifera</i> | Hymenoptera | Apidae |
| AJ252955 | <i>Pleistophora ovariae</i> | <i>Notemigonus crysoleucas</i> | Cypriniformes | Cyprinidae |
| AJ252956 | <i>Pleistophora typicalis</i> | <i>Myoxocephalus scorpius</i> | Scorpaeniformes | Cottidae |
| D85500 | <i>Pleistophora</i> sp. Sd-Nu-IW8201 | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| AJ131646 | <i>Vairimorpha imperfecta</i> | <i>Plutella xylostella</i> | Lepidoptera | Plutellidae |
| AY960987 | <i>Nosema plutellae</i> | <i>Plutella xylostella</i> | Lepidoptera | Plutellidae |
| AF240350 | <i>Nosema</i> sp. | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| AF485270 | uncultured <i>Nosema</i> | <i>Pieris rapae</i> | Lepidoptera | Pieridae |
| AF240354 | <i>Nosema</i> sp. | <i>Pieris rapae</i> | Lepidoptera | Pieridae |
| D85503 | <i>Nosema bombycis</i> | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| AY259631 | <i>Nosema bombycis</i> | <i>Helicoverpa armigera</i> | Lepidoptera | Noctuidae |
| AY747307 | <i>Nosema spodopterae</i> | <i>Spodoptera litura</i> | Lepidoptera | Noctuidae |
| AY383655 | <i>Nosema</i> sp. C01 | <i>Pieris rapae</i> | Lepidoptera | Pieridae |
| AJ131645 | <i>Vairimorpha imperfecta</i> | <i>Plutella xylostella</i> | Lepidoptera | Plutellidae |
| AF240351 | <i>Nosema</i> sp. | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| M12676 | <i>Trypanosoma brucei</i> | <i>Glossina</i> sp. | Diptera | Glossinidae |
| L39114 | <i>Vairimorpha</i> sp. | <i>B. mori</i> | Lepidoptera | Bombycidae |
| U09282 | <i>Nosema trichoplusia</i> | <i>Trichoplusia ni</i> | Lepidoptera | Noctuidae |
| AF141129 | <i>Vairimorpha lymantriae</i> | <i>Lymantria dispar</i> | Lepidoptera | Lymantriidae |
| HQ399665 | <i>Nosema</i> sp. | <i>Pieris rapae</i> | Lepidoptera | Pieridae |
| ----- | <i>Nosema</i> sp. (Bu Çalışmada) | <i>Pieris brassicae</i> | Lepidoptera | Pieridae |

Bu çalışmada büyük lahana kelebeğinde tespit edilen mikrospor patojeninin baz diziliminin yanı sıra, çoğu Lepidoptera takımında doğal enfeksiyona neden olan mikrospor türleri ve biri analizlerde dış grup olacak şekilde toplamda 38 farklı veri kullanıldı. MEGA 5.0 programı kullanılarak bu verilerle MaximumLikelihood ağaç topolojisi elde edildi. MaksimumLikelihood ağaç topolojisi oluşturulurken dış grup olarak *Trypanosoma brucei* türü kullanıldı. MEGA 5.0 programı yardımıyla yapılan MaksimumLikelihood analizi sonucuna bakıldığında analizi yapılan verilerin tümünün 2 ana grup altında toplandığı görülmektedir (Şekil 13). Ayrıca GenBank'tan elde edilen verilerle tez konusu olan mikrosporidium türünün ssrDNA'sına ait baz dizisi, Pairwase distance analizi Kimura-2 modeline göre hesaplanarak türler arasındaki baz farklılıkları da belirlenmiştir (EK - 2)



Şekil 13. MEGA 5.0 programı ile yapılmış MaximumLikelihood analizi; renkli figürler analiz için kullanılan verilerin enfeksiyon meydana getirdikleri familya düzeyinde konaklarını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tezinde dünyada ve Türkiye’de tarım alanlarında üretilen lahana türleri üzerinde büyük zararlara neden olan büyük lahana kelebeği; *P. brassicae*’de enfeksiyon yapan mikrosporidium patojenlerinin varlığı çalışılmıştır. Paillot (1918), ilk defa söz konusu zararlıda doğal yolla enfeksiyon oluşturan *Nosema* cinsine ait bir mikrosporidium türü teşhis etmiştir (*Nosema mesnili*). Günümüze kadar büyük lahana kelebeği üzerinde doğal enfeksiyona neden olan üç adet mikrosporidium türü tespit edilmiştir (Malone ve Mcivor, 1996). Söz konusu bu çalışmada, varlığı belirlenen mikrosporidium patojeninin tespiti ve karakterizasyonu için ışık, elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Giemsa boyama ve elektron mikroskobu çalışmaları neticesinde, gerek hayat döngüsü gerekse ultrastrüktürel özellikleri dikkate alındığında bu mikrosporidium patojeninin *Nosema* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Lipa, 1968). Bu tez çalışması süresince büyük lahana kelebeğinde kaydedilen patojen; diplokaryotik safhaların varlığı, homojen ekzospor, spor duvarı kalınlığı ve spor kesesinin bulunmayışı gibi *Nosema* cinsinin tipik özelliklerine sahiptir (Larsson, 1986, 1988, 1999). Birçok *Nosema* türünün ultrastrüktürel yapısı tanımlanmıştır (Sato vd., 1982, Avery ve Anthony, 1983, Toguebaye ve Marchand, 1984, Toguebaye ve Marchand, 1986, Toguebaye ve Bouix, 1989, Canning ve Vávra, 2000, Yaman ve Radek, 2003, Yaman vd., 2005a, b, Yaman vd., 2008). Bu çalışmalar, *Nosema* cinsinin tanımlanmasında faydalı bilgiler sağlamaktadır. *Nosema* sporlarının ultrastrüktürel özellikleri Sato vd. (1982) ve Canning ve Vávra (2000) tarafından belirlenmiştir.

Günümüze kadar büyük lahana kelebeğinde *Nosema* cinsine ait kaydedilen tek tür (*Nosema mesnili*) Paillot (1918) tarafından, büyük lahana kelebeğinin Malpigi tüpleri, yağ dokusu, ipek bezleri ve kan hücreleri gibi farklı dokularında ışık mikroskopisi ile tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, büyük lahana kelebeğini doğal yollarla enfekte eden *Endoreticulatus* ve *Thelohania* cinslerine ait iki yeni mikrospor türünün varlığını ortaya koymuştur (Paillot, 1924, Veber, 1956). Söz konusu bu iki cinse ait mikrospor türleri; sporlarının monokaryotik olmalarının yanı sıra gerek enfekte ettikleri dokularla gerekse hayat döngüleri ile *Nosema* cinsinden bariz olarak farklar taşımaktadır (Undeen ve Vavra, 1997). Choi vd. (2002)’ne göre, *Pieris* cinsi üzerinde doğal olarak

enfeksiyona neden olan beş farklı mikrospor türü kaydedilmiştir. Yapılan bu tez çalışması ile birlikte büyük lahana kelebeği üzerinde tespit edilen mikrospor patojeninin bahsi geçen mikrospor türleri ile karşılaştırıldığında bariz farklılara sahip olduğu aşikardır. Günümüze kadar *Pieris* cinsinde doğal enfeksiyon oluşturan mikrospor türleri Tablo 3’de listelendi. Tablo 3’de görüldüğü gibi *Pieris* cinsinde kaydedilen mikrospor türlerinden biri olan *Microsporidium (Thelohania) mesnili*’nin spor boyutu 2,5-3,5 x 1,5-2 µm, *Pleistophora schubergi aporiae* 2 x 1,5 µm, *Thelohania* sp. 5,6-6,8 x 3,1-3,8 µm, (Serbest spor) 3,8 x 1,8 µm, *Vairimorpha* sp (Oktosporlar) 3,1 x 1,9 µm, (Makrosporlar) 8,0 x 2,1 µm, *Nosema (Perezia) mesnili* 3-4 x 1,5-2 µm ve bizim izolatomuz (Bu çalışma) 4,21 (3,13 – 5,47) × 1,91 (1,31 – 2,45) µm olarak kaydedildi. Bu türlerin enfekte ettikleri *Pieris* türlerine bakıldığında ise *Microsporidium (Thelohania) mesnili*; *P. brassicae*, *Pleistophora schubergi aporiae*; *P. brassicae* *P. rapae*, *Thelohania* sp.; *P. rapae*, *Vairimorpha* sp.; *P. rapae*, *Nosema (Perezia) mesnili*; *P. brassicae* görülmektedir.

Tablo 3’de görüldüğü gibi bu çalışmada tespit edilen mikrospor türü belirgin şekilde büyük lahana kelebeğinde tespit edilen diğer mikrosporidium türlerinden spor morfolojisi olarak farklılık göstermektedir. Spor büyüklüğü açısından bu çalışmada tespit edilen mikrospor türü *Thelohania* sp. ve *Vairimorpha* sp.’nin makrosporlarından daha küçük olup, *Nosema* cinsine ait olan *Nosema mesnili*’den bariz şekilde büyüktür.

Tablo 3. *Pieris* Cinsinde Kaydedilen Mikrospor Türleri

| Mikrospor Türü | Spor Ölçüsü | Konak | Referans |
|--|---|--|-----------------------------|
| <i>Microsporidium (Thelohania) mesnili</i> | 2,5-3,5 x 1,5-2 µm | <i>P. brassicae</i> | Paillot (1924) |
| <i>Pleistophora schubergi aporiae</i> | 2 x 1,5 µm | <i>P. brassicae</i> <i>P. rapae</i> | Veber (1956) Issi (1969) |
| <i>Thelohania sp.</i> | 5,6-6,8 x 3,1-3,8 µm 3,8 x 1,8 µm (Serbest spor) | <i>P. rapae</i> | Laigo ve Paschke (1966) |
| <i>Vairimorpha sp</i> | 3,1 x 1,9 µm (Oktosporlar) 8,0 x 2,1 µm (Makrosporlar) | <i>P. rapae</i> | Malone ve Mecivor (1996) |
| <i>Nosema (Perezia) mesnili</i> | 3-4 x 1,5-2 µm | <i>P. brassicae</i> | Paillot (1918) |
| <i>Nosema sp.</i> (Bu Çalışma) | 4,21 (3,13 – 5,47) × 1,91 (1,31 – 2,45) µm | <i>P. brassicae</i> | Bu Çalışma (2012) |

Paillot (1918) tarafından *Nosema mesnili* sporları üzerinde ışık mikroskopu ile yapılan tanımlama ve karakterizasyon işlemleri elektron mikroskopisinin gelişimi ile yeterliliğini kaybetmiştir. Daha önce spor morfolojisini esas alan ve ultrastrüktürel detayları açıklanmamış mikrosporidium tanımlamaları çoğu zaman yeni tür açısından gereksiz bir çalışma olarak sonuçlanmıştır (Malone ve Mcivor, 1995). Günümüzde mikrosporların sınıflandırılmasında; spor şekli, spor duvarı kalınlığı, polar filament sayısı, polar filament çapı, polaroplast şekli, spor büyüklüğü ve hayat döngüsü gibi farklı sistematik karakterler önem arz etmektedir (Larsson, 1986). Bu sistematik karakterler doğrultusunda, tez konusu olarak üzerinde çalışılan mikrospor patojeninden elde edilen sonuçlar ve *Nosema mesnili*'nin bazı karakteristik özellikleri Tablo 4' de özetlenmiştir.

Tablo 4. Tespit edilen *Nosema* sp. (Bu çalışmada) ve *Nosema mesnili*'nin ultrastrüktürel karakterlerinin karşılaştırılması

| | <i>Nosema mesnili</i> (Paillot 1918) | <i>Nosema</i> sp. (Bu Çalışmada 2012) | |
|-----------------------------|---|---|---------------|
| Enfekte Organlar | Malpigi tüpleri, İpek bezi, Yağ dokusu, Kan hücresi | Bağırsak | |
| Spor Şekli | Dikdörtgen veya Oval | Oval | |
| Spor Boyutu | 3-4 × 1,5 - 2 µm | 4,21 (3,13 – 5,47) × 1,91 (1,31 – 2,45) µm | |
| Ultrastrüktürel Karakterler | Spor duvarı kalınlığı | 107 – 138 nm | 100 - 125 nm |
| | Polar filament | 11 | 6 |
| | Polar filament Çapı | 54 – 69 nm | 57 - 71 nm |
| | Polaroplast | Lamellar - Vesiküler | Lamellar |
| | Çekirdek | Diplokaryotik | Diplokaryotik |

Nosema mesnili sporları üzerinde ilk ultrastrüktürel çalışma ise 1995 yılında Cheung ve Wang tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre *N. mesnili* sporları böceğin Malpigi tüplerini, ipek bezlerini, bağırsak, kan hücreleri ve yağ dokusunu enfekte ederken, spor ölçüleri 3 - 4 x 1,5 - 2 µm ve polar filament sayısı 11 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında bahsi geçen mikrospor patojeninin ultrastrüktürel özelliklerine bakıldığında

ise; bu patojenin spor ölçüleri $4,21 \pm 0,50$ ($3,13 - 5,47$; $n = 50$) x $1,91 \pm 0,24$ ($1,31 - 2,45$; $n = 50$) μm ve polar filament sayısı 6 olarak kaydedildi. *Nosema mesnili*'de polaroplast şekli lamellar veya vesiküler şekillerde olabilirken bu çalışmadaki mikrospor patojeninde sadece lamellar tipte polaroplast kaydedildi. Ultrastrüktürel yapıların yanında spor şekli ve spor boyutu mikrosporların sınıflandırılmasında büyük önem taşımaktadır (Larsson, 1986). *Nosema mesnili* ve tez konusu olan mikrospor patojenini bu kritere göre değerlendirdiğimizde; *N. mesnili* sporları dikdörtgenimsi ya da oval ve spor boyutu $3-4 \times 1,5 - 2 \mu\text{m}$ iken, tespit edilen mikrospor patojeninin spor şekli oval ve spor boyutu $4,21 \pm 0,50$ ($3,13 - 5,47$; $n = 50$) x $1,91 \pm 0,24$ ($1,31 - 2,45$; $n = 50$) μm 'dir. Mikrosporların sınıflandırılmasında bu kriterlerin dışında enfekte edilen doku ve üzerinde enfeksiyon gerçekleştirilen konak türü de mikrosporların sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Sprague vd., 1982). *P. brassicae* üzerinde doğal olarak enfeksiyon oluşturan *N. mesnili*; böceğin Malpigi tüpleri, ipek bezleri, kan hücreleri ve yağ dokusunu enfekte ederken; tez konusu olan mikrospor bu böceğin yalnızca bağırsak dokusunu enfekte etmektedir. Mikrosporları sınıflandırmada kullanılan önemli bir taksonomik karakter de polar filament çapı ve spor duvarı kalınlığıdır (Larsson, 1986). Bu karakterler üzerinden yapılan incelemede söz konusu mikrospor patojeninin polar filament çapı $57 - 71 \text{ nm}$ arasında değişirken, spor duvarı kalınlığı $100 - 125 \text{ nm}$ 'dir. *Nosema mesnili*'nin resimden yapılan ölçümlerinde ise polar filament çapı $54 - 69 \text{ nm}$, spor duvarı kalınlığı ise $107 - 138 \text{ nm}$ 'dir.

Ultrastrüktürel çalışmaların yanı sıra bu patojenin tanımlanmasında moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sırası ile DNA izolasyonu, rDNA amplifikasyonu ve baz dizin analizleri olarak gruplandırılabilir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen rDNA'nın ssrRNA genine ait kısmi baz dizisi büyüklüğü 1167 bp olarak tespit edildi. *Pieris* türlerinde tespit edilen *Nosema* cinsine ait diğer mikrospor patojenlerine ait baz dizisi büyüklükleri ise; *Nosema* sp. C01 3779 bp , *Nosema* sp. 1205 bp , *Nosema* sp. 1080 bp ve *Nosema* sp. 3750 bp olarak belirlenmiştir (Choi vd., 2002, 2004; Wang vd., 2001; Xu vd., 2010).

Mikrosporları tür düzeyinde birbirleri ile karşılaştırmada ssrRNA geninin V4 bölgesindeki nükleotid dizilerinin kıyaslanması yaygın şekilde kabul gören bir taksonomik parametredir (Malone vd., 1994). Eubakteriler gibi mikrosporlar dışındaki diğer organizma guruplarında ssrRNA genindeki nükleotid dizileri türden türe bir veya iki nükleotidlik farklar gösterirken, mikrosporlarda büyük farklar göstermektedir (Dams vd., 1988; Barry

vd., 1990). Mikrospor türleri arasındaki ssrRNA geni açısından bu büyük farklılığın nedeni ise çok sayıda hayvan türü üzerinde zorunlu parazit olarak evrimleşmelerinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir (Vossbrinck vd., 1987).

Moleküler teknikler kullanılarak yapılan son çalışmalarda elde edilen baz dizilimlerindeki % G+C içeriği mikrosporları cins düzeyinde birbirinden ayırmada kullanılmaktadır. Örneğin 2010 yılında yapılan bir çalışmaya göre; *Nosema* türlerinde ssrRNA genindeki G+C içeriği % 33,93 – 38,73 iken, bu oran *Endoreticulatus* türlerinde % 50,96 – 51,12'dir (Dong vd., 2010). Fast PCR programı kullanılarak büyük lahana kelebeğinde tespit edilen ve tez çalışma konusu olan mikrospor da % G+C içeriği ise % 36,5 olarak tespit edildi. Belirlenen % G+C içeriği, tez konusu olan mikrosporidium türünün, gerek morfolojik gerekse hayat döngüsü gibi moleküler yönden yapılan incelemeler de *Nosema* cinsine ait olduğunu tekrardan teyit etmiştir. Bunun yanında % G+C içeriği aynı cins içerisinde bulunan mikrosporidium türleri arasında da farklılık göstermektedir. Örneğin *N. fumiferanae* % 34,55, *Nosema* sp. CPP % 34,6, *Nosema* sp. CO % 34,68, *N. disstriae* % 34,17 ve *Nosema thomsoni*'de % 36,79 olarak belirlenmiştir (Kyeı-Poku vd., 2008).

Bu çalışmada büyük lahana kelebeğinde tespit edilen mikrospor patojeninin baz diziliminin yanı sıra, çoğu Lepidoptera takımında doğal enfeksiyona neden olan mikrospor türleri ve biri analizlerde dış grup olacak şekilde toplamda 38 farklı veri kullanıldı. MEGA 5.0 programı kullanılarak bu verilerle MaksimumLikelihood ağaç topolojisi elde edildi. MaksimumLikelihood ağaç topolojisi oluşturulurken Kimura-2 modeli uygulandı ve dış grup olarak *Trypanosoma brucei* türü kullanıldı. MEGA 5.0 programı yardımıyla yapılan MaksimumLikelihood analizi sonucuna bakıldığında analizi yapılan verilerin tümünün 2 ana grup altında toplandığı görülmektedir. Analiz sonucuna göre tez konusu olan mikrosporidium türü, Pieridae familyasında enfeksiyon oluşturan diğer mikrosporidium türlerinden ayrılarak Tortricidae familyasında enfeksiyon oluşturan *Nosema thomsoni*'ye %91'lik bootstrap değeri ile yakın bağlanmıştır. Ayrıca analizi gerçekleştirilen 38 türün 5'i Pieridae familyasında enfeksiyon oluşturmaya rağmen her biri, farklı familyalarda enfeksiyon oluşturan mikrosporidium türleri ile gruplar meydana getirmiştir.

Tez konusu olan mikrosporidiumdan elde edilen 1167 bp'lik baz dizisi en yakın tür olan *Nosema thomsoni*'nin baz dizisinden 6 baz farklıdır. Bu bazların 3'ü delesyon diğer 3'ü ise baz substitisyonu olarak belirlendi. Kimura-2 modeline göre yapılan Pairwise distance analizine göre ise tez konusu olan mikrosporidium ve *Nosema thomsoni*

arasındaki baz farklılığı ise % 0,2 olarak tespit edildi. Baz farklılığı açısından % 44,4 gibi bir oranla *Pleistophora typicalis* tez konusu olan mikrosporidium türüne en uzak türdür.

Moleküler analizler sonucunda tez konusu olan mikrosporidiuma en yakın tür olan *Nosema thomsoni*; *Populus tremuloides* (titrek kavak) üzerinde zarar meydana getiren ve Amerika kıtasına özgü olan büyük kavak yaprak bükeni (*Choristoneura conflictana*; Lepidoptera: Tortricidae) üzerinde doğal olarak enfeksiyon oluşturmaktadır (Wilson ve Burke, 1971). Tez konusu olan mikrosporidium ise büyük lahana kelebeği (*Pieris brassicae* L., Lepidoptera: Pieridae)'nde belirlendi. Böcekleri enfekte eden mikrosporidium türlerinin sınıflandırılmasında enfekte edilen konak türü ilk ve başlıbaşına yeterli bir taksonomik karakter olarak kullanılmaktadır (Sprague vd., 1992). Moleküler açıdan *Nosema thomsoni* ve tez konusu olan mikrosporidium türü birbirine yakınlık gösterebilir enfekte edilen konak türlerinin farklılığından dolayı tamamen birbirinden farklı türlerdir.

Sonuç olarak; ışık, elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalardan elde edilen tüm veriler, bu tez çalışmasında tanımlanan mikrosporidium patojeninin yeni bir tür olduğunu göstermektedir. *Nosema* cinsine dahil olan bu yeni protistin ismi konağına atfedilerek isimlendirilmiştir.

Nosema pieriae sp. n.

Sporlar: Oval, $4,21 (3,13 - 5,47) \times 1,91 (1,31 - 2,45) \mu\text{m}$, 6 polar filament, lamellar tip polaroplast.

Enfekte doku: Bağırsak

Konak: *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)

Lokalite: Beşikdüzü (Trabzon), Türkiye.

Enfeksiyon oranı: İncelenen 30 larvadan 2'sinde bu patojen tespit edildi. Enfeksiyon oranı % 6,6.

Tip örnek: Işık ve elektron mikroskopisi için numuneler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümünde Zooloji-II laboratuvarında (MÇPB-01) muhafaza edilmektedir.

Etimoloji: Bu yeni protistin ismi konağına atfedilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans tezi süresince elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. Lepidoptera takımına ait olan büyük lahana kelebeği (*Pieris brassicae* Lep: Peiridae) ile biyolojik mücadelede kullanılmak üzere doğal hastalık etmeni mikrospor patojeninin varlığı araştırılmış ve 2011 yılının Haziran – Temmuz ayları arasında toplanan larvalarda bir mikrosporidium patojenine rastlanmıştır.
2. Büyük lahana kelebeğinde tespit edilen mikrosporun morfolojik ve ultrastrüktürel özellikleri, ışık mikroskobu, Giemsa boyama ve elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları ile belirlenmiş ve bu patojenin *Nosema* cinsine ait yeni bir tür olduğu saptanmıştır.
3. Tespit edilen mikrospor sporları üzerinde yapılan moleküler çalışmalarla bu patojenin *Nosema* cinsine ait yeni bir tür olduğu teyit edilmiştir.
4. Giemsa boyama yöntemi ve elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda elde edilen hayat döngüsü safhaları ve ultrastrüktürel yapı bulguları ve moleküler çalışmalar *Pieris* cinsinde tespit edilen bu mikrospor patojeninin diğer *Nosema* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışması büyük lahana kelebeğinde (*P. brassicae*) tespit edilen mikrospor patojeninin dünya ve Türkiye için ilk kayıdır.
5. Arazi çalışmalarından elde edilen larvaların diseksiyonu sonucunda % 6,66'a varan mikrospor enfeksiyon oranı belirlenmiştir.
6. Mikrospor patojeninin konak spesifitesinin yüksek olması, doğal hastalık oluşturup çevreye ve diğer canlılara zarar vermeden, ekolojik dengeyi koruyarak yalnızca hedef zararlı popülasyon yoğunluğunu azaltması, biyolojik mücadelede bu patojenlerin tercih edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışması ile Türkiye ve dünya için ilk kez büyük lahana kelebeği (*Pieris brassicae* L.)'nde doğal hastalık oluşturan yeni bir mikrosporidium patojeni tespit edilmekte, karakterizasyonu ve varlığı açıklanmaktadır.

6. ÖNERİLER

Alan zararlılarıyla mücadelede ülkemizde tamamen kimyasal ilaçlarla yapılmaktadır. Kimyasalların hedef zararlı dışında, çevreye, doğadaki diğer yararlı canlılara ve insan sağlığına olumsuz yöndeki etkileri endişe verici bir durumdur. İstenmeyen bu etkileri ortadan kaldırmak ya da minimum seviyeye indirmek için alternatif mücadele yöntemleri geliştirilmektedir. Çevreye duyarlı, yalnızca kontrol altına alınması ve etkisinin azaltılması gereken zararlıya etki eden ve kalıntı sorunu gibi olumsuzluklar barındırmayan biyolojik mücadele yöntemi, tercih edilmesi gereken yöntemlerin başında gelir. Bu yüksek lisans tez çalışmaları sırasında tespit edilen *Nosema* cinsine ait bu patojeni, ülkemiz ve çeşitli dünya ülkeleri için önemli bir besin kaynağı olan lahana (*Brassicaceae*) türü bitkilerinde çok ciddi zararlara neden olan büyük lahana kelebeği (*P. brassicae*) ile mücadele de kimyasal mücadeleye alternatif olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla bu mikrosporidium patojeninin kitle üretimi yapıp patojenite testlerinden geçirildikten sonra tarımsal üretimle uğraşan gerek çiftçilere gerekse tüzel kişilere ticari şekilde sunulabilir. Söz konusu patojenin kullanılmasıyla zararlı ile biyolojik mücadele gerçekleştirilmiş ve aynı zamanda kimyasal ilaçların çevreye ve canlılara verdiği zararlı etkilerin de önüne geçilmiş olacaktır. Dar bir alanda sürdürülen arazi çalışmaları ile gerçekleşen bu tez çalışmasının kapsamı geliştirilerek tüm Karadeniz Bölgesi'nde ve hatta Türkiye'de lahana yetiştiriciliği yapılan bölgelerdeki zarar yapan böceklerde patojen varlığı araştırılabilir. Patojenin larva gelişimine, beslenmeye ve yumurta bırakma gibi faaliyetlerine etkisi araştırılmalıdır. Zararlının larva ve ergin formlarına bioassay deneyleri yapılarak söz konusu mikrospor patojeninin patojenitesi ve konak üzerinde meydana getirdiği semptomlar tespit edilmelidir. Ayrıca bu patojenin vertikal ve horizontal bulaşma potansiyelleri de araştırılabilir. Aynı zamanda bu patojenin başta Pieridae familyası olmak üzere diğer Lepidoptera takımına ait familya ve türlerde enfeksiyon gerçekleştirip gerçekleştirmediği de çalışılabilir konular arasındadır. Bu tez çalışmasının ülkemiz için ilk kayıt olması, bu alanda yapılacak olan diğer çalışmalara kaynak olacaktır. Bu çalışma aracılığı ile sunulan bilgiler kullanılarak diğer tarımsal zararlılarla mücadelede yeni patojenik ajanların tespiti mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Akdağcık, Z., 2010. Çukurova Bölgesi Cruciferae Üretim Alanlarında Zararlı Olan Lepidopter Türlerin Populasyon Gelişmeleri, Predatör ve Parazitoitlerinin Belirlenmesi ve *Pieris brassicae* (L.)'nin Bazı Biyolojik Özellikleri ile Mücadelesi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Ali, A. ve Rizvi, P., Q., 2007. Developmental Response of Cabbage Butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) on Different Cole Crops Under Laboratory and Field Condition, Asian Journal of Plant Sciences 6, 1241-1245.
- Atalay, R. ve Hıncal, P., 1992. Investigations on the Species of Pieridae (Lepidoptera) Which are Harmful to Plants Belonging to the Family Cruciferae with Their Importance in Izmir and Its Vicinity and the Biology of the Large White Butterfly (*Pieris brassicae* (L.)) Along with the Factors Affecting Its Population Fluctuations, Doga Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 16, 271-286.
- Avcı, Ü. ve Özbek, H., Erzurum'da Lahana Zararlısı Lepidopter Türleri ve Parazitoidleri Üzerinde Bir Araştırma, Türkiye II. Biyolojik Mücadele Kongresi, Eylül 1990, Ankara, Bildiriler Kitabı: 319-330.
- Avery, S., W. ve Anthony D., W., 1983. Ultrastructural study of *Nosema algerae* in *Anopheles bimanus*. J. Invert. Pathol., 42, 335-343.
- Baker, M., D., Vossbrinck, C., R., Didier, E., S., Maddox, J. ve V., Shaddock, J., A., 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. J. Eukaryot. Microbiol., 42, 564-570.
- Barry, T., Powell, R. ve Gannon, F. 1990. A general method to generate DNA probes from micro-organisms. Bio/Technology, 8, 233-236.
- Canning, E., U. ve Vavra, J., 2000. Phylum microsporida. In: Lee, J., Leedale, G.F., Bradbury, P. (Eds.), The Illustrated Guide to the Protozoa. Allen Press Inc., Lawrence, 39-126.
- Cheung, W., W., K. ve Wang, J., B., 1995. Electron microscopic studies on *Nosema mesnili* Paillot (Microsporidia: Nosematidae) infecting the Malpighian tubules of *Pieris canidia* larva. Protoplasma., 186, 142-148.
- Choi, J., Y., Kim J., G., Choi Y., C., Goo T., W., Chang J., H., Je Y., H. and Kim K., Y., 2002. *Nosema* sp. isolated from Cabbage White Butterfly (*Pieris rapae*) Collected in Korea. The Journal of Microbiology, 40, 199-204.

- Dams, E., Hendriks, L., Van de Peer, Y., Neefs, J-M., Smits, G., Vandenbempt, I. ve De Wachter, R., 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Res., 16, 87–173.
- Dong, S., N., Shen Z., Y., Xu L. ve Zhu F., 2010. Sequence and Phylogenetic Analysis of SSU rRNA Gene of Five Microsporidia. Curr Microbiol., 60, 30–37.
- Ecevit, O., Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayinlari, Samsun, 1988.
- Feltwell, 1978. The Depredations of the Large White Butterfly (*Pieris brassicae*) (Pieridae), Journal of Research on the Lepidoptera, 17, 218-225.
- Hazard, E., I., Fukuda, T. ve Becnel, J., J., 1985. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora, J. Invertebr. Pathol., 46, 63-69.
- 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.
- Hekimoğlu, B. ve Altındeğer, M., 2010. Samsun İlinde Sebze Üretim Sektörü, T.C. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü, Samsun.
- Higes, M., Martin, R. ve Meana, A., 2006. Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology, 92, 93–95.
- Hylis, M., Weiser, J., Oborník, M. ve Vávra, J., J., 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. Journal of Invertebrate Pathology, 88, 257–260.
- Issi, I., V., 1969. On possible ways of speciation among Microsporidia. Prog. Protozool. Proc. Int. Congr. Protozool., 3, 337-378.
- 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.
- Kyei-Poku, G., Gauthier D. ve Frankenhuyzen K., V., 2008. Molecular Data and Phylogeny of Nosema Infecting Lepidopteran Forest Defoliators in the Genera Choristoneura and Malacosoma. J. Eukaryot. Microbiol., 55, 51–58.
- Laigo, F., M. ve Paschke, J., D., 1966. A microsporidian, *Thelohania* sp., in *Pieris rapae*. J. Invertebr. Pathol., 8, 269-270.
- Larsson, J., I., R., 1986. Ultrastructure, function, and classification of microsporidia. Progress in Protistology, 1, 325-390.
- Larsson, J., I., R., 1988. Identification of microsporidian genera (Protozoa, Microspora) a guide with comments on the taxonomy. Arch. Protistenkd., 136, 1-37.

- Larsson, J., I., R., 1999. Identification of microsporidia. Acta Protozool., 38, 161-197.
- Lipa, J., 1968. *Nosema leptinotarsae* sp.n., a microsporidian parasite of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Journal of Invertebrate Pathology, 10, 111-115.
- Malone, L., A. ve Mcivor, C., A., 1996. Use of Nucleotide Sequence Data to Identify a Microsporidian Pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). Journal of Invertebrate Pathology, 68, 231–238.
- Malone, L., A., Broadwell A., H., Lindridge, E., T., McIvor, C., A. ve Ninham, J., A., 1994. Ribosomal RNA genes of two microsporidia, *Nosema apis* and *Vavraia oncoperae*, are very variable. J. Invertebr. Pathol., 64, 151-152.
- Özcan, N., *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae)'nın Bir Mikrosporidium Patojeninin Karakterizasyonu ve Varlığı, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2010.
- Paillot, A., 1924b. Sur *Thelohania mesnili*, microsporidie nouvelle parasite de *Pieris brassicae* L. C. R. Soc. Biol., 90, 501–503.
- Paillot, A., 1918a. Deux Microsporidies Nouvelles Parasites Des Chenilles De *Pieris Brassicae*. C. R. Soc. Biol., 81, 66–68.
- Radek, R. ve Fabel, P., 2000. A New Entomopoxvirus from a Cockroach: Light and Electron Microscopy, Journal of Invertebrate Pathology, 75, 19-27.
- Razmi, M., Karimpour, Y., Safaralizadeh, M.,H. ve Safavi, S.,A., 2011. Parasitoid Complex of Cabbage Large White Butterfly *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera, Pieridae) in Urmia with New Records from Iran, Journal of Plant Protection Research Vol. 51, No: 3.
- Sato R., Kobayashi, M. ve Watanabe, H., 1982. Internal ultrastructure of spores of microsporidians isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invert. Pathol., 40, 260-265.
- Sönmez, F., 2005. Kültür Bitkilerinde Zarar Yapan Hastalık ve Zararlıların Tanınması ve Mücadelesi, T.C. Samsun Valiliği Tarım İl Müdürlüğü, Samsun.
- Sprague, V., Becnel, J., J. ve Hazard, E., I., 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol., 18, 285-395.

- Sprague, V., 1982. Microspora, in: S.P. Parker(Eds.), Synopsis and classification of living organism, vol. 1. McGraw Hill Book Co., New York, N.Y. pp.589-594.
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2010. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Lahanagiller Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele, Ankara.
- T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, 2008. Bahçecilik Lahana Yetiştiriciliği, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi (MEGEP), Ankara.
- T.Ü.İ.K., 2009. Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara.
- Tanada, Y., 1953. A microsporidian parasite of the imported cabbage worm in Hawaii. Proc. Hawaii. Entomol. Soc., 15, 167-175.
- Toguebaye B., S. ve Bouix G., 1989. *Nosema galerucellae* sp.n., microsporidian (Protozoa, Microspora), parasite of *Galerucella luteola* Müller (Chrysomelidae, Coleoptera): Development cycle and ultrastructure. Europ. J. Protistol., 24, 346-353.
- Toguebaye B., S. ve Marchand B., 1986. Etude d'une infection microsporidienne due a *Nosema birgii* n.sp. (Microsporida, Nosematidae) chez *Mesoplatys cincta* Olivier, 1790 (Coleoptera, Chrysomelidae). Z. Parasitenkd., 72, 723-737.
- Toguebaye, B., S., Marchand, B. ve Bouix, G., 1988. Microsporidia of *Chrysomelidae*, in: Petitpierre E., Hsiao T.H., Jolivet P.H. (eds), Biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 399-416.
- Tosun, O., Yaman, M. ve Aydın, Ç., 2008. Parasites of *Phyllotreta atra* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae) in Trabzon. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32,153 15.
- Tozlu, G., Gültekin, L., Hayat, R. ve Güçlü, Ş., 2002. Erzurum'da lahanada zarar yapan böcek türlerinin d o ğ a l düşmanları üzerinde çalışmalar, Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi, Erzurum.
- Undeen, A. ve Vavra, J., 1997. Research Methods for Entomopathogenic Protozoa. Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, San Diego, 117-151.
- URL-1,<http://www.paylasimmerkezi.com/ziraat/29012-kara-lahana-yetistiriciligi-kirmizi-lahana-yetistiriciligi-lahana-nasil-yetisir.html>. 20 Ekim 2011.
- URL-2, <http://www.itsnature.org/air/creepy-crawlies-air/cabbage-butterfly/>. 30 Ekim 2011.
- URL-3, <http://www.flickr.com/photos/pipsissiwa/sets/72157607002380673/>. 24 Aralık 2011.
- URL-4, <http://web.ttnet.com.tr/bornovazme/sebzecar.html>LAHANA%20KELEBEGI. 15 Ekim 2011.

- URL-4, <http://www.itsnature.org/air/creepy-crawlies-air/cabbage-butterfly/>. 24 Aralık 2011.
- URL-5, <http://apps.rhs.org.uk/advicesearch/profile.aspx?pid=457>. 10 Aralık 2011.
- Vávra, J., 1976a. 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., 1976b. 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.
- Veber, J., 1956. *Plistophora aporiae* n. sp., ein parasit des Baumweisslinges *Aporia crataegi*. Cesk. Parasitol., 3, 181-185.
- Vossbrinck, C., R., Maddox, J., V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B., A., ve Woese, C., R. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature ., 326, 411–414.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 440 s.
- Wang, J., Y., Huang, K., W., Mao, X., C., Zhao, Y. ve Lu, C., D. 2001. Small Subunit Ribosomal RNA Genes of Microsporidia. Sheng wu hua hsueh yu sheng wu wu li hsueh pao., 33, 229-232.
- Wilson, G., G. ve Burke J., M., 1971. *Nosema thomsoni* n. sp., a microsporidian from *Choristoneura conflictana* (Lepidoptera: Tortricidae). Canadian Journal of Zoology, 49, 786-788.
- Xu, X., F., Shen, Z.,Y., Zhu, F., Tao, H., P., Tang, X.,D. ve Xu, L., 2010. Uncultured *Nosema* clone MPr small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Pathology Department, Sericulture Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
- Yaman, M. ve Demirbag, Z., 2000. Studies of Bacteria as Potential Microbial Control Agents of the Large White Butterfly, *Pieris brassicae* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pieridae), African Entomology, 8, 145-149.
- Yaman, M. ve Radek, R., 2003. *Nosema chaetocnema* Sp. n. (Microspora: Nosematidae), a Microsporidian Parasite of *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae), Acta Protozool., 42, 231 – 237.
- Yaman, M. ve Radek, R., 2005a. New Microsporidian Parasite Record of *Phyllotreta undulata* (Chrysomelidae, Coleoptera). Turkish Journal Zoology, 29, 67–69.

- Yaman, M., Özcan N., Radek R., Linde A. ve Lipa J., J., 2011. Ultrastructure, Characteristic Features and Occurrence of *Nosema leptinotarsae* Lipa, 1968, a Microsporidian Pathogen of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). Acta Parasitologica, 56, 1–7.
- Yaman, M., Radek R.ve Toguebaye, B., 2008. A new microsporidian of the genus *Nosema*, parasite of *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae) from Turkey. Acta Protozoologica, 47, 279-285.
- Yaman, M., Radek, R., Aslan, I. ve Ertürk Ö., 2005b. Characteristic Features of *Nosema phyllotretae* Weiser 1961, A Microsporidian Parasite of *Phyllotreta atra* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Turkey. Zoological Studies, 44, 368-372.
- Yaman, M., Radek, R., Aydın, Ç., Tosun, O. ve Ertürk, Ö., 2009b. First Record of The Insect Pathogenic Alga *Helicosporidium* sp. (Chlorophyta: Trebouxiophyceae) Infection in Larvae and Pupae of *Rhizophagus grandis* Gyll. (Coleoptera, Rhizophaginae) from Turkey. Journal of Invertebrate Pathology, 102, 182–184.
- Yaman, M., Radek, R., Tosun, O. ve Ünal S., 2009a. *Nosema raphidia* sp.n. (Microsporida, Nosematidae): A Microsporidian Pathogen of the Predatory Snake-fly *Raphidia ophiopsis* (Raphidioptera: Raphidiidae). Acta Protozool., 48, 353–358.
- Yaman, M.ve Radek R., 2008. Pathogens and Parasites of Adults of The Great Spruce Bark Beetle, *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) from Turkey. J Pest Sci., 81, 91–97.

8. EKLER

Ek 1. Tez Konusu Mikrosporidium Türünün rDNA'sına ait Kısmi Baz Sırası

AGATACCCATGCATGTTTTTGACATTTGAAAAATGGACTGCTCAGTAATACT
CACTTTATTTTATGTACATTTGAAATTAACCTACGTTAAAGTGTAGATAAGAT
GTGTACAGTAAGAGTGAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGCTTAAC
AAGGCAGTGACGGGTAACGGTATTACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCCT
GAGAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACTTGACCTAT
GGATTTTATCTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATTATATTGTTTCATATTTT
AAAAGTATATGAGGTGATTAATTGGAGGGCAAATCAAGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACTTGTTCCAAGAGTGTGTATGATGATTGATGCAGTTAAAAAGTCCG
TAGTTTATTTTTAAGAAGCAATTTGAGGTGTACTGTATAGTTGGGAGAGAGA
TGAAATGTGACGACCCTGACTGGACGAACAGAAGCGAAAGCTGTACACTTGT
ATGTATTTTTTTGAACAAGGACGTAAGCTGGAGGAGCGAAGATGATTAGATAC
CATTGTAGTTCCAGCAGTAACTATGCCGACGATGTGATATGAAGTTATTTG
TATTACATAATAGAAATTAGAGTTTTTTGGCTCTGGGGATAGTATGATCGCA
AGATTGAAAATTAAGAAATTGACGGAAGAATACCACAAGGAGTGGATTGTG
CGGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGTAACCTTACCAATATTTTATTATTTTGA
GAGGATTTTTAATCTGAGAATGATAATAGTGGTGCATGGCCGTTTTCAATGG
ATGCTGTGAAGTTTTGATTAATTTCAACAAGACGTGAGACCCTTTTATATAG
ACAGACACAATCAGTGTAGGAAGGAAAGGATTA AACAGGTCCGTTATGCC
TCAGACATTTTGGGCTGCACGCGCAATACAATAGATATATGATCTTTATGGG
ATAATATTTTGTAAAGAGATATTTGAACTTGGAATTGCTAGTAAATTTTATTA
AATAAGTAGAATTGAATGTGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTA
TCTAAGATGATATATGTTGTGAAATTAGTGAAAACCTACTTGAACAATATGTA
TAGATCTGATATAAGTCGTAACA

Ek 2. rDNA'ya Göre Analizlerde Kullanılan Örneklerin Baz Farklılıkları

| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| AY009115 Endoreticulatus bombycis | | | | | | | | | | |
| AY502944 Endoreticulatus sp. CHW-2004 Taiwan | 0,002 | | | | | | | | | |
| L39109 Endoreticulatus schubergi | 0,001 | 0,001 | | | | | | | | |
| EU219086 Nosema thomsoni | 0,404 | 0,404 | 0,402 | | | | | | | |
| U27359 Nosema oulemae | 0,403 | 0,403 | 0,401 | 0,012 | | | | | | |
| AY259631 Nosema bombycis | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | | | | | |
| AY747307 Nosema spodopterae | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | | | | |
| AJ252955 Pleistophora ovariae | 0,347 | 0,347 | 0,345 | 0,442 | 0,446 | 0,457 | 0,457 | | | |
| AJ252956 Pleistophora typicalis | 0,344 | 0,344 | 0,342 | 0,441 | 0,444 | 0,449 | 0,449 | 0,053 | | |
| AF426104 Nosema carpocapsae | 0,408 | 0,408 | 0,406 | 0,010 | 0,007 | 0,153 | 0,153 | 0,446 | 0,446 | |
| AY383655 Nosema sp. C01 | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | 0,000 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| DQ073396 Nosema antheraeae | 0,456 | 0,456 | 0,454 | 0,151 | 0,155 | 0,005 | 0,005 | 0,464 | 0,456 | 0 |
| DQ486027 Nosema ceranae | 0,410 | 0,410 | 0,407 | 0,015 | 0,017 | 0,156 | 0,156 | 0,449 | 0,455 | 0 |
| AF240354 Nosema sp. | 0,461 | 0,461 | 0,458 | 0,154 | 0,159 | 0,006 | 0,006 | 0,464 | 0,456 | 0 |
| D85502 Vairimorpha sp. NIS-M12 | 0,414 | 0,414 | 0,412 | 0,016 | 0,015 | 0,154 | 0,154 | 0,446 | 0,446 | 0 |
| D85501 Nosema sp. NIS-M11 | 0,404 | 0,404 | 0,401 | 0,014 | 0,009 | 0,150 | 0,150 | 0,444 | 0,444 | 0 |
| AF033315 Vairimorpha lymantriae | 0,404 | 0,404 | 0,402 | 0,010 | 0,012 | 0,151 | 0,151 | 0,446 | 0,446 | 0 |
| AF033316 Nosema portugal | 0,404 | 0,404 | 0,402 | 0,010 | 0,012 | 0,151 | 0,151 | 0,446 | 0,446 | 0 |
| D85500 Pleistophora sp. Sd-Nu-IW8201 | 0,004 | 0,004 | 0,002 | 0,400 | 0,399 | 0,447 | 0,447 | 0,341 | 0,338 | 0 |
| Y00266 Vairimorpha necatrix | 0,411 | 0,411 | 0,408 | 0,015 | 0,012 | 0,154 | 0,154 | 0,446 | 0,445 | 0 |
| AY008373 Nosema bombi | 0,395 | 0,395 | 0,393 | 0,017 | 0,021 | 0,150 | 0,150 | 0,435 | 0,437 | 0 |
| AJ131645 Vairimorpha imperfecta | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | 0,000 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| AJ131646 Vairimorpha imperfecta | 0,447 | 0,447 | 0,445 | 0,147 | 0,151 | 0,001 | 0,001 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| Nosema sp. (Bu Çalışmada) | 0,404 | 0,404 | 0,402 | 0,002 | 0,015 | 0,147 | 0,147 | 0,442 | 0,444 | 0 |
| U97150 Nosema apis | 0,414 | 0,414 | 0,412 | 0,031 | 0,035 | 0,162 | 0,162 | 0,443 | 0,444 | 0 |
| D85503 Nosema bombycis | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | 0,000 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| FJ767862 Nosema philosamiae | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | 0,000 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| EU260046 Endoreticulatus sp. CHW-2008 Austria | 0,009 | 0,009 | 0,007 | 0,411 | 0,410 | 0,454 | 0,454 | 0,357 | 0,352 | 0 |
| AJ011833 Nosema granulosis | 0,456 | 0,456 | 0,453 | 0,151 | 0,154 | 0,015 | 0,015 | 0,455 | 0,454 | 0 |
| AF240350 Nosema sp. | 0,450 | 0,450 | 0,447 | 0,148 | 0,153 | 0,004 | 0,004 | 0,457 | 0,450 | 0 |
| AF240351 Nosema sp. | 0,768 | 0,768 | 0,764 | 0,497 | 0,500 | 0,402 | 0,402 | 0,819 | 0,787 | 0 |
| AY960987 Nosema plutellae | 0,447 | 0,447 | 0,445 | 0,147 | 0,151 | 0,001 | 0,001 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| AF485270 uncultured Nosema | 0,447 | 0,447 | 0,445 | 0,150 | 0,154 | 0,004 | 0,004 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| L39114 Vairimorpha sp. | 0,406 | 0,406 | 0,404 | 0,009 | 0,011 | 0,153 | 0,153 | 0,448 | 0,448 | 0 |
| U09282 Nosema trichoplusiae | 0,449 | 0,449 | 0,447 | 0,147 | 0,151 | 0,000 | 0,000 | 0,457 | 0,449 | 0 |
| AF141129 Vairimorpha lymantriae | 0,404 | 0,404 | 0,402 | 0,010 | 0,012 | 0,151 | 0,151 | 0,446 | 0,446 | 0 |
| M12676 Tryponosoma brucei | 1,001 | 1,007 | 1,001 | 1,042 | 1,028 | 1,020 | 1,020 | 1,148 | 1,142 | 1 |
| HQ399665 uncultured Nosema | 0,408 | 0,408 | 0,406 | 0,010 | 0,007 | 0,153 | 0,153 | 0,446 | 0,446 | 0 |

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Atatürk İlkokulu ve Yunus Emre Orta Okulunda tamamladı, orta öğrenimini Trabzon lisesinde tamamladı. 2005 - 2006 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2009 yılında mezun oldu. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. Ati Teknoloji A.Ş.'de; Hücre Kültürü Teknikleri, Kalite Kontrol Teknikleri Bankacılık Teknikleri ve İç Kalite Tetkik ile ilgili staj eğitimini 2008 yılında tamamlamış ve iyi derecede İngilizce bilmektedir