

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAVAK YAPRAK BÖCEĞİ (*CREPIDODERA AURATA* (MARSHAM),
COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)'NDE BİR MİKROSPORİDYUMUN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE FARKLI POPULASYONLARDAKİ
DAĞILIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Gönül ALGI

TRABZON 2015



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

Jüri Üyeleri

Başkan :



Üye :



Üye :



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Kavak Yaprak Böceği (*Crepidodera aurata* (Marsham), Coleoptera: Chrysomelidae)’nde Yeni Bir Mikrosipridyum Türünün Karakterizasyonu” adlı bu yüksek lisans tezi, gerek dünya gerekse ülkemizde Kavak ağaçlarında büyük zararlara neden olan Kavak Yaprak Böceği (*Crepidodera aurata* (Marsham))'nin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeline sahip yeni bir mikrosipridyum türünün karakterizasyonu üzerine önemli bilgiler sunmaktadır. Söz konusu bu yüksek lisans tez çalışmasının bu alanda çalışacak birçok bilim adamına bir örnek teşkil edeceğini ümit ediyorum.

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

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1120807 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince yardımlarını esirgemeyen İbrahim Emrah ÖZGÜRBÜZ'e, Beyza Gonca GÜNER'e ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen tüm dostlarıma teşekkür ederim.

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

Gönül ALGI
Trabzon 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Kavak Yaprak Böceği (*Crepidodera aurata* (Marsham), Coleoptera: Chrysomelidae)’nde Bir Mikrosipridyumun İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Farklı Populasyonlardaki Dağılımı” 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. 15 / 06 / 2015

Gönül ALGI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Crepidodera aurata</i> (Marsham) (Coleoptera: Chrysomelidae).....	6
1.2.1 Tanımı veBiyolojisi	6
1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı.....	8
1.2.3. Doğal Düşmanları ve Mücadele Yöntemleri	9
1.3. Microsporidia.....	10
1.4. Tezin Amacı.....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. Böceklerin Elde Edilmesi	15
2.2. Makroskobik Çalışmalar	15
2.3. Mikroskobik Çalışmalar.....	16
2.3.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları	16
2.3.1.1. Giemsa Boyama	17
2.3.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları.....	17
2.3.2.1. Fiksasyon, Dehidrasyon, Resine Gömme ve Boyama.....	17
3. BULGULAR.....	20
3.1. <i>Crepidodera aurata</i> 'da Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi.....	20
3.1.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskobik Görünümü	20
3.1.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskobik Olarak Belirlenmesi.....	20
3.1.1.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları ile Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi	20

3.1.1.2.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi.....	26
3.2.	<i>Crepidodera aurataa</i> 'da Mikrospor Patojeninin Varlığı.....	33
4.	TARTIŞMA.....	35
5.	SONUÇLAR.....	39
6.	ÖNERİLER.....	40
7.	KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans

ÖZET

KAVAK YAPRAK BÖCEĞİ (*CREPIDODERA AURATA* (MARSHAM),
COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)'NDE BİR MİKROSPORİDYUMUN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE FARKLI POPULASYONLARDAKİ
DAĞILIMI

Gönül ALGI

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa YAMAN
2015, 45 Sayfa,

Bu yüksek lisans tezinde; dünyada ve ülkemizde kavak ağaçlarında önemli kayıplar meydana getiren Kavak Yaprak Böceği (*Crepidodera aurata* (Marsham); Coleoptera: Chrysomelidae)'nde doğal enfeksiyona neden olan bir mikrosporidyum patojeninin karakterizasyonu ve farklı populasyonlardaki dağılımı çalışıldı. 2013 – 2014 yılları arasında 10 farklı lokaliteden toplanan *C. aurata* erginleri üzerinde ışık mikroskobu ile 40X ve 1000X'lik büyütmelemlerde incelemeler yapıldı. Spor morfolojisi bakımından farklı gözükten iki mikrosporidyum izolatu tespit edildi. Disekte edilen taze preparatlarda izolatu 1'in boyu 3.66- 5.66 µm ve eni 1.35- 2.22 µm olarak, izolatu 2'nin boyu 2.44-3.55 µm ve eni 1.25- 1.55 µm olarak ölçüldü. Enfeksiyonlar konak böceğin hemolenf, malpigi tüpleri ve bağırsak dokularında gözlendi. Elektron mikroskobisi (TEM) ile patojenin ultrastrüktürel yapısı belirlendi. Spor safhası üzerinde yapılan ultrastrüktürel incelemeler sonucunda patojenin; monokaryotik, polarfilament sayısı 8, spor duvarı kalınlığı 120-125 nm ve polar filament çapının 80-95 nm olduğu tespit edildi. Tez süresince örnekleme yapılan 10 farklı lokaliteden 7'sinde enfeksiyon tespit edildi. İncelenen 1728 böcekte enfeksiyon oranı % 4,51 olarak bulundu. Bazı populasyonlarda enfeksiyon oranının % 25'e çıktığı tespit edildi. Bu tez çalışmasında *C. aurata*'nın doğal populasyonlarında hastalık oluşturan bir mikrosporidyum patojeninin karakterizasyonu ve dağılımı dünya literatürü için ilk kez verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Crepidodera aurata* (Marsham), biyolojik kontrol, mikrosporidyum, karakterizasyon, Türkiye

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION, CHARACTERIZATION OF A MICROSPORIDIUM (Protista) FROM
POPLAR LEAF BEETLE (*Crepidodera aurata* (Marsham); Coleoptera: Chrysomelidae)
AND DIFFERENT POPULATIONS DISTRIBUTION

Gönül ALGI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Mustafa YAMAN
2015, 46 Pages,

A microsporidium species detected from Poplar leaf beetle (*Crepidodera aurata* (Marsham); Coleoptera: Chrysomelidae) which cause important damage in poplar trees in our country and worldwide was characterized in this study. The adults were studied in different 10 locality between the years 2013 – 2014. Fresh preparations were dissected and examined under the light microscope with magnifications 40x-1000x. Isolat 1 dimensions were measured as 3.66-5.66 x 1.35-2.22 μm and isolat 2 2.44-3.55 x 1.25-1.55 μm in fresh preparations dissected. Infection was observed in many tissues and organs such as glands, malpighian tubules, intestine of host and the life cycle of the microsporidian. Ultrastructural features of the pathogen were determined with electron microscopy. According to ultrastructural studies on pathogen spore; this pathogen is monocharyotic and it has 8 polar filament, 120-125 nm spore wall thickness and 80-95 nm polar filament dimension. The infection was detected in 7 out of 10 different localities which sampling during thesis. Infection rate was found to be 4,51 percent in examined 1728 insects. It was found that the rate of infection was found to be 25 percent in some populations. It is given for the first time for the literature of the world that a characterization and distribution of microsporidia pathogen which causes diseases in natural populations of *C. aurata* in this thesis.

Key Words: *Crepidodera aurata* (Marsham), biological control, microsporidium, characterization, Turkey

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>C. aurata</i> 'ya ait, larva ve ergin hayat safhaları.....	8
Şekil 2. Mikrosporların konak hücreye girişi ve çoğalma safhaları.	12
Şekil 3. <i>C. aurata</i> 'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyumun bağırsak dokusunda enfeksiyonu.	21
Şekil 4. <i>C. aurata</i> 'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyumun Malpigi tüplerindeki enfeksiyonu	22
Şekil 5. <i>C. aurata</i> 'nın Vezirköprü (Samsun) popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyuma ait spor yapıları.....	23
Şekil 6. <i>C.aurata</i> 'nın farklı lokalitelerinde gözlenen microsporidium patojenine ait sporlar.	24
Şekil 7. <i>C. aurata</i> 'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyuma ait giemsa boyalı sporları	25
Şekil 8. <i>C. aurata</i> 'da tespit edilen mikrosporidyum patojeninin spor duvarı ve polar filamentinin enine kesiti	27
Şekil 9. <i>C. aurata</i> 'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait hücresel yapı.	28
Şekil 10. <i>C. aurata</i> 'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait spor.....	29
Şekil 11. <i>C. aurata</i> 'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait sporun anteriöründeki hücresel yapı.....	30

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.	Bazı kavak zararlılarına karşı ilaçlı mücadele	5
Tablo 2.	Türkiye'de <i>Crepidodera aurata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae) populasyonlarında mikrosporidyum patojeninin varlığı.....	32
Tablo 3.	Chrysomelidae (Coleoptera) familyasında tanımlanmış <i>Microsporidyum</i> türleri.....	35

SEMBOLLER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
ml	mililitre
mm	milimetre
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
M	Molar
nm	Nanometre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
SSU	Küçük alt birim
UV	Ultra Violet

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Küresel anlamda nüfusun hızlı artışı ve ekonominin sürekli gelişmesi, doğal kaynak kullanımını ileri boyutlara taşımakta; bunun neticesinde doğal kaynaklar hızla tüketilmekte ve küresel çevre giderek bozulmaktadır. Bu bozulma, etkisini ormanlar üzerinde de yoğun şekilde göstermektedir. Dünya'daki genel durum göz önüne alındığında toplam ormanlık alan 2000 yılı itibariyle yaklaşık 3,9 milyar hektar olup, ormanlık alanın toplam kara alanına oranı % 29,6'dır. Mevcut ormanların yaklaşık % 95'i doğal ormanlardan, % 5'i ise plantasyonlardan oluşmaktadır (Anonim, 2014). Türkiye'nin toplam orman alanı 2012 verilerine göre 21 678 134 hektardır. Bu alanın Türkiye yüzölçümüne oranı %27,22'dir. Bu alanın 6.547 hektarlık kısmını kavak ormanları oluşturmaktadır (OGM, 2014).

Kavak, doğal olarak yetişen, çok sayıda melezi ve klonları bulunan, dünyada ve Türkiye'de geniş yayılım alanlarına sahip doğal ormanları ve plantasyonları ile ılıman bölgelerin kısa sürede büyüyen ağaç türlerindedir. Kavak odununun kullanım biçimi; bölgelere, kavakçılık geleneğinin varlığına ve endüstriyel gelişmişliğe bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Anadolu'da kavak yetiştiriciliğinin çok eski bir geleneği vardır. Orman varlığı yönünden çok fakir olan İç Anadolu ile Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde kavakların çok yaygın üretim alanı bulunmaktadır. Kavağın doğrudan yuvarlak odun halinde kırsal yapı malzemesi olarak kullanıldığı geleneksel yapı, toplumsal gelişmeye paralel olarak değişime uğramış; çağdaş tekniklerden yararlanarak geliştirilen endüstriyel kullanımlara doğru yönelim olmuştur (Kahraman, 2013).

Ormanların iyileştirilmesi ve hızla artan odun ham maddesi ihtiyacının karşılanması kapsamında, var olan ormanların korunması ve ağaçlandırılmasına ek olarak, doğal ormanların tahrip edilmeden, başta kavak olmak üzere hızlı gelişen ağaç türleri baz alınarak, alternatif çözüm olan endüstriyel plantasyonlara yönelmek büyük önem taşımaktadır (Zengin, 1998).

Endüstriyel plantasyonlar, muhtemel odun arzı açığını karşılamak fikrinden doğmuşlardır. Bu yatırımlarda tek amaç, birim alandan mümkün olan en yüksek miktarda odunu, mümkün olan en düşük fiyata üretmektir. Dolayısıyla, endüstriyel plantasyonlar bu amacı gerçekleştirecek biçimde idare edilirler (Durkaya ve Aytekin, 2000; Öner ve Aslan,

2002). Endüstriyel orman ağaçlandırmaları genelde kitlesel odun üretiminin, kalite üretiminden daha önde olduğu, alan hazırlığı ve kültür bakımlarının makine ile yapıldığı, hızlı gelişen türlerin ıslah edilmiş tohum veya vejetatif kısımlarından elde edilen fidanların kullanıldığı, verimli yetiştirme ortamlarında daha genişçe dikim aralıklarıyla kurulan gerektiğinde sulama, gübreleme ve budama uygulanan yüksek artımlı ve kısa idare süreli ağaçlandırmalardır. Endüstriyel ağaçlandırmalar verimli alanlarda, yoğun kültür yöntemleri kullanılarak ve hızlı gelişen türlerle kurulur. Fidanlar genetik olarak ıslah edilmiş materyalden elde edilir. Kaliteli gövde üretimi de amaçlanmakla birlikte kitlesel odun üretimi yani kantite daha ön plandadır (URL 1, 2015).

Uygun ekolojik şartlara sahip 1.840.000 ha sahada hızlı gelişen türlerle tesis edilecek endüstriyel plantasyonlarda yılda 35 milyon m³ odun üretilebilecek ve 455.000 ha saha kullanılarak bu üretimin 12,5 m³'ü Kavak'tan elde edilebilecektir (Birler, 1995).

Kavak odununun çeşitli endüstri kollarında oldukça geniş kullanım alanlarına sahip olması değerini arttırmaktadır. Odununun yeknesak yapıda olması, yumuşak ve kolayca soyulabilmesi, eğilme direncinin yüksek olması, kimyasal maddeleri absorbe etme özelliği ve yandığında is çıkarmaması, yıllık halkalarının dar olması, koyu renkli bir özünün bulunmaması ve düzgün lifli olması nedeniyle soyma makinelerinde kolaylıkla tabakalar halinde soyulabilmesi gibi nedenlerle kibrit çöpü yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca hektar başına kuru odun maddesi veriminin yüksek olması da (hektarda 6.7 ton kuru odun maddesi verimi) kavak'ı kağıt ve selüloz üretiminde aranılan bir tür yapmaktadır. Bunlara ek olarak kontrplak sanayisinde sandık kutu gibi ambalaj imalinde veya kürdan üretiminde, iç mekânlarda basit köy evlerinin çatı kirişlerinde ve kerpiç bina iskeletlerinde, jimnastik salonlarının zemin döşemelerinde, bina pencerelerinin jaluzi üretiminde ve pedavra imalinde, ambalaj sanayisinde, şimendifer vagonlarının iç kısımlarında dolgu materyali olarak, yeterli mukavemeti nedeniyle suni bacak ve kol protezlerinde, ayrıca mutfak aletleri, şapka kalıpları, heykel ve biblolar, saat yuvaları, maden döküm modelleri, makara, ayakkabı topukları, resim tahtaları, oyuncaklar, fiç tıkaçları, tersimat masaları yapımında da kullanılabilir (Öner ve Aslan, 2002).

Kavak yetiştiriciliğinde kaliteli, teknik özellikleri iyi kavak odunu elde etmek temel amaçtır. Bu amaca ulaşılabilmesi; uygun yetiştirme teknikleri yanında kavaklarda zarar yapan böceklerin biyolojisi, mücadele yöntemlerinin de iyi bilinmesine bağlıdır (Şimşek, 2005).

Kavak ağacında ciddi ekonomik kayıplara sebep olan böcek türleri sayısı oldukça fazladır. Kavak zararlısı böceklerin ergin ve larvaları, kavakların kök, gövde ve yaprakları ile beslenerek ağaçların zayıf düşmesine, teknik açıdan kalite bozulmalarına ve özellikle genç kavakların kurumasına neden olabilmektedir (Zeki ve Toros, 1996; Kanat, 2000; Tozlu, 2001; Aktaş vd., 2008; Aktaş ve Şimşek, 2010). Sadece kavak delici böceklerin % 42 oranında zarar yapabildiği bilinmektedir (Aktaş ve Şimşek 2010). Ayrıca kavaklarda zarar yapan *Saperda carcharias* (Büyük kavak teke böceği)'in karantina toleransı sıfırdır. Bu nedenle birçok ülke ithal olunan kavak odunlarında bu böceğin herhangi bir dönemine ait tek bir bulaşıklığı dahi kabul etmemektedir (URL 2, 2015).

Literatüre bakıldığında kavak zararlılarının oldukça çok sayıda olduğu göze çarpmaktadır. Kavak zararlısı böcekler; yaprak, gövde ve köklerle beslenenler şeklinde 3 ana grupta toplanmaktadır. Bu böceklerin en tehlikeli olanları gövdede zarar yapan böceklerdir.

Yapraklara zarar veren böcekler kavak yapraklarını yiyerek beslenmekte ve bu şekilde kavaklarda zararlı olmaktadır. Bunların büyük bir kısmı polifag özelliktedir. Bu böceklerden; *Chrysomela populi* L., (Coleoptera; Chrysomelidae), *Stilpnotia salicis* (L.) (Lepidoptera; Lymantriidae), *Trichiocampus viminalis* (Fail.) (Hymenoptera; Tenthredinidae), *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera; Arctiidae), *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), *Byctiscus populi* (L.) (Coleoptera; Attelabidae) ve *Crepidodera aurata* Marsh. (Coleoptera: Alticidae) birçok ülke ve Türkiye'de de sıkça rastlanan ve etkin zararları görülenlerin başında gelmektedir (Anonim, 1981).

Gövde ve dallara arız olan başlıca zararlılar; *Paranthrene tabaniformis* (Rott.) (Lepidoptera; Sesiidae), *Melanophila picta* (Pall.), *Agrilus ater* (L.) (Coleoptera; Buprestidae), *Cryptorhynchus lapathi* (L.) (Coleoptera; Curculionidae), *Gypsonoma dealbana* (Froel.) (Lepidoptera; Tortricidae), *Saperda populnea* (L.) (Coleoptera; Cerambycidae) (Anonim, 1981).

Kavak köklerine zararlı olan böcekler özellikle fidanlıklarda zararlı olmaktadır. Ağaçlandırmalarda ise kök gelişiminin yeterli olması halinde etkinlikleri azalmaktadır. Bu böcekler arasında *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), *Capnodis miliaris* (Klug.) (Coleoptera Buprestidae), ve *Polyphylla fullo* (L.) (Coleoptera; Scarabaeidae) sayılabilir (Anonim, 1981).

Bu böceklerle mücadelede akla ilk gelen kimyasal ve mekanik mücadeledir (Tablo 1). Böcek tarafından tahribata uğramış ağaçların kesilmesi, feromon tuzaklarının kurulması

ve gerekli mekanik mücadelenin yapılması gerekmektedir. Bu tip zararlılarla kimyasal olarak yapılan mücadelelerde kısa sürede dayanıklılık problemi ile karşılaşılmaktadır. Ayrıca kimyasal mücadelede sadece kontrolü yapılan zararlı tür etkilenmez. Zararlı tür de beklenen yönde etkinin yanı sıra, yararlı türler üzerinde de istenmeyen etkilere sebep olabilmektedirler. Ayrıca faydalı böcekler olarak kabul edilen predatör böcekler ve parazitler insektisitlerden daha fazla etkilenmektedir. Bununla birlikte insektisitler doğrudan ve dolaylı olarak insan sağlığını etkilemektedir (Ecevit, 1988). Kimyasalların çevreye de olan zararlı etkisi düşünüldüğünde kimyasal mücadelenin sağlıklı ve uzun süre etkili bir yöntem olmadığı kesindir. En güvenli mücadele yöntemi günümüzde önemi artarak devam eden biyolojik mücadeledir. Çevreye toprağa, bitkiye ve diğer canlılara hiçbir zarar vermeden sağlıklı bir şekilde sadece zararlı tür üzerinde kontrolü sağlanmaktadır. Zararlı böceklerin yapmış olduğu zararı en aza indirmek için kullanılan yöntemler içinde yer alan biyolojik mücadelede entomopatojenlerin kullanımı oldukça yenidir. Orman zararlılarıyla biyolojik mücadelede entomopatojenlerin kullanımına yönelik çalışmalar çoğunlukla patojenik organizmaların izolasyonu, tanımlanması ve etkilerinin belirlenmesine yönelik olmuştur (Yaman, 2011).

Bu kapsamda kavak zararlılarıyla mücadele kapsamında özellikle *Crepidodera aurata* Marsham (Coleoptera: Chrysomelidae) (Kavak Yaprak Böceği) mücadelesi yapılan en yaygın türlerden birisidir. Aşağıda *C. aurata*'nın biyolojisi, zarar şekli, ekonomik önemi ve yayılışı açıklanmaktadır.

Tablo 1. Bazı kavak zararlılarına karşı ilaçlı mücadele(Anonim, 1994)

Zararlıının adı	Katılacak ilaç aktif maddesi	100 litre suya katılacak aktif madde (gr.cc)	Örnek ilaç	İlaçlama şekli ve zamanı
<i>Melampsora</i> sp. (Pas mantarı)	Triadimefon	125	Bayleton	Yaprak ilaçlaması- Pasların görülmeye başlamasıyla ilk; 20 gün sonra ikinci ilaçlama (1 ha saha için 400 litre eriyik)
	Maneb Mancozeb	120	Dithane	Pasların görülmeye başlamasıyla ilk; 15 gün ara ile 2. ve 3. ilaçlama
<i>Marssonina brunnea</i>	Maneb Mancozeb	450	Nemispor Midiltipi	Yaprak ilaçlaması- Sürgün ucundaki yapraklar tam açılınca ilk; 20 gün ara ile 2-3 ilaçlama (Koruyucu ilaçlama- 1 ha alan için 800 litre eriyik)
Yaprakla beslenen zararlı böcekler	Fenitrothion Deltametrin Alphametrin	100 1.5 3	Folithion Decis Fastac	Larvaların ilk dönemlerinde taç topluluğu ilaçlanmalı, gerekirse 15-20 gün ara ile tekrarlanmalıdır.
<i>C. lapathi</i> (Fidanlıkta ve ağaçlandırmada)	Chlorpyrifos-methyl Alphametrin Trichlorfon Deltametrin Fenthion	200 5 200 2.5 150	Reldan Fastac Dipterex Decis Lebaycide	Gövde ilaçlaması- Baharın başlangıcında tomurcuklar patlamaya başladığında ilk; 15 gün ara ile ikinci (Kışa girmeden hemen önce de ilaçlama yapılabilir fakat bununla ancak böcek popülasyonu azaltılabilir. Esas mücadele ilkbahar başlangıcında yapılandır).
<i>C. lapathi</i> (Fidanlıkta satımdan önce)	Maneb Mancozeb	7 3.5	Fastac Decis	Fidanların sökümü sırasında gövdeler ilaçlanır.
<i>S. tabaniformis</i>	Chlorpyrifos-methyl Fenitrothion Deltametrin	100 120 1.5	Reldan Folithion Decis	Gövde ilaçlaması- İlk erginlerin görülmesinden 20 gün sonra ilk; 20 gün ara ile ikinci; gerekiyorsa 3. ilaçlama
<i>G. dealbana</i>	Fenitrothion Deltametrin	60 1	Folithion Decis	Yaprakta beslenen larvalarına karşı
Gövde ve dal üzerindeki koşniller	Fenthion	75	Lebaycide	Tasallutlar ilk görüldüğünde, tercihen fırça ile, sadece tasallutlu yerlere uygulanması
Kök zararlıları	Chlorpyrifos-ethyl		Dursban 4	Bir dekar alana 1200 gr aktif madde gelecek dozda kullanılması ve sürümle 15-20 cm derinliğe kadar toprağa karıştırılması gereklidir.

1.2 *Crepidodera aurata* Marsham (Coleoptera: Chrysomelidae) (Kavak Yaprak Böceği)

Alem: Animalia (Hayvanlar)

Şube: Arthropoda (Eklem Bacaklılar)

Alt Şube: Hexapoda

Sınıf: Insecta (Böcekler)

Takım: Coleoptera (Kıncanatlılar)

Familiya: Chrysomelidae (Yaprak böceğigiller)

Cins: *Crepidodera*

Tür: *Crepidodera aurata* Marsham, 1802

1.2.1. Biyolojisi

C. aurata vücutları uzamış ve oval şekillidir. *C. aurata*'nın erginleri 2.5- 3.5 mm uzunluğundadır (Kuhnt, 1913; Schaufuss, 1916; Heikertinger, 1948; Mohr, 1966; Maisner, 1974; Schmitt, 2004). 2010 yılında yapılan kapsamlı bir çalışma erkek ve dişi bireylerin vücut uzunluğu hakkında bilgiler sunmaktadır. İncelenen *C. aurata* erginlerinin vücut uzunluğunun 2.2- 4.0 mm olduğu, erkek bireylerin 2.2-3.6 mm (ortalama 2.7 mm), dişi bireyler 2.2-4.0 mm (ortalama 3.0 mm) olduğu tespit edilmiştir (Urban, 2011).

C. aurata vücutlarının metalik parlaklıkta ve değişen canlı renkleriyle karakterize edilirler (Urban, 2011). Dişiler ve erkekler farklı renklere sahiptirler. Dişilerin vücudunun tüm üst yüzeyi yeşilimsi-altın rengindeyken, erkek bireylerin yeşilimsi-mavi, mavi ya da mor renktedir. Üst yüzeylerinde yer alan uzunlamasına çizgiler ve çizgilerin üzerinde sıralanmış noktalar elitra (ön kanat) üzerinde gözle görülebilecek düzeydedir (Şekil 1). Arka çift bacakların üst kısımları bileklerden üstlere doğru daha kalınlaşır. Bu özellikleri sayesinde kavak yaprak böcekleri çok uzaklara zıplayabilirler (kendi vücutlarının yüz katından büyük bir alana) (URL 3, 2015).

Ergin böceklerin ortalama yaşam ömrü 8–9 aydır. Genellikle kırsal, nemli ormanlar, orman kenarları, ıslak çayırlar, bataklıklar ve fundalık alanlar tercih ettikleri habitatlardır. Ayrıca doğal park ve bahçelerde de görülebilirler (URL-3).

Kavak yaprak böceği *C. aurata* Nisan-Ekim ayları boyunca aktiftir. Bu süre zarfında kavak ve söğüt ağaçları üzerinde bulunur ve yapraklarını tüketirler. Yaprakları yemeleri sonucunda yapraklar üzerinde yuvarlak delik oluştururlar. 7-8 aylık olduğunda böcekler cinsel olgunluğa erişirler. Temmuz-Ağustos aylarında çiftleşirler. Döllenmiş dişi yumurtalarını yapraklar üzerine bırakır. Yumurtalar sarımsı ve iđ biçimindedir. Larvalar yaz aylarında yumurtadan çıkarlar. 5–6 mm uzunluğunda siyah ve küçük sülük görünümündedirler. Larvalarda aynı yetişkin böcekler gibi konak bitki üzerinde bitkinin yapraklarıyla beslenirler. Yaz sonunda yumurtadan ergine olan 3-4 aylık gelişim tamamlanır. Yetişkin böcekler kışı yaprak yığınları altında ya da toprakta iyi korunmuş diğer alanlarda geçirirler (URL 3, 2015)



Şekil 1. *C. aurata*'ya ait, larva ve ergin hayat safhaları. Sağ üst fotoğraf *C. aurata* ergin ve erkek birey, sol üst fotoğraf dişi birey (URL 4, 2015), alttaki fotoğraf *C. aurata* larvaları (Toper ve Yıldız, 2007)

1.2.2. Zarar Şekli, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

Crepidodera aurata geniş dağılıma alanlarına sahip türlerdendir. Avrupa Afrika, Asya, Çin, İran, Kazakistan, Balkan ülkeleri (İtalya, Slovenya , Makedonya, Yunanistan, Bulgaristan, Romanya, Bosna), Rusya, Ukrayna, Ermenistan, Çekoslovakya ve Türkiye'de bulunmaktadır (Urban, 2011).

C. aurata başta kavak olmak üzere kavak ağacının hemen hemen her türünde ve söğüt ağaçlarında da zarara sebep olmaktadır. Arka ayaklarının üst kısmı kalınlaşmıştır

ve bu özelliği ile kavak yaprak böcekleri mükemmel bir zıplama yeteneği kazanmıştır. Bu sayede daldan dala ya da ağaçtan ağaca kolaylıkla geçip zarar düzeylerini arttırabilirler. Ayrıca çok çeşitli bölgelerde uygun konak türler için başarılı bir şekilde kolonize olurlar. Larvalar rizofagdir (Urban, 2011). Yumurtadan çıktıkları andan itibaren yapraklarla beslenirler ve hızla yaprakları tüketirler. Yaprakların zarar görmesi sonucunda bitkinin fotosentez yapması engellenir ve zarar daha büyük boyutlara ulaştığında ağaç odununun bu durumdan olumsuz şekilde etkilenmesi kaçınılmazdır.

1.2.3. Doğal Düşmanları ve Mücadele Yöntemleri

C. aurata'nın doğal düşmanları, predatörleri, parazitoidleri ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Parazitoidleri bazı Ichneumonidae, Braconidae ve Tachinidae larvalarıdır (URL 4, 2015). Predatörleri hakkında da bilgiler oldukça kısıtlıdır (Urban, 2011). Ancak Pentatomidae familyasından bazı türleri söylenebilir (URL 4, 2015). *C. aurata* popülasyonlarını kontrol altına almak için klasik mekanik ve fiziksel mücadele yapılmaktadır. Mevcut durumda bu zararlıların bazılarıyla mücadelede uygulama kolaylığından dolayı kimyasal mücadele zaman zaman kolayca tercih edilmekte ve güncel olarak kullanılmaktadır (Tablo 1). Türkiye'de kavak zararlıları ile yapılan birbirinden bağımsız mekanik ve kimyasal mücadele çalışmaları istenilen başarıya ulaşamamıştır. Kimyasallarla yapılan mücadelede yeterli başarı sağlanamazken, ilave birde ekonomik maliyet ortaya çıkmıştır. Ülkemizde yaklaşık 125 000 hektar kavak ağaçlandırması bulunmaktadır. Buna göre yapılan hesaplamada Türkiye kavak ağaçlandırmalarında yıllık ilaçlama maliyeti yaklaşık 7.698.600 TL'dir (Anonim, 2012). Bu yüksek maliyete rağmen, kimyasal mücadelede kullanılan insektisitlerin birçok yan etkileri ortaya çıkmaktadır. İnsektisitler zararlı böceklerin predatörlerine ve çevredeki diğer yararlı canlılara birçok yönden ciddi zararlar vermektedir (Ecevit, 1988). Bu nedenle son yıllarda türe özgü mücadele ajanları vasıtasıyla hedef zararlının dışındaki canlılara zarar vermeyen biyolojik mücadele çalışmalarına ağırlık verilmektedir. Ancak biyolojik mücadele çok uzmanlık gerektiren bir konudur, kullanılacak ajanın dikkatle seçilmesi ve türe özgü olması çok önemlidir. Bu nedenle, son zamanlarda dünyada yoğun bir şekilde zararlıların patojenleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bu tip patojenler arasından türe özgü ve öldürücü etkisi yüksek olanları araştırılmaktadır. Zararlı böceklerde doğal olarak hastalık yapan

patojenlerin varlığının araştırılması biyolojik mücadele ajanlarının belirlenebilmesi için gerekli bir ön çalışmadır.

Son yıllarda Chrysomelid'lerden izole edilen entomopatojenlerin araştırılması hız kazanmıştır (Yaman, 2003; Yaman vd., 2011). Entomopatojenlerden olan mikrosporların da bu konuda önemi düşünüldüğünde gereken değerin verilip araştırma sayılarının kayda değer ölçüde arttığı görülmektedir. Ancak şu ana kadar *C. aurata*'dan tanımlanmış bir mikrospor kaydı mevcut değildir. Aşağıda mikrosporidyumlarla ilgili genel bir bilgi ve *C. aurata*'dan izole edilen mikrosporidyumlar hakkında bilgiler verilmektedir.

1.3. Mikrosporidia

Mikrosporidialar spor oluşturan, omurgalı ve omurgasız canlıları geniş ölçüde enfekte eden zorunlu hücre içi parazitlerdir (Franzen ve Muller, 1999).

Mitokondrileri bulunmayan mikrosporidialar, hücre dışında kalın protein ve kitin yapıda duvarla çevrili sporlar halinde bulunurlar. Sarmal yapıda polar filament içerirler (Vavra, 1976a; Vavra, 1976b).

Konak hücre dışında metabolik aktivasyon gösteren bir evresi yoktur. Membrana bağlı çekirdeği ve intrasitoplazmik membran sistemine sahip olması gibi bir takım özellikleri nedeniyle ökaryot olarak kabul edilmekle birlikte, 70S ribozomu olması, mitokondri veya peroksizomunun olmaması ve golgi cisimciğinin basit yapıda olması gibi ökaryotlara benzemeyen tarafları da vardır (Garcia, 2002).

Bugüne kadar literatürde mikrosporların (160 cins) 1300 türü tanımlanmıştır. Bu tanımlama mikrosporların hücresel yapıları, yaşam döngüleri, ve konak seçiciliğine bağlı olarak yapılmıştır. Mikrosporlar tipik olarak nispeten dar konak spektrumuna sahiptir ancak grubun tüm üyeleri insanların dahil olduğu omurgalılar, çok sayıda eklembacaklılar, ve daha az protistler olmak üzere konak diziliminde geniş bir taksonomik aralıkta bulunurlar (Becnel ve Andreadis 1999; Larson, 1999; Vossbrinck ve Debrunner-Vossbrinck, 2005; Weiss ve Vossbrinck, 1998).

Mikrosporlar çok küçük tek hücreli yapılardır. Genellikle tek tip olan sporları çok küçüktür (1-20 µm). Sporlar küre şeklinde, oval ya da uzun olabilirler. Her spor türe özgü olarak değişen çeşitli sayıda kuyruk ile polar filament, bir tübüler ve sporoplazmadan oluşur (Current ve Owen, 1989).

Mikrosporidian sporlarının konak hücre dışında yaşayan tek aşamaları vardır ve sporlar ince sert hücre duvarı ve uzun bir polar filamentten oluşan kompleks bir enfeksiyon aygıtı, vakuol ve polaroplast adı verilen yığılmış membran sistemi ile ayırt edilirler (Corradi ve Keeling, 2009). Spor şekil ve boyutları türden türe değişmekle birlikte çoğu 2–7 µm aralığındadır.

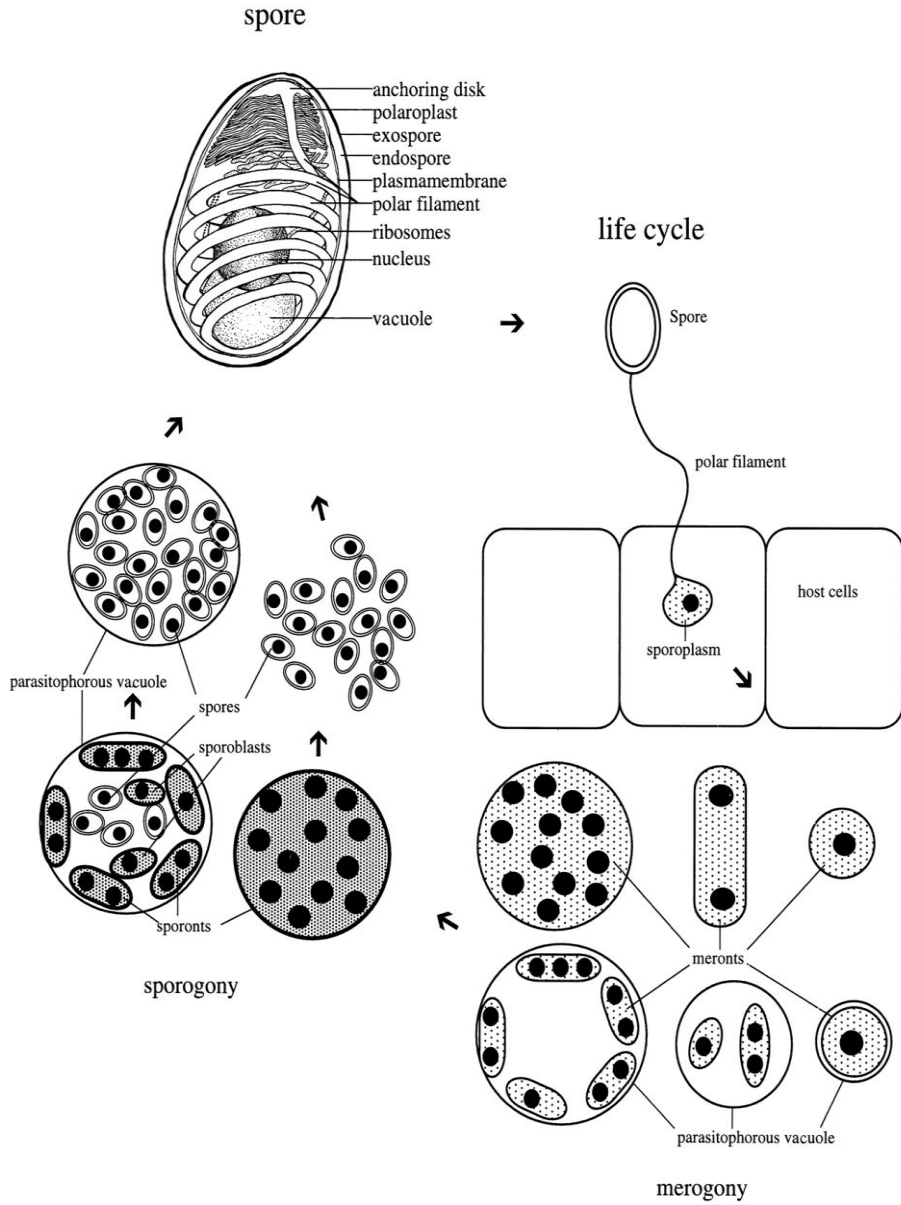
Mikrosporlar eksternal ve internal sporlar olmak üzere iki çeşit spor oluştururlar. Eksternal sporlar daha kalın spor duvarına sahiptirler ve konak tarafından vücuda ağız yoluyla alınırlar. Besin yoluyla alınan bu taşınım vertikal taşınım olarak adlandırılır. İkincisi ise konak içinde farklı dokulara bulaşmaya yarayan internal sporlardır. Internal sporlar hastalıklı dişi tarafından yumurta aracılığıyla bulaştırılır. Sporların bu yolla taşınmasına horizontal taşınım denir.

Konak dışında mikrosporların tek aşaması efektif spor aşamasıdır. Mikrosporların gelişiminde 2 farklı aşama vardır; konak hücre içinde spor sayısının artırılmasından sorumlu olan proliferatif (merogoni) faz ve sporların olgunlaştığı sporoblastların üretildiği sporontlarda, sporogenik aşama (sporogoni)'dir (Franzen ve Muller, 1999; Current ve Owen, 1989).

Mikrospora ait sporlar, konağın vücuduna girip bağırsağa ulaştıktan sonra polar filamentlerini dışarı çıkarıp polar tüp oluştururlar ve konağın hücre zarını delerek hücre içine girerler. Sporun içindeki çekirdek ve sitoplazmadan oluşan sporoplazma tüp vasıtasıyla konak hücre içine aktarılır (Hazard vd., 1984, 1985).

Genel olarak bir mikrosporun enfeksiyonu spor içinde sporoplazmanın konak hücreye nakli ile başlar. İlk üreme fazı merogoni olarak adlandırılır. Sporoplazma konak hücrede merontları oluşturur. Meront, merogonial üremedeki ana hücredir. Merontun şekli, boyutları, sahip olduğu çekirdeğin özelliği karakterizasyonda türler arası karşılaştırmada kullanılır. Meront bir sporoplazma ya da bir merositden gelişir. Meront merogoni olarak bilinen üreme şekliyle vejetatif bir şekilde çoğalır. Bu çoğalma çoğu zaman merogonial üremede çok çekirdekli bir safha olan merogonial plasmodiumlar önemli rol oynar. Oluşan merontlar sporogonial üremede ana hücre olan sporontlara dönüşür. Sporontların şekli, boyutları karakterizasyonda türler arası karşılaştırmada kullanılır. Sporontlar kalın hücre duvarıyla merontlardan ayırt edilir. Sporogonial üremede sporontlar sporogoninin son bölünme ürünü olan sporoblastlara dönüşür. Sporoblast yuvarlak, oval, tüp şekilli veya düzensiz şekilli bir hücre olup, bölünme geçirip geçirmeyeceği, boyutları ve çekirdek

sayısı teşhiste önem arz eder. Sporblastlar olgunlaşarak spora dönüşür. Spor, gelişimin en son safhasıdır. Kalın bir hücre duvarına sahiptir.



Şekil 2. Mikrosporların konak hücreye girişi ve çoğalma safhaları (URL 5, 2015)

Mikrosporlar, doğada tek bir konağı tercih eden, yani konak spesifitesi olan canlılardır. Enfeksiyon gerçekleştirdikleri zararlının ölümüne sebep olmayıp, buldukları konağın hayat süresinin kılmasına, canlılıklarının azalmasına, iştah ve kilo kaybına ve aynı zamanda üreme potansiyellerinin azalmasına sebep olurlar. 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 ajanlarındanndır.

Microsporidialar memeliler, sürüngenler, balıklar amfibiler ve böceklerden izole edilmişlerdir (Canning ve Lom, 1986). Ancak 7 cinsi (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Brachiola* ve *Nosema*) insanlarda hastalık yapan patojen olarak tanımlanmıştır (Franzen ve Muller, 2001). 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 boyaması sayesinde bu yöntem çok etkilidir. Giemsa boyama yöntemiyle teşhis edilen mikrosporların elektron mikroskobu çalışmaları sayesinde detaylı karakterizasyonunu yapmak mümkündür.

1.4 Tezin Amacı

Hazırlanan bu yüksek lisans tezinde, önemli bir kavak zararlısın olan, Coleoptera takımına ait Kavak yaprak böceği *Crepidodera aurata* (Marsh.) (Coleoptera: Chrysomelidae)'nde doğal bir şekilde hastalık oluşturan bir mikrosporidyum patojeninin tespiti, izolasyonu ve çeşitli metotlar aracılığıyla karakterizasyonu ve Türkiyedeki populasyonlarında dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Tez çalışmaları boyunca, *C. aurata*'nın dağılımı ve bu böcekte mikrosporidyum enfeksiyonunun varlığı araştırılmıştır. Arazi çalışmaları her lokalite için iki senelik zaman dilimini kapsamaktadır. Bu zaman diliminde bir mikrosporidyum patojeninin karakterizasyonu ve bu patojenin *C. aurata* populasyonlarındaki dağılımı araştırılmıştır.

2.1. Böceklerin Elde Edilmesi

Mevcut çalışmanın konusunu oluşturan *Crepidodera aurata*'nın erginleri, 2013-2014 yıllarında, Mart-Ekim ayları arasında, Bekdemir (Kastamonu), Vezirköprü (Samsun), Irmaksırtı (Çarşamba), Kızılot (Çarşamba), Havaalanı (Çarşamba), Fidanlık (Kocaeli), Çıldır (Akyazı), Bilecik, Bursa ve Bolu lokalitelerinden toplanmıştır. Böceklerin toplanması süresince aşağıdaki yöntemler izlenmiştir.

Böceklerin toplanacağı lokaliteler belirlendi. Arazi çalışmaları boyunca böcekler dikkatli bir şekilde steril kaplara toplandı. Enfeksiyon dağılım oranını etkilemek ve olası kontaminasyonun önüne geçmek için her lokaliteden alınan erginler ayrı ayrı kaplara toplandı. Böceğin elde edildiği bölge, tarih ve laboratuvar çalışmaları süresince uygun şekilde kullanılabilir önemli bulgu ve özelliklerin ait oldukları kaplara not edilmesine özen gösterildi. Toplanan bireyler en kısa sürede laboratuvara getirildi ve dikkatlice çalışmalara başlandı.

2.2. Makroskobik Çalışmalar

Böcek dokularında meydana gelmiş özellikle kütikül üzerindeki renk değişiklikleri, aşırı büyümüş ve deforme olmuş dokular, davranış anormallikleri gibi gözlemlenebilen bazı makroskobik semptomlar mikrosporidyum enfeksiyonu düşündürülebilir. Ancak bu çalışmada kayda değer makroskobik belirtiler görülmemiştir. Gözle görülür bir enfeksiyon belirtisi göstermemesi nedeniyle de makroskobik olarak enfekte böceklerin ayrımı yapılmamıştır. Ayrıca *Crepidodera aurata* erginlerinin çok küçük olmaları sebebiyle erkek dişi ayrımı da gerçekleştirilememiş çalışmalara bütün böceklerin diseksiyonu yapılarak devam edilmiştir.

2.3. Mikroskopik Çalışmalar

Crepidodera aurata'nın erginlerinde enfeksiyon tespit edilen mikrosporidyumun morfolojik, anatomik ve histopatolojik özelliklerini açığa için bir seri ışık ve elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları ile moleküler çalışmalar yapılmıştır.

2.3.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucunda elde edilen *C. aurata* erginleri hazırlanan Ringer solüsyonu içinde disekte edildi. 8,0 g Sodyum klorür (NaCl), 0,25 g Kalsiyum klorür (CaCl₂), 0,25 g Potasyum klorür (KCl) ve 0,25 g Sodyum bikarbonat (NaHCO₃)'ın 1000 ml saf su içerisinde çözülmesiyle elde edilen Ringer solüsyonu böcek dokuları için en ideal izotonik ortamı oluşturması açısından diseksiyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Diseksiyon, patojenin hangi dokularda etkin olduğunun belirlenebilmesi için dikkatli bir şekilde abdomen ve toraks bölgesinden tüm doku ve organların alınmasıyla yapıldı. Hazırlanan preparat ışık mikroskobu (Olympus CX41) altında 40x'ten 1000x'e kadar olan büyütmelemlerle incelendi. Enfeksiyon tespit edilen preparatlar DP-25 dijital kamera ve DP2-BSW resim sistemi özelliğine sahip olan Olympus BX51 mikroskobuyla yeniden incelenip patojenin fotoğrafları alındı ve karakterizasyonu için gerekli olan ölçümler yapıldı.

Böcek dokularıyla hazırlanan preparatlarda, enfeksiyon yapan patojenler böceğin vücudunda bulunan birçok farklı yapı ve bağırsaktaki besin artıkları ile ışık mikroskobu altında morfolojik olarak benzerlik gösterebilirler. Bu tez çalışması sırasında tespit edilen patojenlerin doğru teşhisini yapmak ve ortaya çıkabilecek bu karışıklığı gidermek için giemsa boyama tekniği kullanıldı. Tüm mikrosporidyum enfeksiyonlu preparatlar giemsa ile boyanarak mikroskop altında tekrar incelenip, var olan sporlar boyanma şekilleri ile ayırt edilerek yeniden ölçümleri yapıldı.

2.3.1.1. Giemsa Boyama

Giemsa boyası hücrenin çekirdek ve sitoplazmasındaki yapıların ayırt edilmesini sağlayan özel bir boyadır. Sitoplazma açık mavi veya kırmızıya boyanırken, çekirdek pembe renkte boyanır. Böylece detaylı bir inceleme ortamı sağlanmış olur ve

mikrosporların hayat döngüsü safhaları ayrıntılı bir biçimde ortaya konulabilir. Ayrıca Giemsa boyası sporların çekirdeğini boyayıp, spor duvarının beyaz kalmasını sağlayarak da mikrospor patojenlerinin teşhisinde önemli bir görev üstlenmiştir.

Enfeksiyon tespit edilen preparatların boyama işlemi sırasıyla şu aşamalarla gerçekleştirildi: öncelikle preparat oda sıcaklığında açık havada kurutuldu, istenmeyen kontaminasyonların oluşmaması için %100'lük metil alkolde 3 dakika bekletildi ve yeniden oda sıcaklığında açık havada kurutulup saf suyla hazırlanan %5'lik Giemsa boyasında yaklaşık 12 saat boyanmaya bırakıldı. Boyadan alınan preparatlar üzerlerine steril su akıtılarak yıkandı, kurutuldu ve immersiyon yağı ile birlikte mikroskop altında 1000x'lik büyütmede incelendi.

2.3.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) çalışmaları, incelenmesi istenen yapıların morfolojik ve anatomik özelliklerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesini sağlamaktadır. Tez çalışmaları sırasında gözlemlenen mikrosporidyumun tür seviyesinde teşhis edilebilmesini mümkün kılması bakımından muazzam bir öneme sahiptir. Kavak yaprak böceklerinden izole edilen mikrosporidyumun detaylı yapısı Almanya, Berlin Üniversitesi Laboratuvarı'nda Philips JM 208 elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.3.2.1. Fiksasyon, Dehidrasyon, Resine Gömme ve Boyama

Işık mikroskobu altında enfeksiyon varlığı tespit edilen preparattaki dokular dikkatli bir şekilde alınarak fiksasyon, dehidrasyon, resine (ERL) gömme ve boyama işlemlerinden geçirilmiştir.

Dokuların elektron mikroskobunda incelenebilecek duruma getirilebilmesi için izlenen aşamalar şunlardır: ayrılan doku materyali pH 7,2'de 0,1M kakodilat tamponu ile seyreltilen % 2,5'lik glutaraldehit içinde iki saat boyunca fiske edilmiş ve takiben pH 7,2'de 0,1 M cacodylate tamponu içerisinde üç kez 10'ar dakika yıkanmıştır. Daha sonra OsO₄ (Osmium tetroksit) ile 2 saat süreyle muamele edilmiş, yeniden pH 7,2'de 0,1 M cacodylate tamponu içerisinde üç kez 10'ar dakika yıkanmıştır.

Numuneler sırasıyla % 30'luk, % 50'lik ve % 70'lik etanolle 15'er dakika, % 90'luk, % 96'luk ve % 100'lük etanol ile 10'ar dakika üçer kez muamele edilip dehidrasyona uğratılmıştır. Ertesi güne bırakılması gerektiğinde ya da 1-2 gün ara verileceği zaman numuneler %70 etanolde veya %25 resinde bırakılmıştır.

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 süreyle 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 Pioloform kaplı bakır ızgaralar üzerine yerleştirilmiş ve doymuş uranil asetat ve Reynold's kurşun sitrat boyaları ile boyanmıştır.

3. BULGULAR

Bu yüksek lisans tezinde ülkemizde önemli bir kavak zararlısı olan *Crepidodera aurata*'nın larva ve erginlerinde hastalık oluşturan mikrosporidyum patojenlerinin varlığı ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Çalışmalar sonucunda ülkemiz için ilk kayıt olan bir mikrosporidyum patojeni tespit edilmiş ve detaylı karakterizasyonu ve dağılımı çalışılmıştır.

3.1. *Crepidodera aurata*'da Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi

Crepidodera aurata'da enfeksiyon yapan mikrosporidyum patojeni makroskobik ve mikroskobik (morfolojik, anatomik; ışık ve elektron mikroskobu) yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.1.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskobik Olarak Belirlenmesi

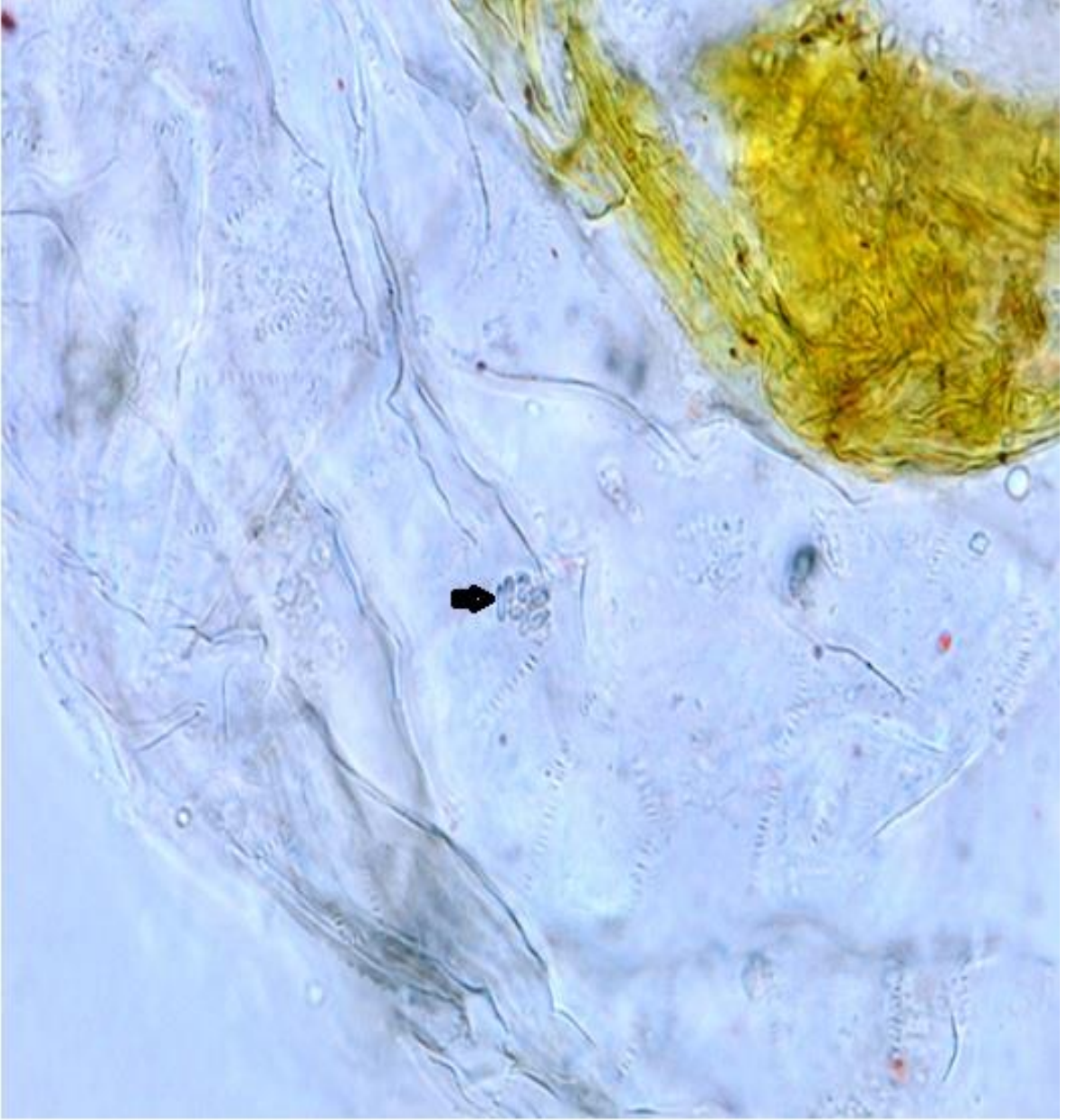
Bu tez çalışmasında, tespit edilen mikrosporidyum patojeninin mikroskobik olarak belirlenmesi için ışık ve elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları olmak üzere iki temel yol izlenmiştir. Tespit edilen mikrosporidyum patojeni, önce ışık mikroskobu altında saptanmıştır. Taze preparatlardaki mikrospor patojeninin 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 uygulanmış, 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.

3.1.1.1. Işık Mikroskobu Çalışmaları ile Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi

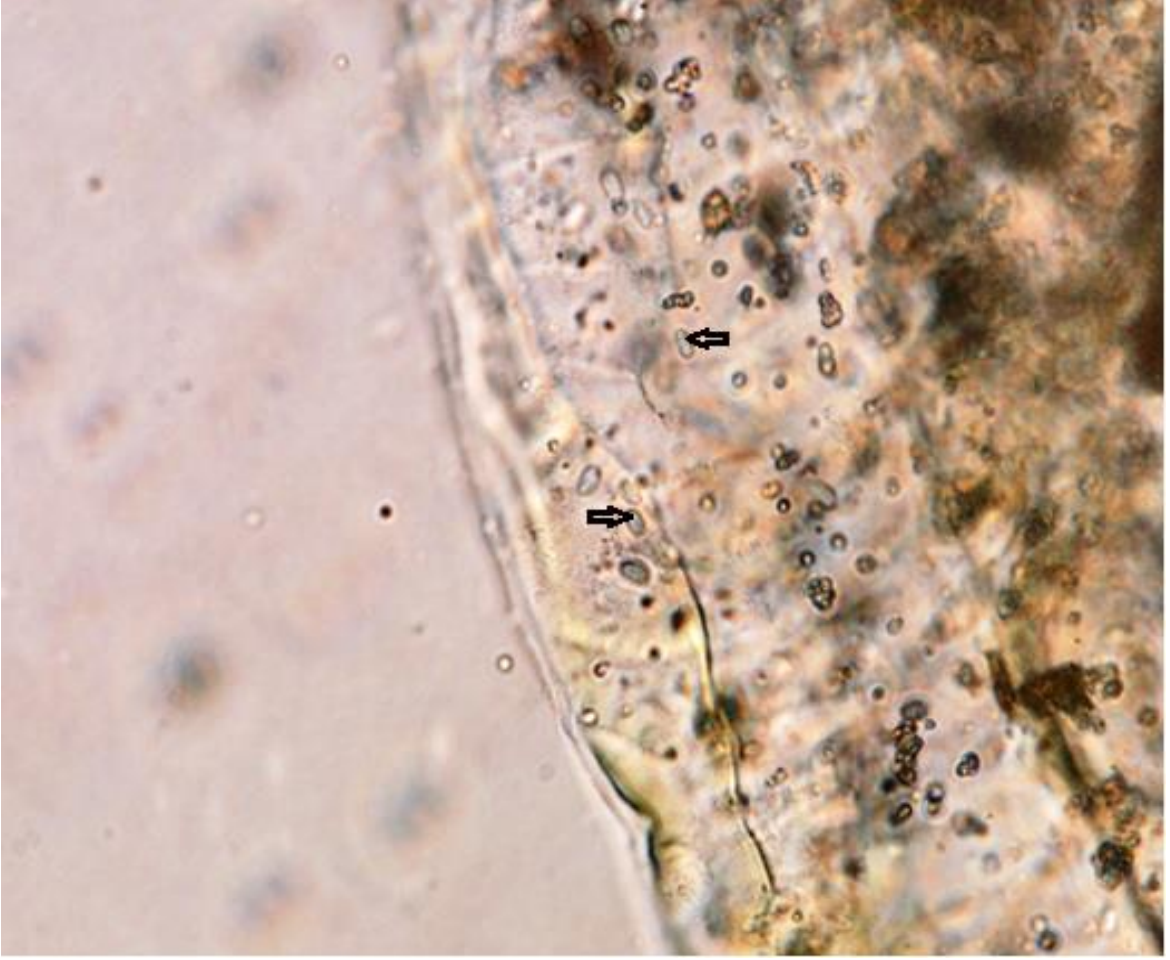
Işık mikroskobu çalışmalarında incelenmek üzere diseksiyonu yapılan örneklerde mikrosporidyum patojenine ait önemli hayat safhaları dikkatli bir şekilde tespit edilmeye çalışılmıştır. Doğrudan taze dokuların incelenmesi sırasında, mikrosporidyum

enfeksiyonunun bulunduğu dokulardaki morfolojik farklılıklar, normal dokular ile karşılaştırılarak enfeksiyon varlığı saptanmıştır. Taze preparatlarda konağın dokularında gerçekleşen tahribat gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu çalışmaları sonucunda mikrosporidyum enfeksiyonunun böceğin bağırsak, malpighi tüpleri ve hemolenfinde enfeksiyon yaptığı belirlenmiştir. Özel kamera ve resim sistemlerine sahip mikroskop kullanılarak, daha önce ışık mikroskobunda tespit edilen mikrosporların enfekte ettiği dokular fotoğraflanmıştır. Patojenin mikroskop altında tespitinde en temel safha olan spor safhası birçok diseksiyonda gözlenmiş ve sporlarının ölçümü yapılmıştır.

Mikrosporidyum patojeninin karakteristik özelliklerini taşıyan sporlar ışığı farklı şekilde kırmaları, aynı boyut ve şekle sahip olmaları bakımından konakçının diğer dokularından ayırt edilmektedir. Enfeksiyon konağa ait bağırsak, yağ dokusu, malpigi tüpleri ve salgı bezleri gibi birçok doku ve organda gözlendi (Şekil 3, 4).



Şekil 3. *C. aurata* 'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyumun bağırsak dokusunda enfeksiyonu (100X)

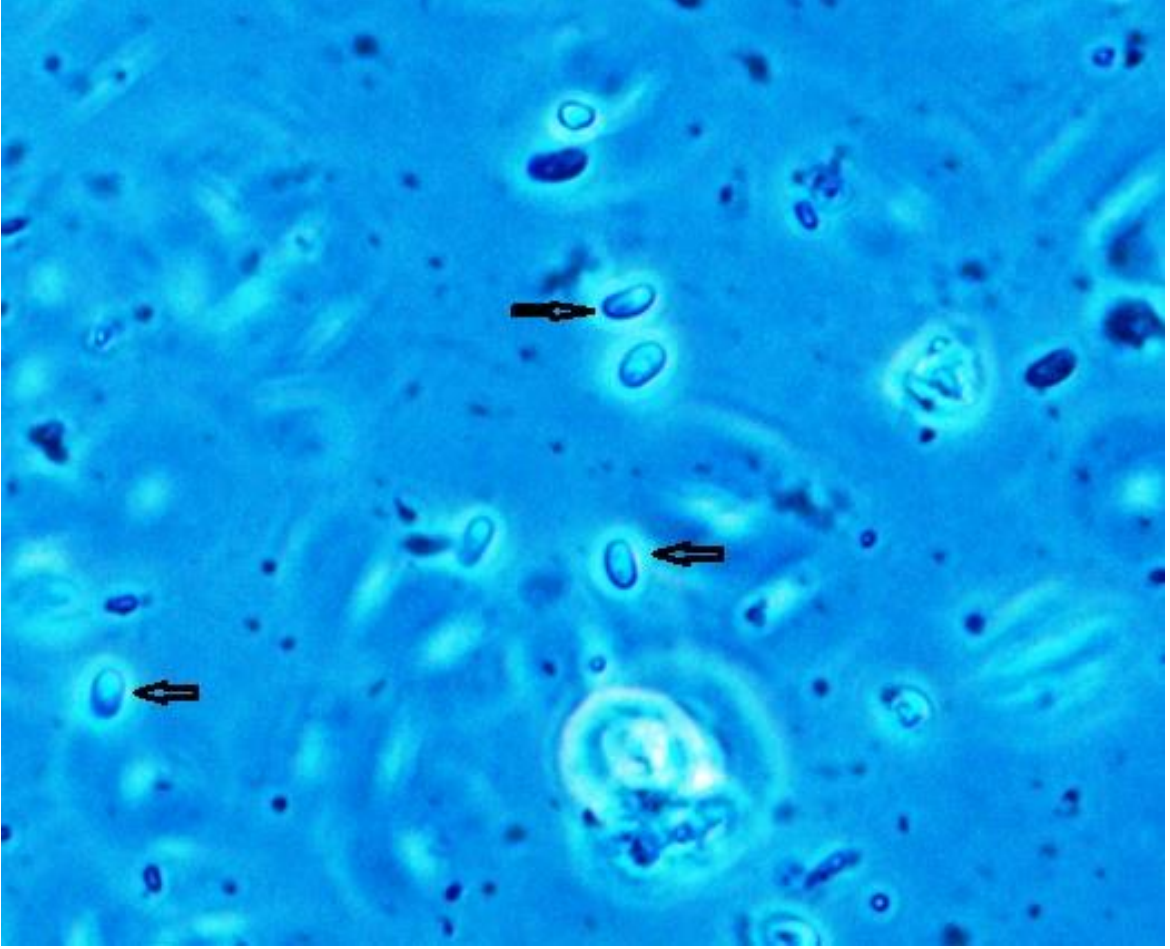


Şekil 4. *C. aurata* 'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyumun Malpigi tüplerindeki enfeksiyonu (100X)

Mikroskobik çalışmalar süresince *C. aurata* popülasyonlarında spor morfolojisi açısından patojene ait farklı iki mikrosporidyum gözlenmiştir (Şekil 5, 6). Serbest sporlar izolat 1 (Vezirköprü lokalitesi)'de 3.66-5.66 μm uzunluğunda ve 1.35-2.22 μm genişliğinde (Şekil 5), izolat 2 (diğer lokaliteler)'de 2.44-3.55 μm uzunluğunda, 1.25-1.55 μm genişliğinde ölçüldü (n=50) (Şekil 6).

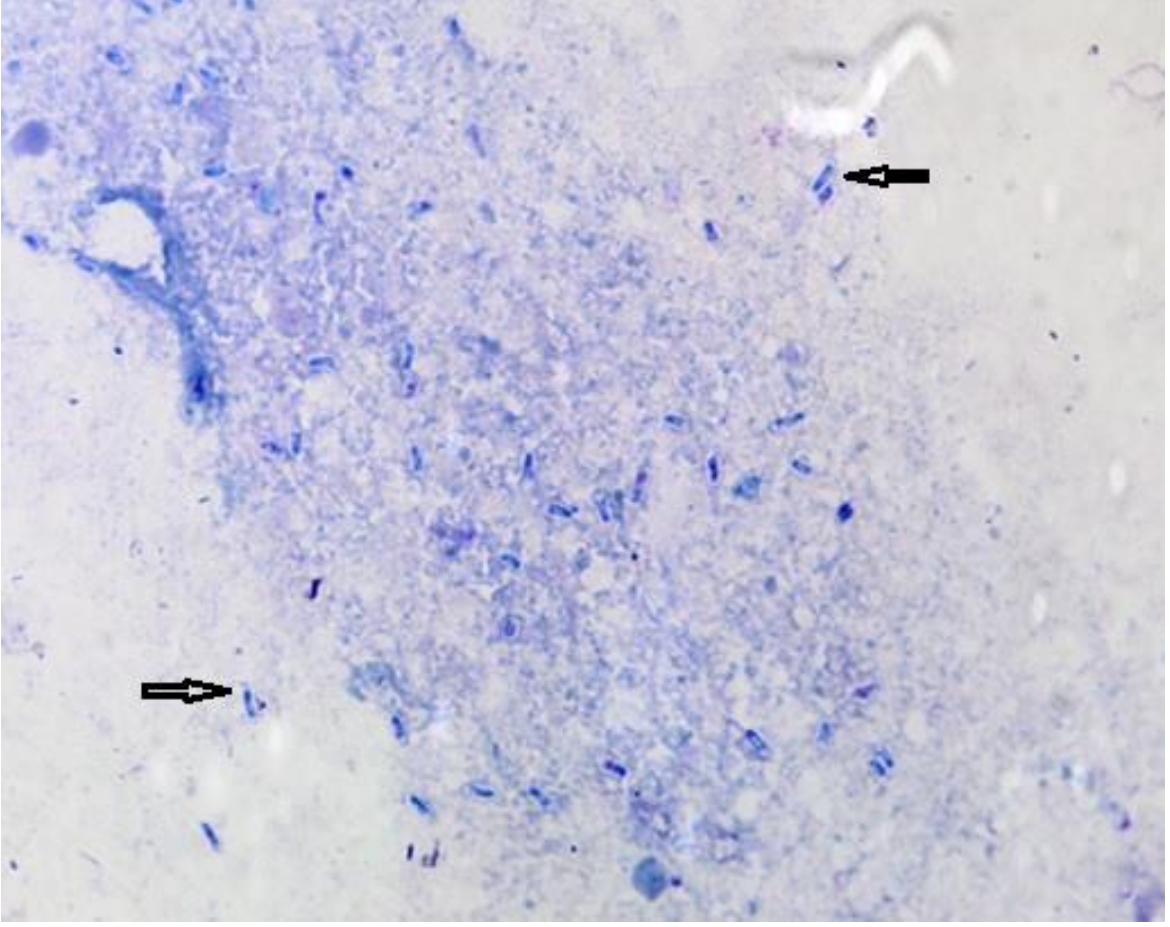


Şekil 5. *C. aurata*'nın Vezirköprü (Samsun) popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyuma ait spor yapıları (100X)



Şekil 6. *C.aurata*'nın farklı lokalitelerinde gözlenen microsporidium patojenine ait sporlar (100X)

Böceklerde enfeksiyona neden olan entomopatojenler ışık mikroskobu altında morfolojik olarak birbirlerine benzerlik gösterebilmektedirler. Çeşitli patojen türleri farklı özellikteki yapılarının varlığı ile karakterize edilebilmektedirler. Özellikle birçok mantar türü morfolojik yapıları ile mikrospor patojeninin karakteristik spor safhasına benzerlik gösterir. Işık mikroskobu çalışmalarında patojenlerin neden olabileceği karışıklığı gidermek ve mikrosporidyum patojenini diğer dokulardan ve patojenlerden ayırt edebilmek amacıyla çeşitli boyama teknikleri kullanılmaktadır. Entomopatojenlerin tespitinde yaygın olarak kullanılan giemsa boyası ile preparatlar boyanarak mikrosporidyum patojeninin karakteristik safhası olan sporlar tespit edildi (Şekil 7).



Şekil 7. *C. aurata*'nın popülasyonlarında tespit edilen mikrosporidyuma ait giemsa boyalı sporları (100X)

Giemsa ile boyanan numunelerde sporlar kalın spor duvarı nedeni ile renksiz ve 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, çekirdeğin koyu mor renkte boyandığı gözlemlendi.

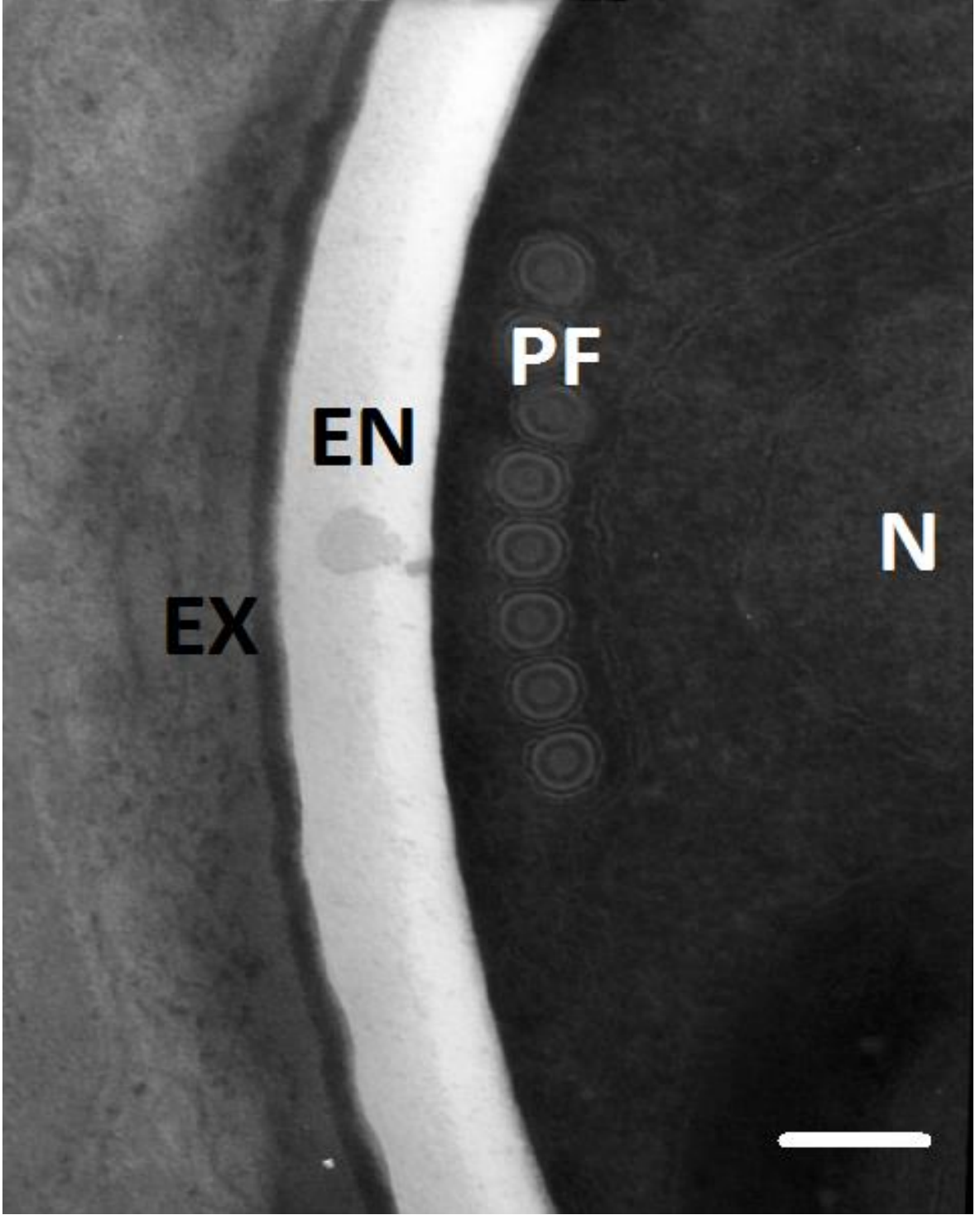
3.1.1.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi

Yukarıda bahsedildiği gibi *Crepidodera aurata*'da hastalık oluşturan patojenin ışık ve giemsa boyalı incelemeleri sonucunda patojenin mikrospor olduğu tespit edilmiştir. TEM çalışmaları sayesinde tespit edilen patojenin diğer patojenlerden ayırt edilebilmesi sağlanmıştır. Günümüzde mikrosporların sınıflandırılmasında; spor şeklinin yanı sıra;

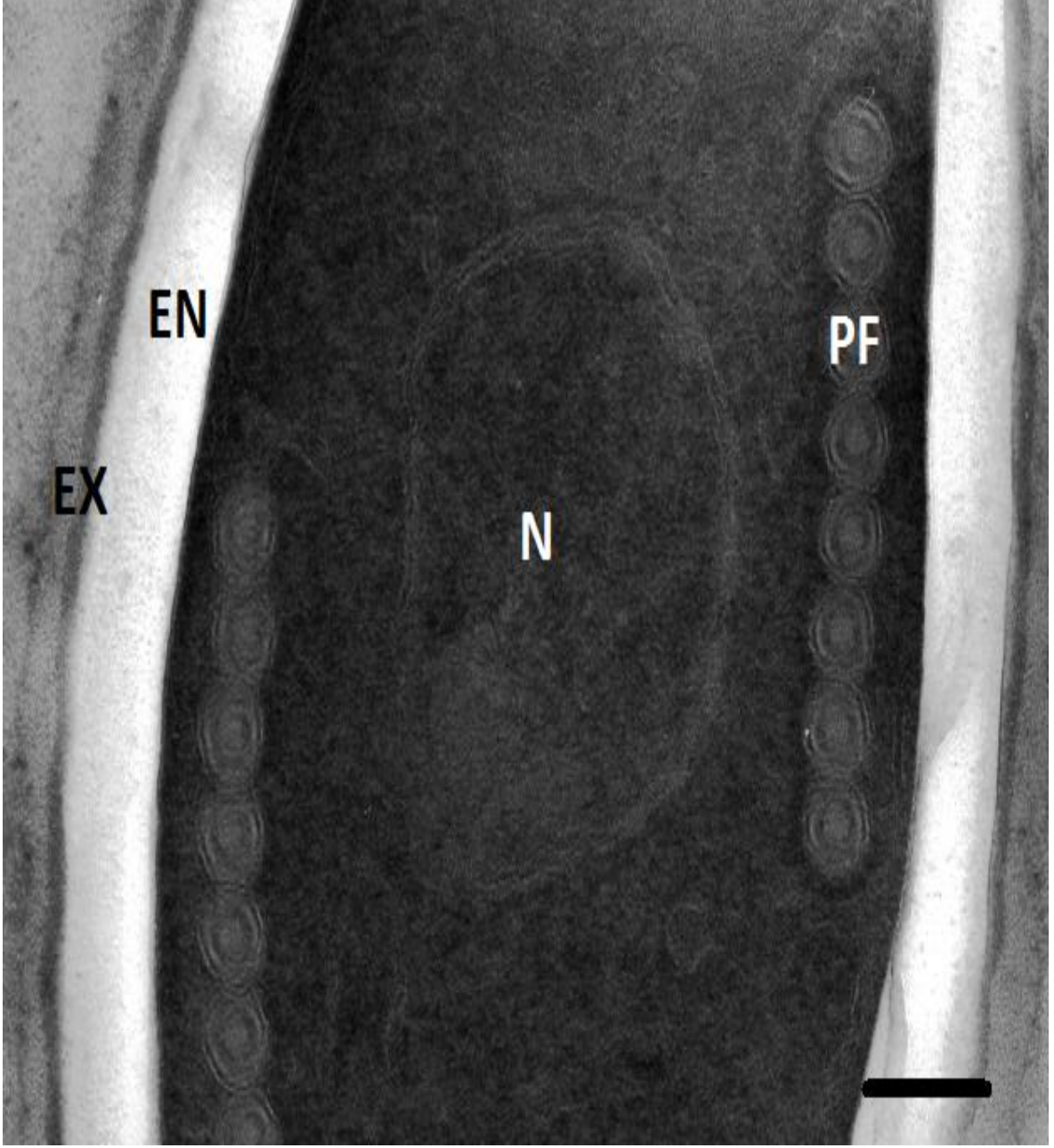
çekirdek sayısı, spor duvar kalınlığı, polar filament sayısı, polar filament çapı, polaroplast şekli, spor büyüklüğü ve hayat döngüsü gibi farklı sistematik karakterler önem arz etmektedir (Larson, 1986).

Ultrastrüktürel çalışmalar serbest oval sporların tek çekirdekli (Şekil 8, 9, 10), monokaryotik olduğunu gösterdi. Çekirdek çapları 300-460 nm olarak belirlendi. Spor duvarı kalınlığı 120-125 nm olarak tespit edildi. Spor duvarı ekzospore ve endospore olmak üzere iki tabakan oluşurken, endospore 80-110 nm, ekzospore ise 25-30 nm olarak belirlendi (Şekil 8, 9).

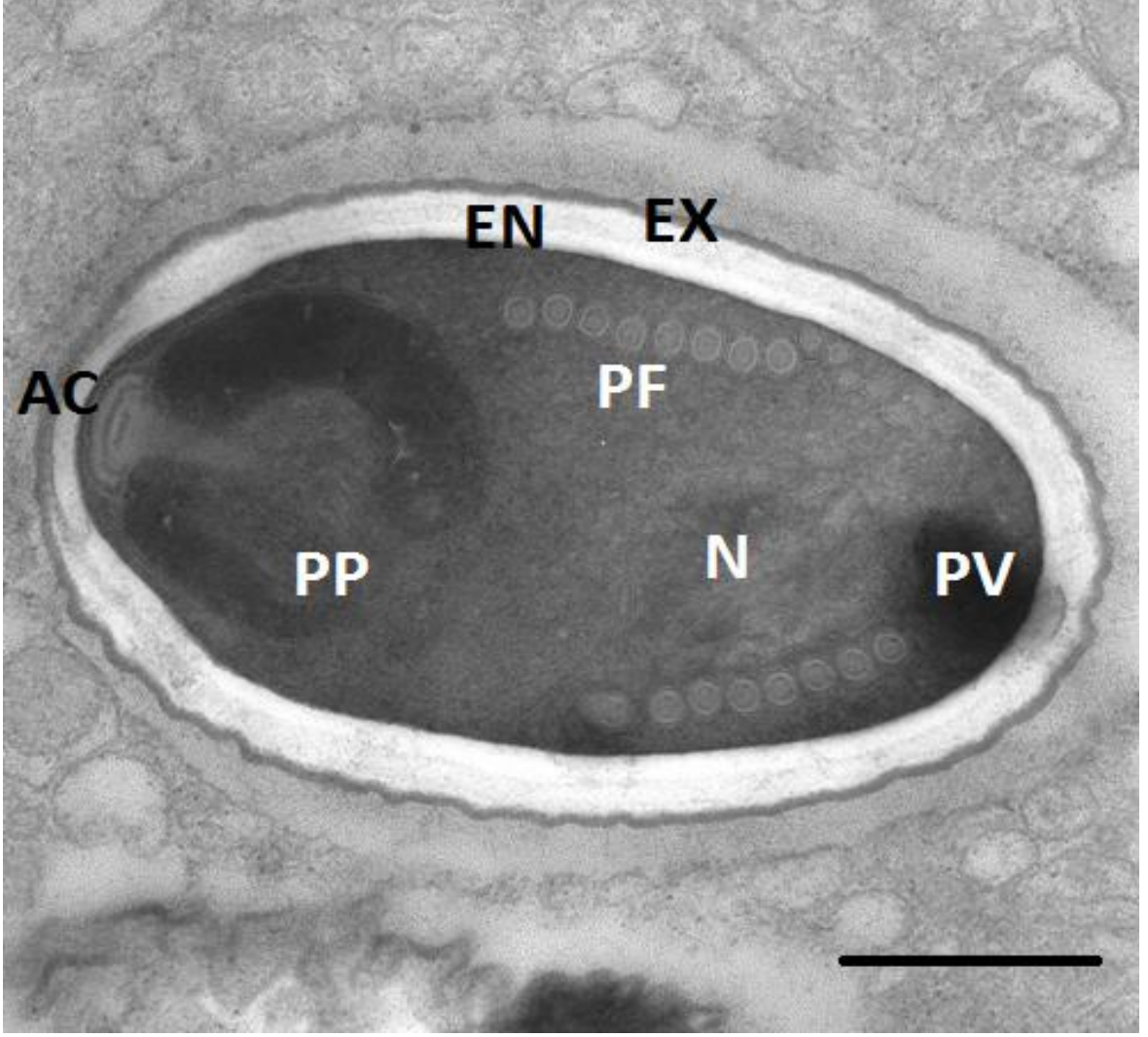
Mikrosporidyum patojeninin polar filamentleri 8 kıvrımlı ve izofilar polar filament tipinde belirlendi (Şekil 8, 9, 10). Polar filament çapı 80-95 nm olarak belirlendi. Patojene ait polaroplastın lamellar tip olduğu ve anteriörde ince ve posteriörde düzensiz kalın lamellar tip polaroplast gözlemlendi (Şekil 11).



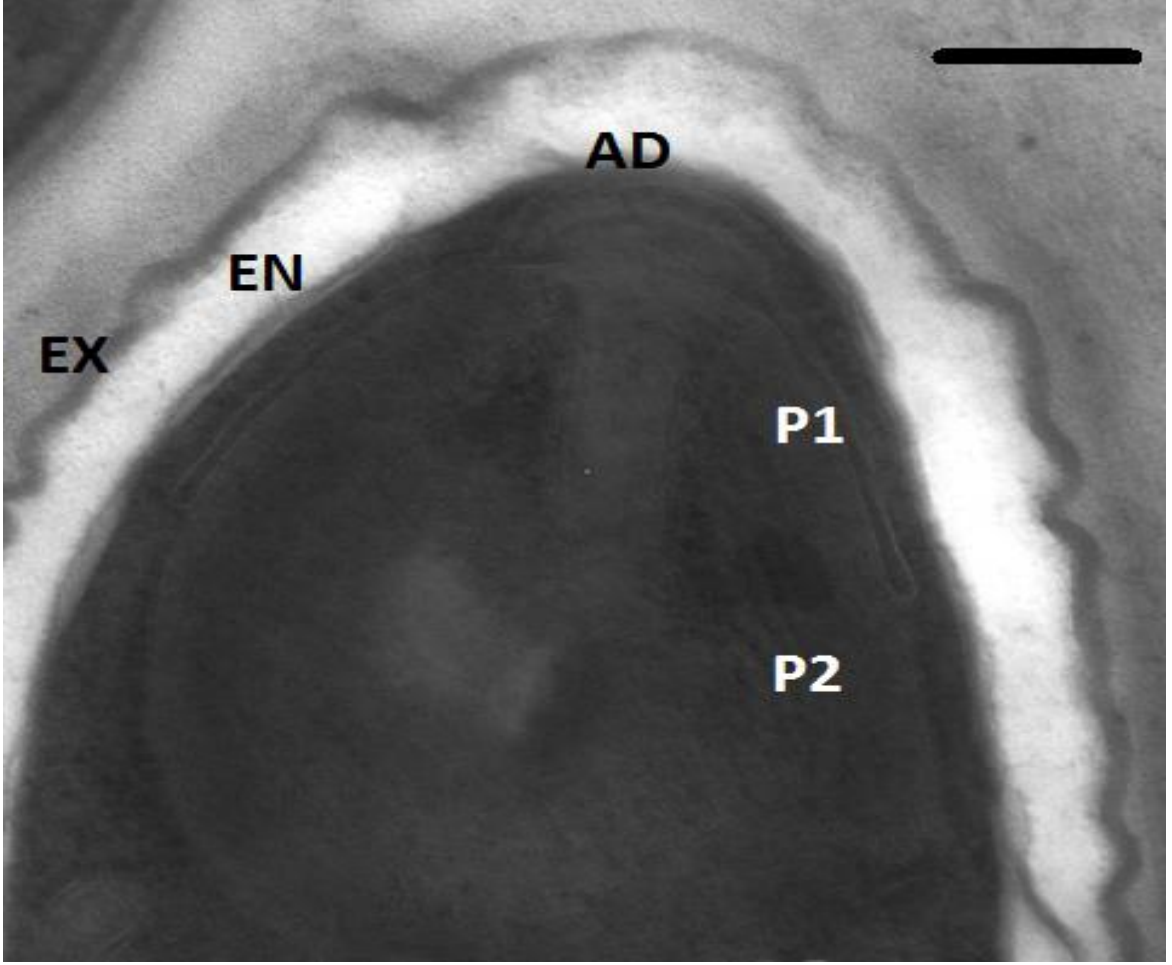
Şekil 8. *C. aurata* 'da tespit edilen mikrospor patojeninin spor duvarı ve polar filamentinin enine kesiti, PF: Polar filament EX: Ekzospor, EN: Endospor, N: Nukleus (Bar: 100nm)



Şekil 9. *C. aurata*'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait hücresel yapı, EX: Ekzospor, EN: Endospor, PF: Polar filament, N: Nukleus, (Bar 100nm)



Şekil 10. *C. aurata*'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait spor, EX: Ekzospor, EN: Endospor, PF: Polar filament, PP: Polaroplast, PV: Posterior vakuol, AC: Anchoring disc, N: Nukleus, (Bar 500nm)



Şekil 11. *C. aurata*'da tespit edilen mikrosporidyum patojenine ait sporun anterioründeki hücresel yapı, EX: Ekzospor, EN: Endospor, P1: İnce lamellar tip polaroplast, P2: Kalın lamellar tip polaroplast, AD: Anchoring disc yapısı, (Bar 200nm)

3.2. *Crepidodera aurata* Populasyonlarında Mikrosporidyum Patojeninin Dağılımı

Araziden elde edilen böcekler toplandıkları hafta içinde disekte edilmiş, ışık mikroskobu altında incelenmiş ve sonuçlar düzenli bir şekilde kaydedilmiştir. Çalışmalar boyunca 1728 ergin, disekte edilmiştir. Disekte edilen erginlerin 78'inde (% 4.51) mikrosporidyum enfeksiyonu tespit edilmiştir. Arazi çalışmalarından elde edilen erginlerdeki enfeksiyon oranı Vezirköprü (Samsun)'de % 5.7, Bekdemir (Kastamonu)'da % 2.8, Irmaksırtı (Çarşamba)'nda % 50.1, Kızılot (Çarşamba)'da %22.3, Havaalanı (Çarşamba)'nda % 19.4, Bursa'da % 3.1, Bolu'da % 4,8'dir. Fidanlık (Kocaeli) ve Çıldır (Akyazı)'dan toplanan erginlerde enfeksiyona rastlanmamıştır (Tablo 2).

2013 yılında Irmaksırtı (Çarşamba)'nda enfeksiyon % 6.6, Kızılot (Çarşamba) % 6.5'dur ve Bekdemir (Kastamonu)'da hiç enfeksiyona rastlanmamıştır. Enfeksiyonun 2014 yılındaki dağılımı oldukça geniştir fakat Irmaksırtı (Çarşamba), Kızılot (Çarşamba), Fidanlık (Kocaeli) ve Bilecik'te farklı tarihlerde toplanan böceklerin bazısında enfeksiyon görülmemiştir. En yüksek enfeksiyon oranı 2013 yılında Irmaksırtı (Çarşamba)'nda % 6.6 iken en düşük enfeksiyon Kızılot (Çarşamba)'da % 6.5'dir. 2014 yılında en yüksek enfeksiyon Irmaksırtı (Çarşamba)'nda % 25, en düşük enfeksiyon Bekdemir (Kastamonu)'da % 0.8'dir.

Tablo 2. Türkiye'de *Crepidodera aurata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populasyonlarında mikrosporidyum patojeninin varlığı

Lokalite	Örneklerin toplandığı tarih	İncelenen böcek sayısı	Enfekte olan böcek sayısı	Enfeksiyon oranı (%)
Vezirköprü (Samsun)	25.04.2014	118	2	1.7
	05.09.2014	40	2	5
Irmaksırtı (Çarşamba)	03.06.2013	30	2	6.6
	23.04.2014	100	9	9
	01.06.2014	84	8	9.5
	28.06.2014	44	11	25
	20.09.2014	20	-	-
	28.06.2014	14	-	-
	27.03.2013	46	3	6.5
Kızılot (Çarşamba)	24.06.2014	118	6	5
	01.06.2014	87	5	5.7
	27.06.2014	39	2	5.1
	06.09.2014	12	-	-
	20.09.2014	2	-	-
	28.06.2014	14	-	-
	24.04.2014	66	6	9.1
Havaalanı (Çarşamba)	01.06.2014	109	4	3.6
	28.06.2014	89	6	6.7
Bekdemir (Kastamonu)	14.04.2013	16	-	-
	26.24.2014	113	1	0.8
	28.06.2014	201	4	2
Fidanlık (Kocaeli)	02.05.2014	71	-	-
Çıldırlar (Akyazı)	03.05.2014	62	-	-
Bilecik	19.05.2014	62	-	-
Bursa	17.05.2014	65	2	3.1
Bolu	16.05.2014	103	5	4.8
Toplam		1728	78	4.51

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, önemli bir kavak zararlısı olan *Crepidodera aurata*'da tespit edilen protist patojeni *Microspora* şubesine ait bir patojendir. Ultrastrüktürel çalışmalar, patojenin polar filament ve polaroplast yapısına sahip olduğunu, bununla birlikte mitokondri içermediğini göstermiştir (Şekil 8, 9, 10). Bu karakterler *Microspora* grubunun temel karakterleri olup sadece bu grup üyelerinde bulunur (Larsson 1986, 1988, 1999; Canning ve Vavra, 2000). Bu nedenle tespit edilen patojenin bir mikrosporidyum olduğu kesindir. Bu mikrosporidyum dünyada *C. aurata*'da tespit edilen ilk ve tek mikrosporidyumdur.

Bu yoğun çalışmada 10 farklı lokaliteden, toplam 1728 *C. aurata* ergini incelenmiş ve bunların 78'inde mikrosporidyum patojeni tespit edilmiştir. Çalışma süresince, *C. aurata* populasyonlarında 2 tip mikrosporidyum gözlemlenmiştir. Bu mikrosporidyumlar spor morfolojisinde önemli ölçüde farklılıklar göstermişlerdir. İlk mikrosporidyum (izolat 1) Vezirköprü bölgesinde tespit edildi. Bu mikrosporidyumun sporu 3.66- 5.66 µm uzunluğunda ve 1.35- 2.22 µm genişliğinde ölçülmüş olup oval şekle sahiptir (n=50). İkinci tip mikrosporidyum (izolat 2) diğer lokalitelerde gözlemlendi. Bu mikrosporidyumun sporu 2.44-3.55 µm uzunluğunda, 1.25- 1.55 µm genişliğinde ölçülmüş olup hafifçe kıvrık bir yapıya sahiptir. Bu güne kadar *C. aurata*'dan hiç mikrosporidyum kaydı yapılmamıştır. Konak seçiciliği mikrosporidyum taksonomisi için geçerli taksonomik karakter olarak kabul edilir (Sprague vd., 1992). Bu tez çalışmasında tespit edilen mikrosporidyum patojenleri *C. aurata*'dan ilk kez kayıt edilmektedir. Diğer taraftan, spor morfolojisi ve boyutu, konak lokalitesi ve enfeksiyon oranları böcekleri enfekte eden mikrosporidyumları ayırmak için kullanılan önemli karakterlerdir (Larsson, 1999; Yaman ve Radek, 2003; Yaman vd., 2008). *C. aurata* populasyonlarında tespit edilen mikrosporidyum patojenleri spor morfolojisi (izolat 1'de oval spor, izolat 2'de hafifçe kıvrık spor), boyutları (izolat 1'de 3.66-5.66 x 1.35-2.22 µm ve izolat 2'de 2.44-3.55 x 1.25-1.55 µm), enfeksiyon yeteneği (izolat 1 % 1.7 'den % 5'e, izolat 2 % 0.8'den % 25'e) ve konak populasyonların lokalitesinde (izolat 1 Vezirköprü'de, izolat 2 incelenen lokalitelerin geri kalanında) birbirlerinden önemli farklılıklar göstermişlerdir. Benzer şekilde 2 yeni mikrosporidyum farklı lokalitelerde *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae)'in populasyonlarından tanımlanmıştır (Yaman ve Radek 2003; Yaman vd,

2008). Yaman vd., (2008) Türkiye'de enfekte olmuş *C. tibialis* populasyonlarında *Nosema tokati* ve *Nosema chaetocnema* arasındaki farklı enfeksiyon oranlarını gözlemlemişlerdir.

Chrysomelidae familyasının üyelerinden rapor edilen farklı mikrosporidyumlar vardır. Sonuçlar bu tezde sunulan mikrosporidyumların Chrysomelidleri enfekte eden mikrosporidialardan konak seçiciliği, konak populasyonu, doku çeşidi, spor boyu ve enfeksiyon oranları açısından farklı olduğunu göstermektedir (Tablo 3).

Tablo 2. Chrysomelidae (Coleoptera) familyasında tanımlanmış microsporidyum türleri

Türler	Spor Boyutu	Enfekte ettiği organ	Konak	Lokalite
<i>Nosema phyllotretae</i> , Weiser, 1961	4.2x2-3 µm	Yağ dokusu	<i>Phyllotreta atra</i> <i>Phyllotreta undulata</i>	İngiltere
<i>Nosema gastroidea</i> , Hostounsky ve Weiser, 1973	3-4.8x 2.5-3 µm	Tam enfeksiyon	<i>Gastrophysa polygoni</i> ve bazı deneysel konaklar	Çekoslovakya
<i>Nosema polygrammae</i> , Hostounsky ve Weiser, 1975	4.8x2.05 µm	Bağırsak	<i>Polygramma undecemlineata</i>	Küba
<i>Nosema equestris</i> , Hostounsky ve Weiser, 1980	4-5x3 µm	Genel enfeksiyon	<i>Gastrophysa viridula</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Çekoslovakya
<i>Nosema couilloudi</i> , Toguebaye ve Marchand, 1984	3.4-4x 1-1.5 µm	Bağırsak	<i>Nisotra</i> sp.	Senegal
<i>Nosema birgii</i> , Toguebaye ve Marchand, 1986	6.2x 3.5 µm	Yumurtalar ve genel enfeksiyon, larva ve ergin böcek	<i>Mesoplatys cincta</i>	Senegal
<i>Nosema nisotrae</i> , Toguebaye ve Marchand, 1989	5.8x 3.1 µm	Genel enfeksiyon	<i>Nisotra</i> sp.	Senegal
<i>Nosema galerucellae</i> , Toguebaye ve bouix, 1989	4.95x2.89 µm	Temel olarak bağırsak, yağ doku, kaslar, trake ve Malpigi tüpleri	<i>Galerucella luteola</i>	Fransa
<i>Nosema chaetocnema</i> , Yaman ve Radek, 2003	3.52x 2.09 µm	Bağırsak, trake, kaslar me malpigi tüpleri	<i>Chaetocnema tibialis</i>	Samsun, Türkiye
<i>Nosema tokati</i> , Yaman ve ark., 2008	3.82x 1.3 µm	Malpigi tüpleri	<i>Chaetocnema tibialis</i>	Tokat, Türkiye
<i>Nosema leptinotarsae</i> , Lipa, 1968	2-5x 1.9-3.3 µm	Hemolenf	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	U.S.S.R
<i>Nosema leptinotarsae</i> , Yaman ve ark., 2011	4.69x2.43 µm	Genel enfeksiyon	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Türkiye
<i>Unikaryon bouixi</i> , Toguebaye ve Marchand, 1983	Oval 1.6-2.5 x 1.5-1.6 µm	Bağırsak ve malpigi tüpleri	<i>Euryope rubra</i>	Senegal
<i>Unikaryon matteii</i> , Toguebaye ve Marchand, 1984	Oval 3.72 x 1.96 µm	Bağırsak, malpigi tüpleri ve kaslar	<i>Nisotra</i> sp.	Senegal
<i>Unikaryon nisotrae</i> , Toguebaye ve Marchand, 1986	Oval 2.33 x 1.66 µm	Bağırsak ve yağ doku	<i>Nisotra sjoestedti</i>	Senegal
<i>Unikaryon phyllotretae</i> , Yaman ve ark., 2010	Yuvarlaktan ovale 3.80 x 1.90 µm	Malpigi tüpleri	<i>Phyllotreta undulata</i>	Türkiye
<i>Microsporidium</i> sp. 1 (Bu tez çalışması)	Oval 3.66- 5.66x 1.35- 2.22 µm	Hemolenf, Bağırsak ve malpigi tüpleri	<i>Crepidodera aurata</i>	Türkiye
<i>Microsporidium</i> sp. 2 (Bu tez çalışması)	Hafifçe kıvrık 2.44-3.55 x 1.25- 1.55 µm	Hemolenf, Bağırsak ve malpigi tüpleri	<i>Crepidodera aurata</i>	Türkiye

C. aurata'dan tespit edilen izolat 2 spor boyutu olarak (3.02 x 1.42 µm) Chrysomelidleri enfekten eden diğer mikrosporidyum türlerinden belirgin bir şekilde farklıdır. Bu nedenle tespit edilen patojenlerden izolat 1 *Microsporidium* sp. 1 olarak, izolat 2'yi ise *Microsporidium* sp. 2 olarak isimlendirildi ve geçici olarak ortak grup olan *Microsporidium* cinsi içine yerleştirildi.

Bu tez çalışmasında çok geniş bir coğrafik alandaki farklı lokalitelerden toplanan *C. aurata* populasyonlarında *Microsporidium* sp. 1 ve *Microsporidium* sp. 2'nin varlığı, karakterizasyonu ve dağılımı çalışılmıştır. İki yıl boyunca toplanan lokalitelerin 10 tanesinin 7'sinde mikrosporidyum enfeksiyonu gözlemlendi (Tablo 1). Yaman (2007) Türkiye'de incelenen 70 *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae)'da sadece 2 tane *Nosema meligethi* enfeksiyonu gözlemledi. Bir diğer çalışmada Yaman (2008) 10 farklı lokalitenin 2'sinde, *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae) erginlerinde *Nosema* enfeksiyonu buldu. Benzer şekilde Aydın vd., (2009) *Phyllotreta atra* (Coleoptera: Chrysomelidae) populasyonlarında *Nosema phyllotretae* enfeksiyonunu 5 lokalitenin sadece 1 tanesinde gözlemledi.

Bu çalışmada birbirlerine yakın olan 3 lokaliteden (Fidanlık (Kocaeli), Akyazı, Bilecik) *C. aurata* populasyonlarında herhangi bir enfeksiyona rastlanmadı. Bu lokaliteler muhtemelen mikrosporidyum patojenlerinin dağılımlarını genişletemediği, izole olmuş alanlar olabilir. Türkiye 777.000 m² alana sahip önemli farklı karakterleri ile Asya ve Avrupa arasında köprü görevi gören bir ülkedir. Türkiye'nin bölgeleri farklı iklimatik alanlardan oluşur ve bu yüzden farklı bitki ve hayvan grupları barınmaktadır (Çevre Bakanlığı, 1992).

Her iki mikrosporidyumun enfeksiyon oranı % 0.8 ile % 25 arasında değişkenlik göstermektedir. Toplam enfeksiyon oranı % 4.51 olarak tespit edilmiştir. Her iki patojeninde enfeksiyon oranı farklı lokaliteler arasında farklılık göstermektedir (Tablo 1). Enfeksiyon oranı bazı bölgelerde % 25'e ulaşmaktadır. Böyle bir enfeksiyon zararlı kontrolünde biyolojik mücadelenin uygulanabilirliğinden dolayı arzu edilen enfeksiyondur. *C. aurata* bir yılda tek jenerasyon geçirir. Böcekler kışı ergin olarak geçirir ve yumurtalarını baharda bırakırlar. Larva yaz boyunca gelişir ve pupaya geçer, sonunda yeni jenerasyon (bu yılın böcekleri) Ağustos ayının sonunda görülmeye başlar (Aslan vd., 1999; Urban, 2011). Bu yüzden *C. aurata* erginleri ve larvaları Nisan ayından Kasım ayına kadar kavak ve söğüt ağaçları üzerinde bulunur ve bu ağaçların yapraklarını yiyerek adeta dalları

iskelete çevirirler. Bu gelişme periyodu boyunca populasyon yoğunluğunu etkileyen her bir faktör büyük öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında tespit edilen mikrosporidyumlar *C. aurata*'dan rapor edilen ilk patojenlerdir. *C. aurata* populasyonlarında iki mikrosporidyum patojeninin tespiti ve dağılımı üzerine olan bu tez çalışması, mikrosporidyum patojenlerinin sabit bir enfeksiyon oranı ile *C. aurata* populasyonlarında yaygın olarak bulunduğunu doğrulamıştır.

5. SONUÇLAR

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

1. Coleoptera takımına ait olan kavak yaprak böceği (*Crepidodera aurata* Col: Chrysomelidae) ile biyolojik mücadelede kullanılmak üzere doğal hastalık etmeni mikrosporidyum patojeninin varlığı araştırılmış ve 2013 - 2014 yılları arasında Türkiye'den 10 farklı lokaliteden toplanan erginlerde bir mikrosporidyum patojenine rastlanmıştır.
2. *C. aurata*'da tespit edilen mikrosporidyumun morfolojik ve ultrastrüktürel özellikleri, ışık mikroskobu, Giemsa boyama ve elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu mikrosporidyumlar, ülkemizde *C. aurata*'da tespit edilen ilk ve tek kayıttır.
3. Giemsa boyama yöntemi ve TEM çalışmaları sonucunda elde edilen hayat döngüsü safhaları ve ultrastrüktürel yapı bulguları tespit edilen patojenin, Coleoptera kaynaklı diğer mikrosporidyum türlerinden farklı olduğunu göstermiştir.
4. Arazi çalışmalarından elde edilen erginlerin diseksiyonu sonucunda izolat 1; % 1.7'den % 5'e, izolat 2; % 0.8'den % 25'e kadar enfeksiyon oranı tespit edilmiştir.
5. Mikrosporidyum patojeninin konak spesifitesinin yüksek olması, doğal hastalık oluşturup çevreye ve diğer canlılara zarar vermeden, ekolojik dengeyi koruyarak yalnızca hedef zararlı popülasyon yoğunluğunu azaltması bu zararluya karşı biyolojik mücadelede ümit vaat etmektedir.
6. Bu tez çalışmasında tanımlanan mikrosporidyum patojeni, dünyada *Crepidodera aurata*'da tespit edilen ilk mikrosporidyum olması bakımından büyük önem arz etmektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışması ile Türkiye için ilk kez kavak yaprak böceği, *Crepidodera aurata* (Marsh.)'da doğal hastalık oluşturan bir mikrosporidyum patojeni tespit edilmekte, karakterizasyonu ve varlığı açıklanmaktadır.

6. ÖNERİLER

Dünyada ve ülkemizde kavak zararlılarıyla mücadele yaygın olarak 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. Sadece kontrol altına alınması ve etkisinin azaltılması gereken zararlıya etki eden, kalıntı ve direnç geliştirme sorunu gibi olumsuzluklar barındırmayan, insan sağlığı, argoekosistem, çevre ve biyolojik dengenin korunarak sürdürülmesini sağlayan biyolojik mücadele yöntemi, tercih edilmesi gereken yöntemlerin başında gelir. Bu yüksek lisans tez çalışması sırasında tespit edilen mikrosporidyum patojeni, ülkemiz ve çeşitli dünya ülkeleri için önemli bir odun ham maddesi kaynağı olan kavak ağacında çok ciddi zararlara neden olan kavak yaprak böceği *Crepidodera aurata* ile mücadelede kimyasal mücadeleye alternatif olarak sunulabilir. Bu amaçla kullanımına yönelik çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. Söz konusu patojenin kullanılmasıyla hem zararlı ile biyolojik mücadele gerçekleştirilmiş hem de kimyasal ilaçların çevreye ve canlılara verdiği zararlı etkilerin de önüne geçilmiş olacaktır. Patojenin larva gelişimine, beslenmeye ve yumurta bırakma gibi faaliyetlerine etkisi araştırılmalıdır. Ayrıca, bu tezde cins seviyesine kadar tanımlanan patojenin ileri çalışmalar ile tür seviyesinde tanımlanması yapılmalıdır. Zararlının larva ve ergin formlarına bioassay deneyleri yapılarak söz konusu mikrosporidyum patojeninin patojenitesi ve konak üzerinde meydana getirdiği semptomlar tespit edilmelidir. Patojenin hem vertikal hem horizontal bulaşma potansiyelleri araştırılabilir. Aynı zamanda bu patojenin Chrysomelidae familyasına ait diğer türlerde enfeksiyon gerçekleştirip gerçekleştirmediği de çalışılabilecek 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 kavak zararlılarıyla mücadelede yeni patojenik ajanların tespiti mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

- Anonim, 1981. Ulu Önder Atatürk'ün 100. Doğum Yıldönümünde Türkiye'de Kavak ve Kavakçılık. Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü, s.232, İzmit.
- Anonim, 1994. Türkiyede Kavakçılık. T.C. Orman Bakanlığı Kavak ve Hızlı Gelişen Tür Orman Ağaçları Araştırma Müdürlüğü, 122.
- Anonim, 2012. National Poplar Commission of Turkey (PERIOD: 2008 – 2012)
- Anonim, 2014. T.C Orman Genel Müdürlüğü, Niğde Orman İşletme Müdürlüğü StratejikPlan (2015–2019), 44.
- Aktaş, H. ve Şimşek, Z., 2010. Orta Anadolu Bölgesi'nde *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr. ile Önemli Kavak Delici Böcekleri [*Melanophila picta* (Pall.), *Paranthrene tabaniformis* (Rott.)]'nin Yaygınlık ve Zarar Durumları, Türkiye Entomoloji Dergisi, 34, 1, 117–130.
- Aktaş, H., Şimşek, Z. ve Kondur, Y., 2008. İç Anadolu Bölgesi'nde Kavaklarda Kurumalara Neden Olan *Cytospora chrysosperma* "Pers." Fr.'nin Morfolojik Özellikleri, Zarar Durumu ve *Paranthrene tabaniformis* (Rott.) (Lepidoptera: Sesiidae) Arasındaki İlişkiler. Bitki Koruma Bülteni, 48, 3, 1 – 14.
- Aslan, İ., Gruev, B. ve Özbek, H., 1999. A Preliminary Review of The Subfamily Alticinae (Coleoptera: Chrysomelidae) in Turkey. Turkish Journal of Zoology, 23, 373–414.
- Aydın, Ç., Yaman, M. ve Tosun, O., 2009. Distribution of *Nosema phyllotretae* (Microspora: Nosematidae) Weiser, 1961 in Populations of *Phyllotreta atra* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Turkey. Türkiye Parazitol. Derg., 3, 165-168.
- Becnel, J.J. ve Andreadis, T.G., 1999. Microsporidia in İnsects. In: Witter, M, Weiss, L.M. (eds), The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology Press, 447–501.
- Birler, A.S., 1995. Ormanlarımızın Korunması İçin Endüstriyel Plantasyonların Önemi, TEMA Vakfı Yayınları, İzmit, 28.
- Canning, E.U. ve Lom, J., 1986. The Microsporidia of Vertebrates. Academic Press, London.
- Canning, E.,U. ve Vavra, J., 2000. Phylum Microsporida. In: (Eds. J.J. Lee, G.F. Leedale and P. Bradbury), The Illustrated Guide to The Protozoa, Allen Press Inc., Lawrence, 39-126.
- Corradi, N. ve Keeling, P.J., 2009. Microsporidia: A Journey Through Radical Taxonomical Revisions. Fungal Biology Reviews, 23, 1-8.

- Current, W.L. ve Owen, R.L., 1989. Cryptosporidiosis AMD microsporidiosis In: Enteric Infection. Mechanisms, Manifestations and Management, 11th Ed. Farthing, M.J.G. ve Keusch, G.T. (eds), London: Chapman and Hall; 203–7.
- Çevre Bakanlığı, 1992. Turkey's Importance in The World of Living Things. Bersay Yayıncılık İstanbul.
- Durkaya, A. ve Aytekin, A., 2000. Endüstriyel Plantasyonların Planlanmasına Yönelik Bir Paket Program : Endplan. Bartık Orman Fakültesi Dergisi, 1-2, 107-123.
- Ecevit, O., 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Franzen, C. ve Muller, A., 1999. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. Clin Microbiol Rev. 12, 243–85.
- Franzen, C. ve Muller, A., 2001. Microsporidiosis: Human Diseases and Diagnosis. Microbes Infect, 3, 389–400.
- Garcia, L.S., 2002. Laboratory Identification of Microsporidia, J Clin Microbiol, 40, 1892-1901.
- Hazard, E.I., Fukuda, T. ve Becnel, J.J., 1984. Life Cycle of *Culicosporella lunata* (Hazard ve Savage, 1970) Weiser, 1977 (Microspora) as Revealed in the Light Microscope With a Redescription of the Genus and Species, J. Protozool., 31, 385-391.
- Hazard, E.I., Fukuda, T. ve Becnel, J.J., 1985. Gametogenesis and Plasmogamy in Certain Species of Microspora, J. Invertebr. Pathol., 46, 63-69.
- Hostounský, Z. ve Weiser, J., 1973. *Nosema gastroideae* sp. n. (Nosematidae, Microsporidia) infecting *Gastrophysa polygoni* and *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Acta Ent. Bohemoslov. 70, 345-350.
- Hostounský, Z. ve Weiser, J., 1975. *Nosema polygrammae* sp.n. and *Plistophora fidelis* sp. n. (Microsporidia, Nosematidae) Infecting *Polygramma undecimlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Cuba. Věst. Čs. Spol. zool. 39, 104-110.
- Hostounský, Z. ve Weiser, J., 1980. A Microsporidian Infection in *Otiorrhynchus equestris* (Coleoptera, Curculionidae) in Cuba. Věst. Čs. Spol. zool. 44, 160-165.
- Hylis, M., Weiser J., Oborník, M., J. ve Vavra, J., 2005. DNA Isolation From Museum and Type Collection Slides of Microsporidia. Journal of Invertebrate Pathology, 88, 257–260.
- Kahraman, T., 2013. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Çölleşme ve Erozyonla Mücadele Genel Müdürlüğü Araştırma Projesi "Kuraklık ve Ekstrem Şartlara Dayanıklı Türlerin Tespiti ve Adaptasyonu Projesi (Kavak Türleri Örneği)", s.32.
- Kanat, M., 2000. Kahramanmaraş Yöresinde Kavak Ağaçlarında Saptanan Bazı Böcek Türleri. Türkiye 4. Entomoloji Kongresi, Eylül, Aydın.

- 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. Archiv für Protistenkunde, 136, 1-37.
- Larsson, J. I. R., 1999. Identification of Microsporidia, Acta Protozool, 38, 161–197.
- Öner, N. ve Aslan, S., 2002. Titrek Kavak (*Populus tremula* L.) Odununun Teknolojik Özellikleri ve Kullanım Yerleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 135-146.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I. 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. Critical Reviews in Microbiology. 18, 285-395.
- Şimşek, Z., 2005. Kızılırmak (Çankırı)'ta Sarılekeli Kavak Süslüböceği [*Melanophila picta* (Pall.) (Coleoptera: Buprestidae)]'nin Biyolojisi ve Mücadelesi, ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 7, 8, 8–17.
- Toper Kaygın, A. ve Yıldız, Y. A. 2007. Threatening Species for Willows and Poplars in Bartın: *Crepidodera aurata* (Marsh.) (Coleoptera, Chrysomelidae). Proceedings of the Second Plant Protection Congress of Turkey, Isparta, 238.
- Toguebaye, B. S. ve Marchand, B., 1984. *Nosema couilloudi* n.sp., Microsporidie Parasite De *Nisotra* sp. (Coleoptera, Chrysomelidae): Cytopathologie Et Ultrastructure Des Stades De Developpement. Protistologica 20, 357-365.
- 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. ve Marchand, B., 1989. Observations en microscopie electronique a transmission des stades de developpement de *Nosema nisotrae* sp.n. (Microsporida, Nosematidae) parasite de *Nisotra* sp. (Coleoptera, Chrysomelidae). Arch. Protistenkd. 137, 69-80.
- 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.
- Tozlu, G., 2001. Sarıkamış (Kars)'ta Titrek Kavak (*Populus tremula* L.)'ta Zarar Yapan Böcek Türlerinin Tespiti ve Bunlardan Bazı Önemli Türlerin Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. Türkiye Entomoloji Dergisi, 25, 2, 133–146.
- Urban, J., 2011. Occurrence, Bionomics and Harmfulness of *Crepidodera aurata* (Marsh.) (Coleoptera: Alticidae). Acta univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun., 59, 263–278.
- URL–1 <http://deepknowladge.blogspot.com.tr/2015/01/endustriyelormanagaclaandirmalari.html>, 2015
- URL–2 <http://www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Tebliğler/Orman%20Zararlı%20B1lar%20B1%20%20%20M%20%20C3%20%20Cadele%20Esaslar%20B1.pdf>, 2015

URL- 3 <http://insectoid.info/beetles/leaf-beetle/willow-flea-beetle>, 2015

URL-4 <http://www.commanster.eu/commanster/Insects/Beetles/SpBeetles/Crepidodera>
.aurata.html, 2015

URL-5 <http://cmr.asm.org/content/12/2/243/F1.expansion.html>, 2015

Vavra, J., 1976a. Structure of Microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr. ve Cheng, T.C. (eds), Comparative Pathobiology. Plenum Press, New York and London, 1, 87–109.

Vavra, J., 1976b. Development of Microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr. ve Cheng, T.C, eds., Comparative Pathobiology. Plenum Press, New York and London, 1, 87–109.

Vossbrinck, C. R. D. ve Vossbrinck, B.A., 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, Ultrastructural and Taxonomic Considerations. Folia Parasitol, 52, 131–142.

Weiser, J., 1961. Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Monogr. Angew. Entomol. 17, 1-149.

Weiss, L.M. ve Vossbrinck, C.R., 1998. Microsporidiosis: Molecular and Diagnostic Aspects. Adv. Parasitol, 40, 351–395.

Yaman, M., 2011. Türkiye’de Orman Zararlıları İle Biyolojik Mücadelede Entomopatojenlerin Yeri, Türkiye 1. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, Bildiriler Kitabı: Kasım, 2011, 104.

Yaman, M., 2007. Distribution of *Nosema meligethi* I. & R. (Microsporida) in Populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) in Turkey. Entomological Research, 37, 298–301.

Yaman, M. ve Radek, R., 2003. *Nosema chaetocnema* sp. n., a microsporidian (Microspora: Nosematidae) Parasite of *Chaetocnema tibialis* (Chrysomelidae: Coleoptera). Acta Protozool., 42, 231–237.

Yaman M., Radek, R. ve Toguebaye, B., 2008. A New Microsporidian of Genus *Nosema*, Parasite of *Chaetocnema tibialis* (Coleoptera: Chrysomelidae) from Turkey. Acta Protozoologica, 47, 279–285.

Yaman, M., Radek, R., Weiser, J. ve Toguebaye, B. 2010. *Unikaryon phyllotretae* sp. n. (Protista, Microspora), A New Microsporidian Pathogen of *Phyllotreta undulata* (Coleoptera; Chrysomelidae). European Journal of Protistology, 46, 10-15.

Yaman, M., Radek, R., Linde, A., Özcan, N. ve Lipa, J.J., 2011a. Ultrastructure, Characteristic Features and Occurrence of *Nosema leptinotarsae* Lipa 1968, a Microsporidian Pathogen of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Acta Parasitol. 56, 1-7.

- Yaman, M., Tosun, O., Lipa, J. J. ve Aslan, İ., 2011b. The First Records of A Gregarine Pathogen and A Mermithid Parasite from *Chrysolina fastuosa* (Scopoli 1763) (Coleoptera: Chrysomelidae). North-Western Journal of Zoology, 7, 105-111.
- Zeki, H. ve Toros, C., 1996. *Chrysomela populi* L. ve *Chrysomela tremulae* F. (Col.:Chrysomelidae) Erginlerine Konukçunun Etkisi, Bitki Koruma Bülteni, 36, 1-2, 25 – 38
- Zengin, M., 1998. Farklı Meşcereler Altındaki Ölü Örtü ve Toprakların Bazı Hidro-Fiziksel Özellikleri. Orman Bakanlığı Yayın No: 058, Müdürlük Yayın No: 219. T. C. Orman Bakanlığı Kavak ve Hızlı Gelişen Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmit, 72.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İnkılap İlköğretim Okulunda; Liseyi Polatlı Lisesinde tamamladı. 2006 - 2007 öğretim yılında Trabzon, Karadeniz Teknik üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitime başladı. 2011 yılında başarı ile mezun oldu. 2012-2013 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.