

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARAAĞAÇ YAPRAK BÖCEĞİ (*XANTHOGALERUCA LUTEOLA* MULLER;  
COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)' NDE YENİ BİR MICROSPORIDIA  
(PROTISTA) CİNSİNİN KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Çağrı BEKİRCAN**

**MAYIS 2018  
TRABZON**



**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

Biyoloji Anabilim Dalında  
Çağrı BEKİRCAN Tarafından Hazırlanan

KARAAĞAÇ YAPRAK BÖCEĞİ (*XANTHOGALERUCA LUTEOLA* MULLER;  
COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)'NDE YENİ BİR MICROSPORIDIA  
(PROTISTA) CİNSİNİN KARAKTERİZASYONU

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 08 /05/2018 gün ve 1752 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
DOKTORA TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mehmet Cemal OĞUZ

Üye : Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL

Üye : Prof. Dr. Kenan YAZICI

Üye : Doç. Dr. Serkan GÜL

Üye : Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ

C. Oğuz  
Ufuk  
Kenan  
Serkan  
Kadriye

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

“Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola* Muller; Coleoptera: Chrysomelidae)’ nde Yeni Bir Microsporidia (Protista) Cinsinin Karakterizasyonu” adlı bu doktora tezi gerek dünya gerekse ülkemizde karaağaç (*Ulmus*) türleri üzerinde büyük zararlara neden olan Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola* Muller)’nin biyolojik mücadelesinde kullanılma potansiyeline sahip yeni bir mikrosporidium cinsi ve tip türünün karakterizasyonu üzerine önemli bilgiler sunmaktadır.

Doktora çalışmalarımın yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL’ e, sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışması süresince yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım ve değerli hocalarım; Mustafa CÜCE, Mutlu GÜLTEPE ve Halil İbrahim GÜLER’e, ayrıca bu tezin hazırlanması ve yazımı sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan değerli tez izleme kurulu üyeleri Prof. Dr. Kenan YAZICI ve Doç. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’ a teşekkür ederim. Yine tez savunma jürimde yer alan değerli deneyim ve yorumlarını benimle paylaşan, davetimizi kırmayıp tez savunma günümde bizimle birlikte olup tez savunmama iştirak eden çok değerli hocalarım başta Prof. Dr. Mehmet Cemal OĞUZ ve Doç. Dr. Serkan GÜL hocalarıma teşekkürü bir borç bilir ve minnettarlığımı sunarım.

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

Çağrı BEKİRCAN  
Trabzon 2018

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum ‘‘Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola* Muller; Coleoptera: Chrysomelidae)’nde Yeni Bir Microsporidia (Protista) Cinsinin Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL’n 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 24/05/2018.

ağrı BEKİRCAN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK 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>Xanthogaleruca luteola</i> Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) (Karaağaç Yaprak Böceği).....	3
1.2.1. Biyolojisi.....	3
1.2.2. Zarar Şekli ve Yayılışı .....	6
1.2.3. Mücadele Yöntemleri ve Doğal Düşmanları .....	7
1.3. Microsporidia.....	10
1.4. Tezin Amacı.....	11
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	12
2.1. Örneklerin Elde Edilmesi İçin Yapılan Arazi Çalışmaları.....	12
2.2. Mikroskopik Çalışmalar.....	13
2.2.1. Işık Mikroskopu Çalışmaları.....	13
2.2.1.1. Giemsa Boyama .....	14
2.2.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları.....	14
2.2.2.1. Resine Gömme İşlemi ve Elektron Mikroskobu Çalışmaları .....	15
2.2.3. Moleküler Çalışmalar.....	15
2.2.3.1. DNA İzolasyonu ve 16S SSU rRNA Geni Amplifikasyonu.....	16

2.2.3.2.	PZR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması .....	17
2.2.3.2.1.	<i>E. coli</i> JM101 'e Transformasyon.....	17
2.2.3.2.2.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu .....	18
2.2.4.	Bioassay Çalışmaları.....	18
2.2.5.	İklim Verilerinin Tespit Edilen Mikrospor Enfeksiyonu Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik İstatistiksel Analizler .....	19
3.	BULGULAR.....	20
3.1.	<i>Xanthogaleruca luteola</i> (Müller, 1766) Örneklerinin Temini İçin Yapılan Arazi Çalışmaları.....	20
3.2.	<i>Xanthogaleruca luteola</i> Müller' de Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi.....	21
3.2.1.	Mikrospor Enfeksiyonunun Makroskopik Görünümü.....	22
3.2.2.	Mikrospor Enfeksiyonunun Mikroskopik Olarak Belirlenmesi.....	22
3.2.2.1.	Işık Mikroskobu Çalışmaları ile Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi .....	23
3.2.2.2.	Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi .....	27
3.3.	<i>X. luteola</i> Müller' de Tespit Edilen Mikrospor Patojeni Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar .....	30
3.4.	<i>X. luteola</i> ' da Belirlenen Mikrospor Etmeni Kullanılarak Yapılan Biyoassay Deneyleri .....	34
3.5.	İklim Verilerinin Tespit Edilen Mikrospor Enfeksiyonu Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik İstatistiksel Analizler .....	36
4.	TARTIŞMA .....	42
5.	SONUÇLAR.....	56
6.	ÖNERİLER.....	58
7.	KAYNAKLAR .....	59
8.	EKLER.....	65

## ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

KARAAĞAÇ YAPRAK BÖCEĞİ (*XANTHOGALERUCA LUTEOLA* MULLER;  
COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)'NDE YENİ BİR MİKROSPORİDİA  
(PROTİSTA) CİNSİNİN KARAKTERİZASYONU

Çağrı BEKİRCAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL  
2017, 64 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Bu doktora tezinde; dünyada ve ülkemizde karaağaç türleri (*Ulmus* sp.) üzerinde önemli derecede zarar meydana getiren Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola* Muller; Coleoptera: Chrysomelidae)'nde doğal olarak enfeksiyona neden olan yeni bir mikrosporidium cinsinin ve tip türünün karakterizasyonu yapılmıştır. 2014 ve 2015 yılları boyunca Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerini temsil eden 5 ilde yapılan arazi çalışmaları ile farklı gelişim dönemlerindeki 3217 adet *X. luteola* bireyi toplanmış ve enfeksiyon tespiti için laboratuvar ortamında diseksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İstanbul ilinde yapılan arazi çalışmaları sonucu toplanan *X. luteola* bireylerinde mikrospor enfeksiyonu tespit edilmiştir. Böceklerin disekte edilmesi ile hazırlanan taze preparatlarda patojenin boyu  $4,25 \pm 0,52$  (3,3–6,35; n = 500)  $\mu\text{m}$ , eni ise  $2,12 \pm 0,25$  (1,45–2,91; n = 500)  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Enfeksiyonun konağın yalnızca bağırsak dokusunda geliştiği görülmüş ve yapılan Giemsa çalışmaları ile patojenin hayat safhaları tespit edilmiştir. Elektron mikroskopisi (TEM) ile patojenin ultrastrüktürel yapısı belirlenmiştir. Spor safhası üzerinde yapılan ultrastrüktürel incelemeler sonucunda patojenin; monokaryotik olduğu, polarfilament sayısının 11, spor duvarı kalınlığının 75-115 nm ve polar filament çapının 67-79 nm olduğu tespit edildi. Ultrastrüktürel karakterler bu patojenin, bilinen mikrosporidium cinslerinden farklı yeni bir cins olduğunu göstermektedir. Yapılan moleküler çalışmaların sonuçları da elektron mikroskopisi sonuçlarını desteklemektedir. Sonuç olarak bu doktora çalışması ile *X. luteola* bireylerinde tespit edilen bu patojenin bu çalışma ile tanımlanan *Rugispora* cinsinden *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp. olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Xanthogaleruca luteola*, Mikrosporidium, *Rugispora istanbulensis*, Karakterizasyon, Entomopatojen



PhD. Thesis

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF NEW MICROSPORIDIA (PROTISTA) GENUS FROM  
ELM LEAF BEETLE (*XANTHOGALERUCA LUTEOLA* MULLER; COLEOPTERA:  
CHRYSOMELIDAE)

Çağrı BEKİRCAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Ufuk BÜLBÜL  
2017, 64 Pages, 2 Appendix Pages

In this PhD thesis; characterization of a new microsporidium genus and type species of naturally occurring infection was carried out in the elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola* Muller; Coleoptera: Chrysomelidae), which has caused considerable damage to the species of elm (*Ulmus*) in the world and in our country. During the period of 2014-2015, 3217 *X. luteola* individuals in different developmental periods were collected by field studies in 5 provinces representing different geographical regions of Turkey and dissection was performed in the laboratory for infection detection. Microspore infection was detected in the *X. luteola* individuals collected after the field studies done in İstanbul province. Pathogen dimensions were measured as  $4.25 \pm 0.52$  (3.3–6.35; n = 500) x  $2.12 \pm 0.25$  (1.45–2.91; n = 500) in fresh preparations of dissected larvae. Infection was found only in the intestine 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 monokaryotic and it has 11 polar filament coils, 75 – 115 nm spore wall thickness and 67 – 79 nm polar filament dimension. Ultrastructural characters indicate that this pathogen is a new genus that is different from known microsporidium genera. The results of the molecular studies carried out also support the results of electron microscopy. In conclusion, we decided to assign a new genus (*Rugispora*) of microsporidia for this new species from the elm leaf beetle, *X. luteola*. The pathogen is herein named as *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp.

**Key Words:** *Xanthogaleruca luteola*, Microsporidium, *Rugispora istanbulensis*,  
Characterization, Entomopathogen

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	<i>Xanthogaleruca luteola</i> ' ya ait ergin, yumurta, larva ve pupa safhaları.....	4
Şekil 2.	<i>Xanthogaleruca luteola</i> 'ya ait hayat safhaları ve hayat döngüsü.....	5
Şekil 3.	Karaağaç yaprak böceğinin ergin ve larva dönemlerinde karaağaç yaprakları üzerinde yapmış olduğu zarar şekilleri.....	6
Şekil 4.	2014 ve 2015 yıllarının Mayıs – Eylül aylarında yapılan arazi çalışmalarının yürütüldüğü iller.....	13
Şekil 5.	Mikrospor sporları ile enfekte olmuş <i>X. luteola</i> bağırsağı.....	23
Şekil 6.	Giemsa boyalı böcek dokusu, mikrospor sporları ve çeşitli hayat safhaları.....	24
Şekil 7.	Mikrospor hayat döngüsünün karakteristik meront safhası.....	25
Şekil 8.	<i>X. luteola</i> ' da tespit edilen mikrospor patojenine ait sporont safhası .....	26
Şekil 9.	<i>X. luteola</i> ' da tespit edilen mikrospor patojenine ait diplokaryotik sporoblast safhası.....	27
Şekil 10.	<i>X. luteola</i> ' da tespit edilen mikrospor sporları.....	28
Şekil 11.	<i>X. luteola</i> ' da tespit edilen mikrospora ait olgun spor ve vejetatif safhalara ait TEM fotoğrafları .....	29
Şekil 12.	<i>X. luteola</i> ' da belirlenen mikrospor patojenine ait 16S SSU rRNA bölgesinin agaroz jel görüntüsü .....	31
Şekil 13.	PAUP programı ile yapılmış MaximumLikelihood analizi.....	33
Şekil 14.	Biyoassay çalışmalarında larvaların doza göre ölüm yüzdeleri.....	36
Şekil 15.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun yıllara göre rastlanma sıklığı .....	37
Şekil 16.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun aylara göre rastlanma sıklığı .....	38
Şekil 17.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun yağış değişkenine göre rastlanma sıklığı .....	39
Şekil 18.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun sıcaklık değişkenine göre rastlanma sıklığı .....	40
Şekil 19.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun nem değişkenine göre rastlanma sıklığı.....	40

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.	Günümüzde Karaağaç yaprak böceği ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitler .....	8
Tablo 2.	Karaağaç yaprak böceği mücadelesinde kullanılan ve kullanım potansiyeline sahip organizmalar .....	9
Tablo 3.	pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar .....	17
Tablo 4.	2014 ve 2015 yıllarının Mayıs – Eylül aylarında yapılan arazi çalışmaları, aylara ve yıllara bağlı toplanan örnek sayıları.....	21
Tablo 5.	Filogenetik analizlerde kullanılan 16S SSU rRNA baz dizileri .....	32
Tablo 6.	Biyoassay çalışmalarında larvaların doza göre ölüm zamanları ve yüzdeleri.....	35
Tablo 7.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen ortalama mikrospor enfeksiyon değerleri.....	36
Tablo 8.	Mikrospor enfeksiyonu ve iklim verileri arasındaki ilişkiye dönük yapılan Spearman korelasyon testi sonuçları.....	41
Tablo 9.	Bu çalışmada tespit edilen mikrospor ve <i>Nosema galerucellae</i> 'nin taksonomik karakterlerinin karşılaştırması .....	44
Tablo 10.	Bu tez çalışması ile tespit edilen mikrospor ve Coleoptera takımına ait böceklerde tanımlanmış diğer mikrospor türlerinin taksonomik karakterlerinin karşılaştırması.....	48
Tablo 11.	Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor ve filogenetik analizlerde kullanılan diğer mikrospor kayıtlarına ait G+C, benzerlik, örtüşme ve Kimura-2 parametresine göre baz farklılık değerleri .....	50

## SEMBOLLER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
ERL	Epoxy resin
M	Molar
ml	mililitre
mm	milimetre
OsO <sub>4</sub>	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
OD	Optik yoğunluk
ddH <sub>2</sub> O	İki kez distile edilmiş su

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Karaağaçlar (*Ulmus* spp.; Ulmaceae: Angiosperm), kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde ve tropik Asya'nın dağlık bölgelerinde yayılış göstermektedir. Cins düzeyinde bu grupta dünya genelinde 20 tür bulunmaktadır (Yıldız ve Aktoklu, 2010). Karaağaçlar genellikle 30-40 m boyunda ve yaklaşık 1 metre gövde çapına sahip olup, 200 yıl kadar yaşarlar. Islak ve ağır topraklarda yetişen bu ağaç türleri, ayrıca suya da oldukça dayanıklıdırlar (Türkmen, 2006).

Ülkemizde genellikle 1500 m'nin üzerinde karışık yaprak döken ormanların oluşumuna katılan 3 türü bulunmaktadır. *Ulmus glabra* Hudson, tohumu samaranın ortasındadır ve genelde Kuzey Anadolu'da bulunsa da seyrek olarak Orta ve Doğu Anadolu'da da görülür. *Ulmus minor* Miller, tohumu samaranın üst kısmındadır. Ülkemizde iki alttürü bulunan bu türün; *minor* alt türü Kuzey Anadolu'da, *canescens* alt türü ise Batı ve Güney Anadolu'da yayılım göstermektedir. *Ulmus laevis* Palas, samaranın silli olması ile karakteristiktir ve Kuzeybatı Anadolu'da yayılım gösterir (Seçmen vd., 2008).

Orman oluşturma yetenekleri kısıtlı olan karaağaçlar kuvvetli yapılarından dolayı rüzgâr kıran olarak park ve bahçelerin tesisinde ve şehir peyzajında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pamay, 1992). Bu nedenle şehir ağaçları içerisinde önemli bir yere sahiptirler. Ayrıca karaağaçların insan yaşamında ekonomik kullanımları da oldukça yaygındır. Karaağaçtan elde edilen kereste çok sağlam ve değerli olup, mobilya, parke, sepet ve kağıt yapımında da kullanılmaktadır (Türkmen, 2006). Yine karaağaçların bazı türlerinin halk arasında tedavi amaçlı kullanımı oldukça yaygındır. *Ulmus minor* Miller türü, kan ve ishal dindirici olarak kullanımının yanı sıra belsoğukluğu, rahim kanaması, mesane iltihabı (sistit) ve rahim iltihabı (metriti) tedavisinde alternatif olarak kullanılmaktadır. Bir diğer tedavi amaçlı kullanımı ise karaağaç yapraklarının haşlanarak mide, bağırsak ağrıları ve sivilcelere karşı kullanımudur (Seçmen vd., 2008). Yine karaağacın bir türünün (*U. rubra* Muhl.) kabuğunun iç kısmından elde edilen sekonder metabolit, tıpta ülser tedavisinde kullanılmaktadır (Türkmen, 2006).

İnsan hayatında birçok amaç için kullanılan bu ağaç türünü olumsuz olarak etkileyen birçok biyotik ve abiyotik etkenler bulunmaktadır. Özellikle biyotik etkenler karaağaçlar üzerinde ölümlere varan zararlara neden olabilmektedirler. Söz konusu bu biyotik etkenler irdelendiğinde başta çeşitli hastalıklar ve pest olarak adlandırılan zararlı böcek türleri karşımıza

çıkılmaktadır. Bu zararlı böcek türlerinden birisi de Türkçe’ de “Karaağaç yaprak böceği” olarak bilinen *Xanthogaleruca luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae)’dır. Monofag bir zararlı olan bu tür, sadece karaağaç üzerinde beslenir. Popülasyon yoğunluğu yüksek olduğu dönemlerde, karaağaç yapraklarının damarları kalacak şekilde tüm epidermisini yiyerek dantel gibi bırakırlar. Bu tip ağır enfeksiyon geçiren ağaçlarda yapraklar hızla dökülerek, kısa bir süre içerisinde çırılçıplak kalırlar ve hatta ölebilirler (Johnson ve Lyon, 1991).

*X. luteola* ilk olarak 19. yüzyılın başında (1834) ABD’nin doğusunda, Baltimore (Maryland)’a kazara taşınması ile tespit edilmiştir (Glover, 1871; Riley 1883). Bu tür Doğu Amerika’da karaağacın ana zararlıları arasında yer alırken, bu türün ekonomik anlamda ilk önemli zararı 1989 yılında Avustralya’da tespit edilmiştir (Türkmen, 2006; Wu vd., 1991). Ülkemizde ve dünyada bu böcekle mücadelede diğer zararlı böcek türlerinde olduğu gibi yaygın olarak kimyasal insektisitler 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 ve rüzgâr gibi abiyotik etmenlerle kimyasallar; toprağa, tarım alanlarına hatta akarsular aracılığı ile içme sularına bulaşmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Ecevit, 1988).

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 ve maliyetinin düşük olduğu yöntemler tercih edilmelidir (Özcan, 2010). Bu amaçla özellikle son yıllarda biyolojik mücadele alanında kayda değer çalışmalar yapılmaktadır (Bekircan vd., 2014, 2015; Tosun vd., 2008; Yaman vd., 2014). Bu çalışmalar doğrultusunda zararlı böcek üzerinde doğal hastalık oluşturan etmenler ilgi odağı olmuştur.

Bu doktora tezinde dünyada ve ülkemizde önemli bir karaağaç zararlısı olan karaağaç yaprak böceğinde doğal olarak enfeksiyon oluşturan bir mikrospor türünün izolasyonu ve başta ışık mikroskopisi olmak üzere elektron mikroskopisi ve moleküler çalışmalarla karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## 1.2. *Xanthogaleruca luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) (Karaağaç Yaprak Böceği)

*Xanthogaleruca luteola* Müller; hayvanlar aleminin (Animalia), eklem bacaklılar (Arthropoda) şubesinde yer alır. Karaağaç Yaprak Böceği olarak da bilinen bu tür, böcekler (Insecta) sınıfının kın kanatlılar (Coleoptera) takımına ait olup yaprak böcekleri (Chrysomelidae) familyasının *Xanthogaleruca* cinsinin içinde yer almaktadır (URL-1).

Alem: Hayvanlar (Animalia)

Altalem: Bilateria

Üstşube: Panarthropoda

Şube: Eklem bacaklılar (Arthropoda)

Alt Şube: Hexapoda

Sınıf: Böcekler (Insecta)

Altsınıf: Pterygota

Üsttakım: Endopterygota

Takım: Kın kanatlılar (Coleoptera)

Familya: Chrysomelidae

Altfamilya: Galerucinae

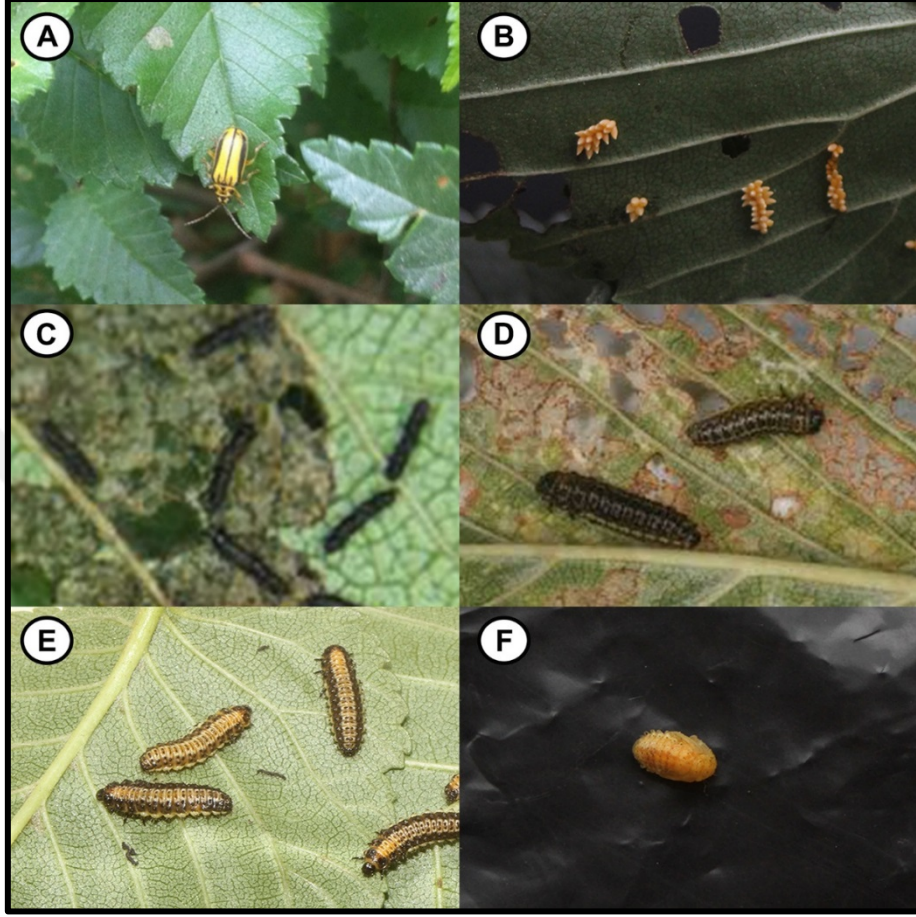
Cins: *Xanthogaleruca*

Tür: *Xanthogaleruca luteola*

### 1.2.1. Biyolojisi

Karaağaç yaprak böceği erginlerinin ortalama boyutları 6 mm olup, yeşilimsi sarı renkteki kabuğun kenar ve orta kısımlarında siyah bir bant bulunur (Şekil 1 A). Dişiler grimsi sarı yumurtalarını çift sıra halde 5 ila 25'li kümeler halinde yaprak alt yüzeyine bırakırlar (Şekil 1 B). Yumurtadan yeni çıkan larvalar siyah renkteyken beslenmeden sonra renk siyahtan sarıya değişiklik gösterir ve larvaların dorsal kısımlarında siyah tüberküller görülür (Şekil 1 C-D). Yumurtadan çıkan larvalar üç kez gömlek değiştirir (instar). Üçüncü gömlek değişimindeki larvalar ortalama 12 mm boyunda olup sırt bölgesinde koyu siyah tüberküllerden meydana gelmiş iki sıra bantla diğer larva dönemlerinden kolaylıkla ayırt edilir (Flint vd., 1998). Olgun larvalar genellikle sarı renktedir. Başları siyah olup thoraksın yanlarında iri siyah leke bulunur. Bacakları siyah-kahverengidir. Thoraksın ilk 1/3 kısmında 8 adet uzunca ve 11-12 adet kısa

kıllar mevcuttur (Şekil 1 E). Üçüncü gömlek değişimindeki larva bir süre daha beslendikten sonra turuncu veya parlak sarı renkte olan pupa safhasına dönüşür (Şekil 1 F).

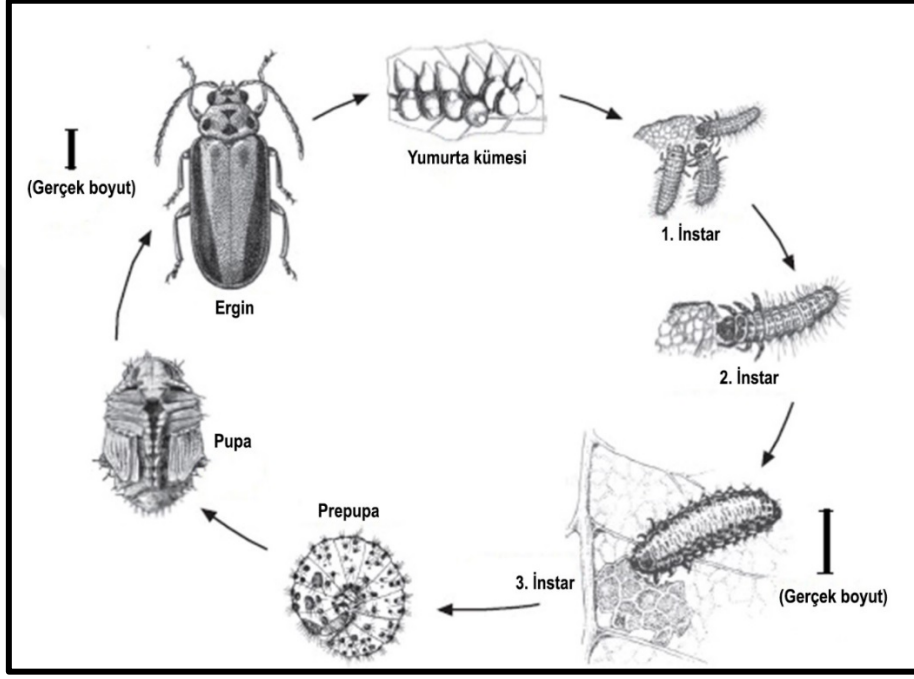


Şekil 1. *Xanthogaleruca luteola*' ya ait ergin, yumurta, larva ve pupa safhaları; A: Ergin, B: Yumurta, C: İlk larvalar, D: İkinci İnstar larvalar, E: Üçüncü İnstar Larvalar, F: Pupa

Ağaç kabuğu yarıkları arasında, ahşap elektrik ve telefon direkleri çatlaklarında ve evlerin çatı aralarında kışı geçiren erginler Nisan ayının ilk haftalarından itibaren görülmeye başlarlar. Karaağaçların tomurcuk açmaları başladığı zaman ağaçlara geçerek genç yapraklarla beslenmeye başlarlar. Sıcaktan hoşlandıklarından ağaçların güneş alan kısımlarını tercih ederler. Beslenme sırasında yapraklarda çeşitli büyüklük ve şekilde oval delikler açarlar. Çiftleştikten sonra dişiler yumurtalarını yaprak alt yüzeyine bırakırlar. Bir dişi ortalama 550 kadar yumurta bırakabilmektedir. Yumurtalarını genellikle ağaçların toprağa yakın yapraklarının alt yüzüne, nadiren de üst yüzüne bırakırlar. Hava koşullarına bağlı olarak 5-8 gün sonra yumurtadan çıkan larvalar yaprakların alt yüzeylerini iskelet haline getirmek suretiyle zarara neden olurlar. Mayıs ortasından itibaren olgunlaşan larvalar kabuk yarıklarında,



toprak örtüsü arasında ya da toprağın 1-3 cm derinliğinde pupa olurlar. Ortalama 12 günlük bir pupa döneminden sonra Haziran ayı başında yeni nesil erginler ortaya çıkarlar (Şekil 2). Genç erginler yapraklarda bir süre zarara neden olduktan sonra çiftleşip dişi bireyler yumurta bırakmaya başlarlar. Bu yumurtalardan meydana gelen ikinci nesil gelişimini Temmuz ortasında ve ondan sonraki günlerde tamamlarlar.



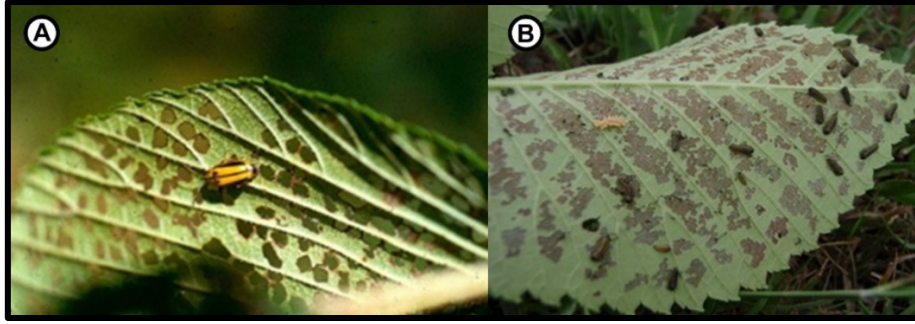
Şekil 2. *Xanthogaleruca luteola*'ya ait hayat safhaları ve hayat döngüsü (Dreistadt vd., 2004)

Üçüncü nesli meydana getirecek erginlerin koyduğu yumurtalar Ağustos ayından itibaren gelişerek Eylül ayı içinde gelişimini tamamlayarak erginleşirler. Bu erginler belirli bir süre karaağaç yaprakları üzerinde beslendikten sonra kışı geçirmek üzere buldukları ağaçları terk ederler. Vejetasyon döneminde her zaman yumurta, ergin, pupa ve larva bulma olanağı vardır (Çanakçıoğlu ve Mol, 1998).

Türkiye iklim koşullarında yılda ortalama 3 jenerasyona sahip olan karaağaç yaprak böceğinin bazen 1, bazense Kaliforniya gibi sıcak bölgelerde 4-5 jenerasyona sahip olduğu bilinmektedir (Çanakçıoğlu ve Mol, 1998; Dreistadt vd., 1991).

### 1.2.2. Zarar Şekli ve Yayılışı

Karaağaç yaprak böceği hem ergin hem de larva dönemlerinde konak bitki üzerinde zarar meydana getirmektedir. Erginlerin yaprak yüzeyindeki beslenmelerine bağlı olarak yapraklarda muntazam olmayan delikler meydana gelir (Şekil 3 A). Larva döneminde ise larvalar yaprakların alt yüzeyinde yaprak iletim damarları hariç tüm mezofil tabakasını yemeleri sureti ile yapraklarda iskelet görünümüne neden olurlar (Şekil 3 B). Böceğin beslenmesine bağlı olarak ortaya çıkan zarar sonucu ağaçlarda büyüme kaybı meydana gelir. Beslenmenin çok yoğun olduğu ağaçlarda çıplaklaşmada görülür. Çıplaklaşma sonucu ağacın kambiyum kısmı güneş ışınlarına doğrudan doğruya karşı kalarak fazla ısınır ve bunun sonucu olarak ağaçlar kuruyabilir.



Şekil 3. Karaağaç yaprak böceğinin ergin ve larva dönemlerinde karaağaç yaprakları üzerinde yapmış olduğu zarar şekilleri (URL-2; 3, 2016)

Karaağaç yaprak böceği asıl zararı genç yapraklar üzerinde meydana getirmektedir. Yumurta bırakmak için güneşli yerleri seçtiğinden sık ormanlarda zarar oluşturma potansiyelleri oldukça düşüktür. En fazla zararı tek ağaçlarda ya da seyrek ormanlarda meydana getirirler. Karaağaç yaprak böceği tarafından birkaç yıl üst üste zarar gören ağaçlara Scolytidae ve Buprestidae familyasındaki türler gibi kabuk böcekleri yerleşir ve ağaçların ölümüne neden olurlar (Çanakçıoğlu ve Mol, 1998).

Paleartik kökenli olan karaağaç yaprak böceği Avrupa kıtasından Kuzey Amerika'ya ilk olarak 1830'lu yılların sonunda çeşitli gemicilik ve ticari faaliyetler sonucu taşınmıştır (URL-4, 2016). Bu tarihten sonra Amerika kıtasının karaağaç yetişen hemen hemen her bölgesine çok kısa sürede yayılmış ve günümüzde Amerika kıtasında karaağaç türlerinin en önemli zararlılarından (Wu vd., 1991). Yine karaağaç yaprak böceği Avustralya kıtasında ilk olarak 1989 yılında Melbourne kentinin güney kısmında bulunan Mornington Peninsula bölgesinde

tespit edilmiştir (URL-5, 2016). Günümüzde ise Amerika kıtasının tamamı başta olmak üzere, Orta Asya, Orta Doğu, Kuzey Afrika, Güney Sibiryaya, Avustralya ve Güney Afrika gibi ülkemizin de içinde bulunduğu karaağacın yetişebildiği her yerde karaağaç yaprak böceğine rastlamak mümkündür (Aslan vd., 2000; Dahlsten vd., 1998; Dreistadt, 2008).

### **1.2.3. Mücadele Yöntemleri ve Doğal Düşmanları**

Dünyada ve ülkemizde karaağaç yaprak böceğinin mücadelesinde yoğun olarak kimyasal mücadele teknikleri kullanılmaktadır. Günümüzde bu zararlının mücadelesinde farklı kimyasal insektisitler kullanılmaktadır (Tablo 1). Ancak kullanılan bu insektisitler; 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 karaağaç yaprak böceği yumurta, larva ve erginlerinin toplanıp imha edilmesi şeklinde yapılan bu mücadele, uygulama zorluğu ve fazla iş gücü gereksiniminden dolayı pek tercih edilmemektedir (Bekircan, 2012).

Tablo 1. Günümüzde Karaağaç yaprak böceği ile mücadelede kullanılan kimyasal insektisitler (Dreistadt, 2014).

<b>Etkili Madde Adı</b>	<b>İnsektisit Grubu</b>	<b>Uygulama şekli</b>
Azadiractin	Kalıntısız İnsektisitler	Püskürtme
Neem oil	Kalıntısız İnsektisitler	Püskürtme
Narrow-range oil	Kalıntısız İnsektisitler	Püskürtme
Pyrethrin	Kalıntısız İnsektisitler	Püskürtme
Piperonyl butoxide	Kalıntısız İnsektisitler	Püskürtme
Spinosad	Kısa Süre Kalıntılı İnsektisitler	Püskürtme
Carbaryl	Kısa Süre Kalıntılı İnsektisitler	Gövde Bantlama
Pyrethroids (Fluvalinate)	Kısa Süre Kalıntılı İnsektisitler	Gövde Bantlama
Imidacloprid	Kısa Süre Kalıntılı İnsektisitler	Gövde veya Toprak Enjeksiyonu
Neonicotinoids	Sistemik İnsektisitler	Püskürtme veya Enjeksiyon
Abamectin	Sistemik İnsektisitler	Püskürtme veya Enjeksiyon
Organophosphate acephate	Sistemik İnsektisitler	Püskürtme veya Enjeksiyon
Carbamates	Uzun Süre Kalıntılı İnsektisitler	Püskürtme
Organophosphates (Malathion)	Uzun Süre Kalıntılı İnsektisitler	Püskürtme
Permethrin	Uzun Süre Kalıntılı İnsektisitler	Püskürtme

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.

Karaağaç yaprak böceğinin mücadelesinde kullanılan ve kullanım potansiyeline sahip organizmalara bakıldığında; başta predatör böcek türleri olmak üzere larva, yumurta ve pupa

parazitoidi ve entomopatojenik bakteri, nematod ve mikrospor türleri dikkat çekmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Karaağaç yaprak böceği mücadelesinde kullanılan ve kullanım potansiyeline sahip organizmalar (Clair vd., 1987; Clausen, 1978)

<b>Doğal Düşmanlar</b>	<b>Tip</b>	<b>Etki Dönemi</b>
<i>Aprostocetus celtidis</i>	Parazitoid	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Patojen	
<i>Bacillus thuringiensis san diego</i>	Patojen	
<i>Bacillus thuringiensis tenebrionis</i>	Patojen	
<i>Beauveria bassiana</i>	Patojen	
<i>Carabidae</i>	Predatör	Larva
<i>Coleomegilla maculata</i>	Predatör	
<i>Erynnia ocyperata</i>	Parazitoid	
<i>Erynniopsis antennata</i>	Parazitoid	
<i>Lebia scopularis</i>	Predatör	
<i>Medina collaris</i>	Parazitoid	
<i>Nosema galerucellae</i>	Patojen	
<i>Oomyzus brevistigma</i>	Parazitoid	Pupa
<i>Oomyzus gallerucae</i>	Parazitoid	Yumurta
<i>Oplonus cruentus</i>	Predatör	
<i>Podisus nigrolimbatus</i>	Predatör	
<i>Steinernema carpocapsae</i>	Parazitoid	
<i>Stiretrus decastigma</i>	Predatör	
<i>Stiretrus erythrocephalus</i>	Predatör	
<i>Baryscapus brevistigma</i>	Predatör	Pupa

Biyolojik mücadele açısından patojen grubu olan organizmalar laboratuvar ortamında kısa sürede ve çok sayıda üretilibilmeleri ve konak seçicilikleri nedeni ile zararlılarla mücadelede ayrı bir öneme sahiptirler. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar zararlı böceklerle mücadelede entomopatojenik mikrospor türlerine dikkat çekmektedir.

### 1.3. Microsporidia

Protista alemine ait olan mikrosporlar, başta böcekler olmak üzere omurgalı ve omurgasız canlılarda çoğunlukla kronik enfeksiyona neden olan ökaryotik, zorunlu hücre içi patojenlerdir (Solter vd., 2012). Bu monofiletik takson yaklaşık olarak 200 cins ve 1300'den fazla türden meydana gelmektedir (Becnel vd., 2014). Mitokondrileri bulunmayan mikrosporlar, 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 (Vavra ve Larsson, 1999).

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. Diğer bir taşınım yolu ise vertikal taşınımdır. Bu taşınım şeklinde mikrospor sporları, hastalıklı dişinin üreme sistemine yerleşip burada oluşturulan yumurtalar vasıtası ile gelecek nesillere aktarılır (Becnel ve Andreadis, 1999).

Genellikle tek tip olan sporları çok küçüktür (1-20  $\mu\text{m}$ ). Mikrospor enfeksiyonu 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  $\mu\text{m}$  aralığındadır ve genellikle oval şekle sahiptir (Vavra ve Larsson, 1999).

Mikrospor sporları, konak tarafından vücut içine alınıp bağırsağa ulaştıktan sonra polar filamentlerini dışarı çıkarıp polar tüp oluştururlar ve konağın hücre zarını delerek içine girerler. Mikrosporlar 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 özgünlüğü olan canlılardır, yani doğada tek bir konağı tercih ederler. Bununla birlikte enfeksiyon gerçekleştirdikleri zararlının ölümüne sebep olmazlar. Bunun yerine buldukları konağın hayat süresinin kısalması, aktivite azalması, iştah ve kilo kaybının yanı sıra aynı zamanda üreme potansiyellerinin azalması gibi belirtileri olan kronik seyreden bir hastalığa neden olurlar. Mikrosporlar 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 (Becnel ve Andreadis, 2014).

İnsanlarda da hastalığa sebep olabildikleri için mikrosporların teşhis edilmesi ve karakterizasyonu son derece önemlidir. Mikrosporların kesin teşhisi için öncelikle Giemsa boyaması yöntemi kullanılır. Boyanan sporlar kayda değer bir küçülmeye maruz kalırlar ancak çekirdeğin oldukça belirgin bir şekilde boyanması sayesinde çekirdek sayısı hakkında kesin bilgi elde edilir. Bu nedenle bu yöntem mikrosporların tür düzeyinde karakterizasyonunda çok etkilidir. Giemsa boyama yöntemiyle ön karakterizasyonu yapılan mikrosporların elektron mikroskobu çalışmaları sayesinde detaylı karakterizasyonunu yapmak mümkündür (Yaman vd., 2014).

#### **1.4. Tezin Amacı**

Bu doktora tezinde, *Ulmus* cinsine ait karaağaçlarda büyük zararlara neden olan Chrysomelidae familyasından Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola* Müller Coleoptera: Chrysomelidae)'nde doğal olarak hastalık oluşturan, dünya literatürü için de yeni bir kayıt olan mikrospor patojeninin tespiti, izolasyonu ve çeşitli metotlarla karakterizasyonu amaçlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Tez çalışması boyunca çeşitli karaağaç türlerinde zarara neden olan Karaağaç Yaprak Böceği (*Xanthogaleruca luteola*)'nde doğal olarak enfeksiyon oluşturan bir entomopatojenin cins seviyesinde teşhisinin yapılabilmesi için ışık, elektron (TEM) mikroskopisi ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu patojenin konağı üzerindeki insektisidal etkilerinin belirlenebilmesi için bioassay çalışmalarının yanı sıra patojenin meydana getirdiği enfeksiyonun iklim verileri ve yıllık dağılımı arasındaki bağıntı istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

### 2.1. Örneklerin Elde Edilmesi İçin Yapılan Arazi Çalışmaları

Bu çalışmanın konusunu oluşturan karaağaç yaprak böceği ergin ve larvaları üzerinde 2014 ve 2015 yıllarının Mayıs-Eylül ayları arasında bölgelerini temsilen beş farklı ilde arazi çalışmaları yürütülmüştür (Şekil 4). Arazi çalışmaları sırasında zararlıya ait örnekler dikkatlice uygun kaplara toplanmıştır. Numunelerin 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 laboratuvar ortamına getirilmiştir.





Şekil 4. 2014 ve 2015 yıllarının Mayıs – Eylül aylarında yapılan arazi çalışmalarının yürütüldüğü iller

## 2.2. Mikroskopik Çalışmalar

Karaağaç yaprak böceğinin ergin ve 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 karaağaç yaprak böceği örnekleri, hazırlanan Ringer solüsyonu içinde disekte edilmiştir. Diseksiyon, örneklerin başta sindirim sistemi olmak üzere iç organlarının dışarı çıkarılması ile yapılmıştır. Tüm doku ve organları içerecek şekilde hazırlanan preparat ışık mikroskobu (Olympus CX21) altında 40X'ten 1000X'e kadar olan büyütmelemlerle incelenmiştir. Enfeksiyon tespit edilen preparatlar, Leica ICC50 dijital kamera ve LAS EZ 1.0 resim sistemine sahip Leica DM1000 mikroskobuyla yeniden incelenmiş, patojenin fotoğrafları çekilmiş ve karakterizasyonu için gerekli olan ölçümler yapılmıştır (Bekircan, 2012; Yaman vd., 2014).

Böcek 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 tekrar 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 yapılmıştır: Öncelikle preparat oda sıcaklığında kurutulmuş, %100'lük metil alkolde 3 dakika bekletilerek fikse edilmiş ve tekrar oda sıcaklığında kurutulup saf suyla hazırlanan % 5'lik Giemsa boyasında 16 saat boyamaya bırakılmıştır. Boyanan preparat steril suyla yıkanıp kurutulmuş ve incelemeye hazır hale getirilmiştir. Son olarak da immersiyon yağı ile birlikte 1000X'lik büyütmede preparatlar incelenmiştir (Bekircan, 2012; Toguebaye vd., 1988; Undeen ve Vavra, 1997; Yaman vd., 2014).

### **2.2.2. Elektron Mikroskobu Çalışmaları**

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) çalışmaları, incelenmesi istenen yapıların morfoloji ve içyapılarının ayrıntılı bir şekilde açığa çıkarılması bakımından çok önemlidir. Bu tez çalışmaları sırasında tespit edilen mikrosporun, yeni bir cinse ait yeni bir tür olduğunun kanıtlanmasında elektron mikroskobunun katkısı büyüktür. Karaağaç yaprak böceğinden izole edilen mikrosporun detaylı yapısı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGU), Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Araştırma ve Uygulama Merkezi (ARUM)'nde JEOL JEM 1220 elektron mikroskobunda incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 2.2.2.1. Resine Gömme İşlemi ve Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Işık mikroskobu altında enfeksiyon olduğu tespit edilen preparattaki dokular dikkatlice alınarak uygun doku takip işlemlerinden geçirilmiş ve resine gömülmüştür. Böylece dokular elektron mikroskobunda 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 bir gece boyunca +4 °C'de fikse edilmiş, pH 7,2'de 0,1 M kakodilat tamponu içerisinde üç kez 15'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra %1'lik  $O_5O_4$  ile 2 saat süreyle muamele edilmiş ve üç kez 15'er dakika iki kez distile edilmiş suda (ddH<sub>2</sub>O) yıkanmıştır.

Daha sonra numuneler sırasıyla %10'luk, %30'luk, %50'lik, %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %95'lik etanolle 10'ar dakika, sırası ile %100'lük aseton ve etanol ile ikişer kez 15'er dakika muamele edilip dehidrasyona uğratılmıştır. Daha sonra 1:3 oranında hazırlanan ERL: Etanol karışımı ile 1 saat, 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 emdirilmek üzere 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. Hazırlanan Resin bloklardan Leica EM UC7 marka ultra mikrotom kullanılarak kesitler alınmış ve bu kesitler Pioloform kaplı bakır gridler üzerine toplanmıştır. Daha sonra bu gridler Reynold gümüş sitrat metodu kullanılarak kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır (Bekircan, 2012; Reynold, 1963; Radek ve Fabel, 2000; Yaman vd., 2014).

### 2.2.3. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalarda, enfekte olduğu önceden ışık mikroskobu ile belirlenen karaağaç yaprak böceği dokuları kullanılmıştır. İlk olarak endorff homojenizatörü ile birlikte, mikrospor sporları ile enfekte olmuş böcek dokuları bir endorff tüp içerisinde homojenize edilmiştir. Saf su ilave edilen homojenizat, kaba böcek parçalarından içinde pamuk bulunan enjektör ile ayrılmıştır. Ayırma işleminin ardından sporları tamamen saflaştırmak için elde edilen süspansiyon 2000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernetant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pellet saf su ile sulandırılarak 2000 rpm'de 2 dakika tekrar santrifüj edilmiş ve bu işlem mikrospor sporlarını iyice saflaştırana kadar birkaç kez tekrar edilmiştir. Saflaştırma işleminin sonunda sporlar hemositometre ile sayılmıştır (6,4 x

$10^8$ /ml). Sayımı tamamlanan sporlar bir ependorf tüp içerisinde  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere depolanmıştır.

### 2.2.3.1. DNA İzolasyonu ve 16S SSU rRNA Geni Amplifikasyonu

Bu tez çalışmasında; ışık ve elektron (TEM) mikroskobu incelemeleri tamamlanan mikrospor patojeninin filogenetik açıdan değerlendirilebilmesi için önceden saflaştırılmış mikrospor sporlarından DNA izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metodu kullanılarak 16S SSU rRNA geni amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylelikle bu mikrospor patojeni filogenetik analizlere hazır hale gelmiştir.

Yukarıda bahsedilen DNA izolasyonu ve 16S SSU rRNA geni amplifikasyonu işlemleri sırası ile şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Önceden böcek dokularından arındırılan ve  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de depolanan mikrospor sporlarından 50  $\mu\text{l}$  alınarak bir ependorf tüp içerisine aktarılmış ve bu sporların spor duvarlarının parçalanması için 50  $\mu\text{l}$  %0,3' lük  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hidrojenperoksit) eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir (Higes vd., 2006). Hidrojenperoksit ile kimyasal yolla inceltelen spor duvarları mekanik yıkım için cam bilyelerle vortekslenmiştir (Hylis vd., 2005). Bu işlemlerin ardından ticari DNA izolasyon kiti (QIAGEN, No; 69504) kullanılarak üreticinin kit içerisinde belirtmiş olduğu direktiflere uygun şekilde DNA izole edilmiştir.

DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra Multiplex PZR tekniği kullanılarak 16S SSU rRNA amplifikasyonu gerçekleştirildi. Multiplex PZR çalışmalarında 18F 5'-CACCAGGTTGATTCTGCC-3' ve 1537R 5'-TTATGATCCTGCTAATGGTTC-3' primerleri kullanılmıştır (Baker vd., 1995). PZR reaksiyonları, Qiagen Multiplex PCR Kit, No: 206143 kullanılarak üretici talimatlarına uygun şekilde toplam hacim 50  $\mu\text{l}$  olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Yine ticari kitin (QIAGEN Multiplex PCR Kit, No: 206143) kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi PZR amplifikasyonları;  $95^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakika, her biri 45 döngü olacak şekilde  $94^{\circ}\text{C}$ ' de 30 saniye,  $61^{\circ}\text{C}$ ' de 90 saniye,  $72^{\circ}\text{C}$ ' de 90 saniye ve son döngüyü takiben son uzama reaksiyonu  $72^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünü % 0,9'luk, etidyum bromür (EtBr) ilaveli agaroz jelde yürütülerek UV transilluminatörde varlığı belirlenmiştir.

### 2.2.3.2. PZR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

Yukarıda açıklandığı gibi elde edilen DNA; 16S SSU rRNA fragmenti, baz dizilimi belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü şartlar altında yapıştırılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar

pGEM-T Easy vektörüne ligasyon için tepkime bileşenleri	
10X T <sub>4</sub> DNA ligaz tamponu	1 µL
Kalıp DNA (PCR)	3 µL
pGEM-T T Easy klonlama vektörü	1 µL (1:1)*
T <sub>4</sub> DNA ligaz (1 U)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	4 µL
<b>Toplam</b>	<b>10 µL</b>
* 1:1 sulandırılmış vektör	

Yukarıda belirtilen miktarlarda tepkime bileşenleri kullanılarak hazırlanan karışım 16 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmış ve insert DNA'nın (PZR ürünü) vektöre yapışması sağlanmıştır. Ertesi gün, elde edilen ligasyon ürünü transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarılmıştır.

#### 2.2.3.2.1. *E. coli* JM101 'e Transformasyon

Kompotent hücre hazırlamak için *E. coli* DH5α hücreleri Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekilmiş ve 37°C' de gece boyunca büyütülmüştür. Bir gecelik kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapılmıştır. Hücreler 37°C' de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,4 - 0,5 olacak şekilde büyütülmüştür. Hücreler ardından 4°C' de 4.000×rpm hızda 5 dk santrifüj edilmiş ve pelletin üzerine 10 ml 100 mM soğuk CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek elle çözümleri sağlanmıştır. Hücreler 30 dk buz üzerinde bekletilmiş ve tekrar 4°C'de 4.000×rpm hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine 2 ml 100 mM soğuk CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen kompotent hücreler +4°C' de 2 gün içinde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Transformasyon deneyi Sambrook vd., (1990)'nin tanımladığı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Kompetent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bu hücrelerin üzerlerine 3–5 µl ligasyon karışımından ilave edilmiştir. Karışım 30 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 90 sn 42°C' de bekletilmiştir. Ardından ependorf tüplerinin içerisine 200 µl LB Broth besiyeri ilave edilerek 37°C' de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda hücreler ve petri kaplarında bulunan 50 mg/ml LB-Agar besiyeri üzerine cam bagetle yayılmıştır. Petriler 37°C' de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek hangisinin istenilen fragmenti seçtiği belirlenmiştir.

#### **2.2.3.2.2. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu**

Oluşan kolonilerden yapılan gecelik kültürler sonucu büyüyen hücreler alınarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit izolasyonu Promega Miniprep izolasyon kiti kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Yapılan izolasyonlar sonucu, %1' lik agaroz jelde görüntülenen plazmitlerden ağır olanlar seçildi ve klonlanan fragmentin teyiti için bu plazmitler EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonları sonucunda, doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizleri için Macrogen Inc. firmasının Hollanda şubesine gönderilmiş ve baz dizin analiz sonuçları, NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST ( The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzü sayesinde GenBank' taki verilerle karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **2.2.4. Bioassay Çalışmaları**

*Xanthogaleruca luteola*'dan tespit edilen mikrospor patojeninin hangi dozlarda konak böcekte ne oranda ölüm gerçekleştirdiğinin tespit edilmesi için bioassay çalışmaları yapılmıştır. Bunun için önceden hazırlanarak saflaştırılan spor stoklarından spor/ml düzeyinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlar da ( $2,27 \times 10^7$ ;  $2,27 \times 10^6$ ;  $2,27 \times 10^5$ ;  $2,27 \times 10^4$ ;  $2,27 \times 10^3$ ) beş uygulama ve bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Bioassay çalışmaları 24 gözlü plateler de olacak şekilde yaprak disk metodu yöntemi ile yürütülmüş ve deneyler 3'er kez tekrarlanmıştır. Bioassay çalışmaları için hepsi ikinci gömlek değişim sürecinde olan toplamda 360 adet larva kullanılmıştır.

Diseksiyonları sonucu izole edilen ve saflaştırılan patojen numuneleri kâğıt delgeçi kullanılarak hazırlanan eşit boyutlardaki karaağaç yaprak parçalarına damlatılıp, parça yüzeyine dağıtılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kontrol grubu haricindeki deney gruplarına bu yaprak parçaları verilmiştir. Kontrol grubundaki bireyler temiz ve enfeksiyon bulunmayan yaprak parçaları ile beslenmiştir. Sonraki günlerde besinlerini tüketen tüm grupların buldukları kaplar yenilenmiş ve bireyler temiz ve süspansiyon bulunmayan yaprak parçaları ile günlük olarak beslenmiştir.

21 günlük deney süresince tüm gruplar,  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de  $\%75 \pm 1$  nem oranına ayarlanmış iklim dolabında bulundurulmuştur.

Deney esnasında ölen larvalar hemen alınıp diseksiyonları yapılarak mikroskop altında incelenmiş ve ölüm oranı günlük olarak kaydedilerek, deney sonunda oranlar aşağıda belirtilen Abbott (1925) formülü ile hesaplanmıştır.

Abbott formülü:  $100 \times (\text{Test grubundaki ölüm yüzdesi} - \text{Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi}) / (\%100 - \text{Kontrol grubundaki ölüm yüzdesi})$ .

### **2.2.5. İklim Verilerinin Tespit Edilen Mikrospor Enfeksiyonu Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik İstatistiksel Analizler**

2014-2015 yılları arasında gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucu mikrospor enfeksiyonu sadece İstanbul örneklerinde tespit edilmiştir. Bu nedenle tez çalışması öncesinde 2013 yılında sadece İstanbul da yapılan ön çalışmaya ait veriler de yapılacak olan istatistiksel analizlerin güvenilirliğini ve açıklayıcılığını arttırmak için analizlere dahil edilmiştir.

Tespit edilen mikrospor enfeksiyonu üzerinde yıl ve farklı iklim koşullarının etkili olup olmadığını belirlemek üzere IBM SPSS 21.0 istatistik programı kullanılarak sırası ile ANOVA ve Regresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca mikrospor enfeksiyonu üzerinde yağış, nem, sıcaklık ve ay gibi bağımsız değişkenlerin yıllık bazda etkileri ayrı ayrı Chi square ( $\chi^2$ ) analiziyle karşılaştırılmıştır (Aydın vd., 2005; Martin-Hernández vd., 2007). Bu analizlerde kullanılmak üzere yıllara ve aylara bağlı olarak değişkenlik gösteren yağış, nem ve sıcaklık gibi gerekli olan iklim verileri T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Bu tez çalışması süresince *Ulmus* türlerinin en önemli zararlılarından biri olan Coleoptera takımına ait, karaağaç yaprak böceği (*Xanthogaleruca luteola*) ile mücadelede kullanılmak amacıyla zararlının doğal düşmanı olan yeni bir mikrosporidium patojeninin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla ülkemizin farklı bölgelerinde farklı illerden yapılan arazi çalışmalarında böceğin ergin ve larvaları toplanmıştır. Toplanan 3217 örnekten 287'sinde yoğun şekilde mikrospor enfeksiyonuna rastlanılmıştır. Tez çalışması süresince bu patojenin tanımlanması, karakterizasyonu ve karaağaç yaprak böceğindeki varlığının tespiti için gerekli çalışmalar yapılmıştır. Tespit edilen mikrosporidium patojeni ile ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

#### 3.1. *Xanthogaleruca luteola* (Müller, 1766) Örneklerinin Temini İçin Yapılan Arazi Çalışmaları

Bu tez çalışması kapsamında, 2014- 2015 yılları arasında coğrafik bölgelerini temsilen beş farklı ilde (Adana, Ankara, Çanakkale, İstanbul ve Trabzon) toplam 50 arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu arazi çalışmaları böceğin farklı gelişim dönemlerini yakalamak için her yılın Mayıs – Eylül ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu arazi çalışmaları sonucunda 2014 yılında 1822, 2015 yılında ise 1395 olmak üzere toplamda 3217 örnek toplanmıştır. Yapılan arazi çalışmalarının yıl, il ve ay bazındaki detaylı verileri Tablo 4'de özetlenmiştir.



Tablo 4. 2014 ve 2015 yıllarının Mayıs – Eylül aylarında yapılan arazi çalışmaları, aylara ve yıllara bağlı toplanan örnek sayıları

2014		Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	TOPLAM
	Adana	45	136	100	155	60	<b>496</b>
	Ankara	-	60	87	125	-	<b>272</b>
	Çanakkale	-	40	113	140	-	<b>293</b>
	İstanbul	65	105	121	210	20	<b>521</b>
	Trabzon	-	35	80	125	-	<b>240</b>
	<b>ARA TOPLAM</b>	<b>110</b>	<b>376</b>	<b>501</b>	<b>755</b>	<b>80</b>	<b>1822</b>
	2015		Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül
Adana		37	85	105	53	15	<b>295</b>
Ankara		-	43	62	82	-	<b>187</b>
Çanakkale		-	25	70	93	34	<b>222</b>
İstanbul		52	87	112	175	82	<b>508</b>
Trabzon		-	17	38	105	23	<b>183</b>
<b>ARA TOPLAM</b>		<b>89</b>	<b>257</b>	<b>387</b>	<b>508</b>	<b>154</b>	<b>1395</b>
<b>GENEL TOPLAM</b>		<b>199</b>	<b>633</b>	<b>888</b>	<b>1263</b>	<b>234</b>	<b>3217</b>

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda 2014 yılında 521 örnekle İstanbul ili karaağaç yaprak böceğinin en yoğun görüldüğü il olurken, 240 örnekle Trabzon böcek yayılımının en az olduğu il olmuştur. 2015 yılında da mevcut durum değişmeyerek 508 örnekle İstanbul böcek yoğunluğu bakımından birinci il olurken 183 örnekle Trabzon arazi çalışması yapılan iller arasında sonuncu olmuştur.

Böceğin, yapılan arazi çalışmaları sırasında bulunduğu illerde aylara göre yoğunluk sıralaması yapıldığında 2014 ve 2015 yılları için Ağustos ayı böcek yoğunluğunun en fazla olduğu ay olarak tespit edilmiştir.

### 3.2. *Xanthogaleruca luteola* Müller' de Mikrospor Enfeksiyonunun Belirlenmesi

Bu çalışmada, karaağaç yaprak böceğinde doğal olarak enfeksiyon oluşturan bir mikrosporidium türünün tespiti ve karakterizasyonu için ışık ve elektron mikroskobu çalışmalarının yanı sıra, yine literatürde mevcut olan ve böcekler üzerinde patojenik olduğu

bilinen diğ er mikrospor türleri ile karşılaştırma yapabilmek için filogenetik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1. Mikrospor Enfeksiyonunun Makroskopik Görünümü**

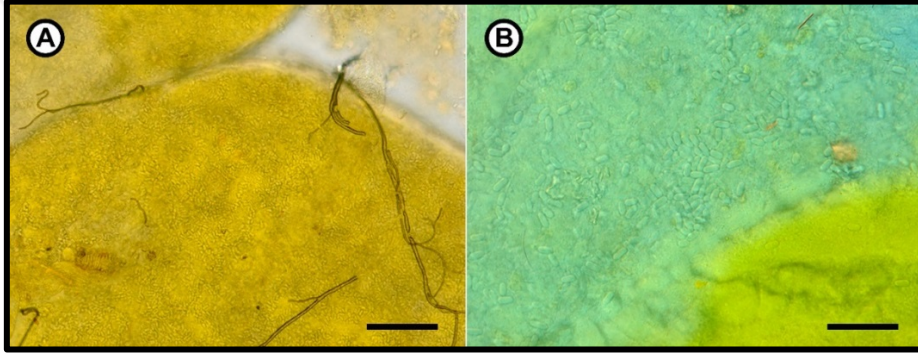
Mikrospor enfeksiyonunun konağı üzerinde makroskopik olarak gözlenebilen birkaç semptom mevcuttur. Bu belirtiler arasında aşırı genişlemiş vücut kısımları, deride renk değişimi, hareket yeteneğinde azalma, iştahsızlık, kütikül üzerinde belirgin leke benzeri renklenmeler ve larvaların instar değişimlerindeki anormallikler sayılabilir. Ayrıca dişi böceklerin yumurtlama veriminde azalmanın gerçekleştiğı de bilinmektedir (Joudrey ve Bjørnson, 2007). Bu bilgiler ışığında arazi çalışması sonucunda toplanan böcekler üzerinde yapılan makroskopik gözlemlerde bazı böceklerin abdomen kısımlarının diğ er numunelere kıyasla daha şişkin olduğı görülmüştür ve bu numunelerin diseksiyonu sonucunda enfeksiyon pozitif olduğı tespit edilmiştir. Her ne kadar şüphelenilen enfeksiyonun belirlenmesinde makroskopik bulgular önemli olsa da kesin yargıya varabilmek için mikroskopik düzeydeki bulguların önemi büyüktür.

### **3.2.2. 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 incelenmiştir. 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 tekniğı 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.

### 3.2.2.1. 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 5). Özel kamera ve resim sistemlerine sahip mikroskop kullanılarak, daha önce ışık mikroskobunda tespit edilen mikrosporların enfekte ettiği dokular fotoğraflanmış ve sporlarının ölçümü yapılmıştır.



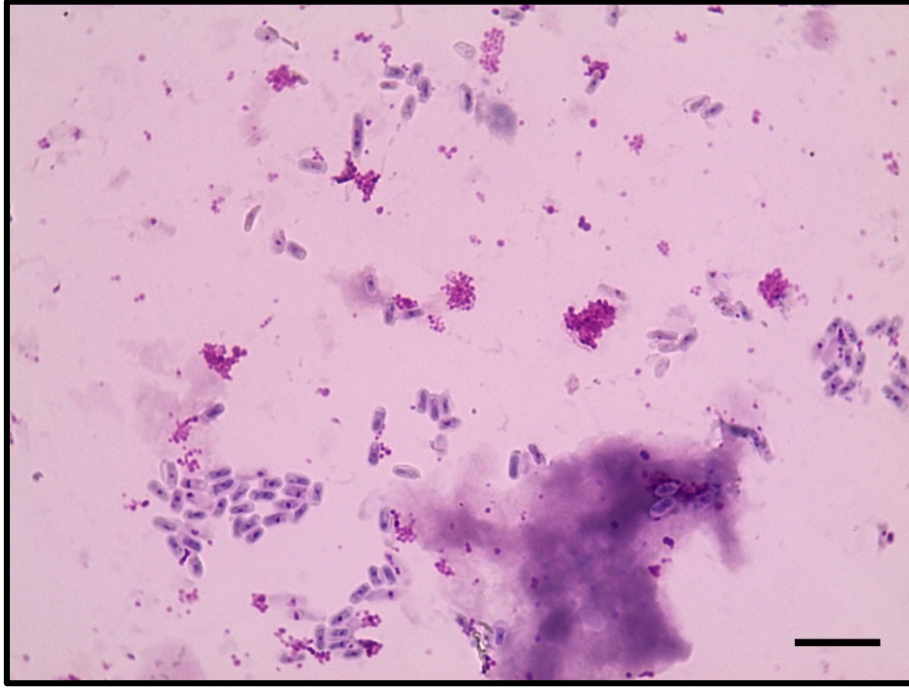
Şekil 5. Mikrospor sporları ile enfekte olmuş *X. luteola* bağırsağı. A: Mikrospor sporları ile dolu böcek bağırsağı, 40X'lik büyütme, bar: 40 µm; B: Mikrospor sporları, 100X'lik büyütme, bar: 15 µm

Mikrospor patojeninin karakteristik özelliklerini taşıyan sporlar ışığı farklı şekilde kırmaları, aynı boyut ve şekle sahip olmaları ile konakçının diğer dokularından ayırt edilmektedir. Taze preparatlarda ışık mikroskobu ile tespit edilen patojenin sporları  $4,25 \pm 0,52$  ( $3,3-6,35$ ;  $n = 500$ ) µm boyunda ve  $2,12 \pm 0,25$  ( $1,45-2,91$ ;  $n = 500$ ) 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. Bu doktora tezinde 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 edilmiştir (Şekil 6, 7, 8, 9). Giemsa boyama metodu ile enfeksiyon kapmış böcek dokularındaki mikrospor enfeksiyonu teyit edilmiştir.

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

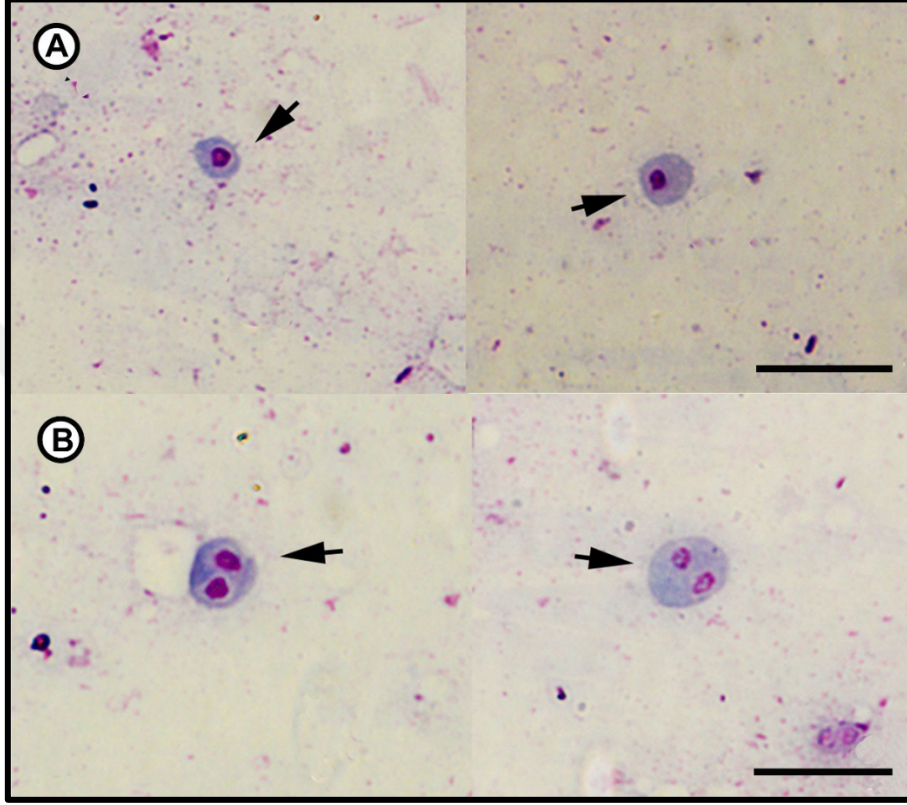
Mikrospor patojeninin tanımlanmasında karakteristik safhası spor safhasıdır. Bu çalışma kapsamında karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor sporları oval şekillidir (Şekil 6). Giemsa ile boyama işleminden sonra mikrospor patojenine ait sporlar tekrar ölçülmüş ve ölçümler sonrasında sporların boyu  $3,40 \pm 0,37$  (2,50–4,17; n = 970)  $\mu\text{m}$ ; eni ise  $1,63 \pm 0,20$  (0,92–2,51; n = 970)  $\mu\text{m}$  olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. Giemsa boyalı böcek dokusu, mikrospor sporları ve çeşitli hayat safhaları, bar: 15  $\mu\text{m}$

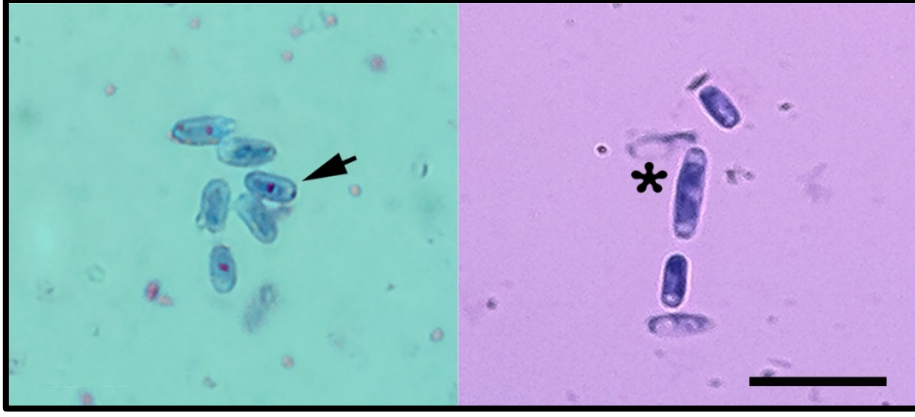
Tespit edilen mikrospor patojenine ait ilk vejetatif hayat safhası meront safhasıdır. Giemsa ile boyanan numunelerde bulunan merontların sitoplazması kısmen mavi renkte,

nükleuslar ise belirgin mor renkte boyanmıştır. Tek veya çift çekirdekli olabilen merontlar küresel veya oval şekillidir (Şekil 7). Küre şeklindeki tek çekirdekli merontlar  $5,14 \pm 1,29$  ( $2,61-8,36$ ;  $n = 30$ )  $\times$   $4,89 \pm 0,87$  ( $2,83-6,57$ ;  $n = 30$ )  $\mu\text{m}$  ölçülürken, çift çekirdekli merontlar  $7,18 \pm 1,54$  ( $5,05-11,01$ ;  $n = 23$ )  $\times$   $6,25 \pm 1,87$  ( $3,78-10,83$ ;  $n = 23$ )  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür.



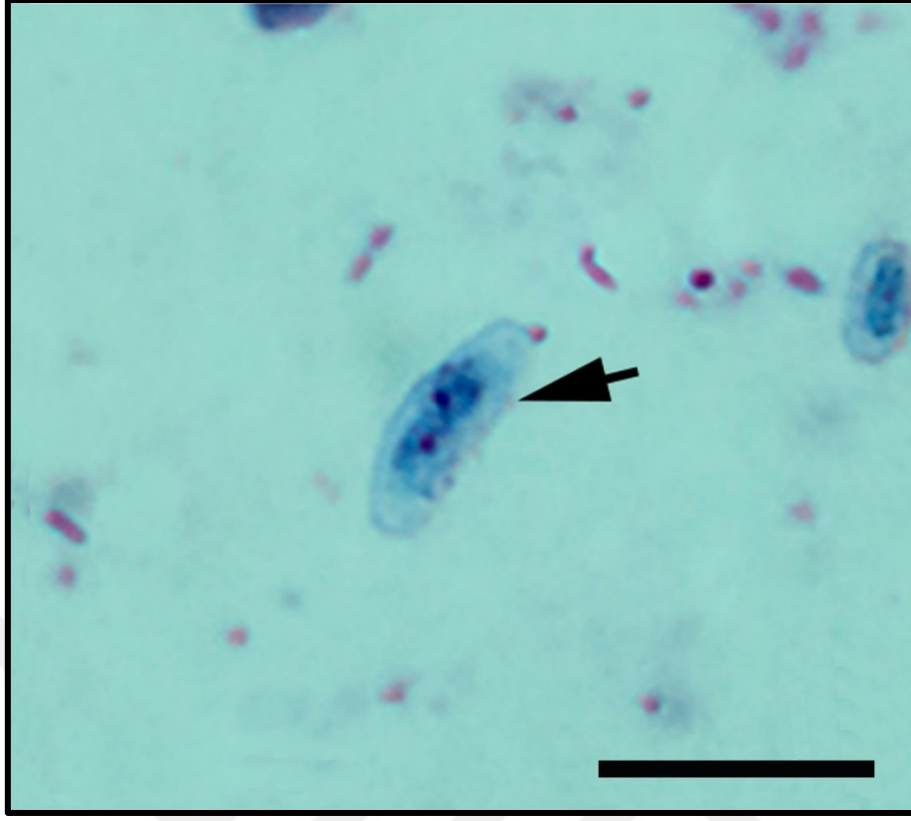
Şekil 7. Mikrospor hayat döngüsünün karakteristik meront safhası, A: Tek çekirdekli meront safhaları, bar: 15  $\mu\text{m}$ , B: Çift çekirdekli meront safhaları, bar: 10  $\mu\text{m}$ .

Vejetatif safhanın başlangıcı olan merontlar birçok bölünme geçirerek mikrosporlarda hayat döngüsünün ikinci basamağı olan sporontları meydana getirir. Giemsa ile boyanan sporontların sitoplazmaları, kalınlaşmaya başlayan ekzospor yapısı nedeni ile merontlara oranla daha açık mavi renkte, hatta hemen hemen hiç boyanmazken çekirdekleri ise mor veya parlak fuşya renkte boyanır. Bu çalışmada tespit edilen sporontlar küresel şekilden uzayarak olgun bir spor şekline varan değişik yapılarla tespit edilmiştir (Şekil 8). Boyalı numunelerde gözlemlenen sporontlar  $3,88 \pm 0,53$  ( $2,88-5,43$ ;  $n = 48$ )  $\times$   $1,66 \pm 0,35$  ( $1,09-2,52$ ;  $n = 48$ )  $\mu\text{m}$  ölçülerine sahiptir. Ayrıca disporoblastik sporontlar sporoblastları oluşturabilmek için tek bir bölünme geçirirler (Şekil 8).



Şekil 8. *X. luteola*'da tespit edilen mikrospor patojenine ait sporont safhası; asteriks disporoblastik sporontu göstermektedir, bar: 10  $\mu$ m

Olgun sporları oluşturacak olan sporoblast safhası, mikrospor hayat döngüsünün son vejetatif safhasıdır. Giemsa ile boyandıktan sonra sporoblastların sitoplazmaları çok açık mavi, nukleusları açık mor renkte gözlemlenir. İncelemeler esnasında tespit edilen diplokaryotik sporoblastlar uzamış şekilde tespit edilirken Giemsa boyalı numunelerde sporoblastlar  $5,70 \pm 1,16$  (4,11–9,35; n = 38)  $\times$   $2,25 \pm 0,47$  (1,54–4,43; n = 38)  $\mu$ m boyutlarında ölçülmüştür (Şekil 9).

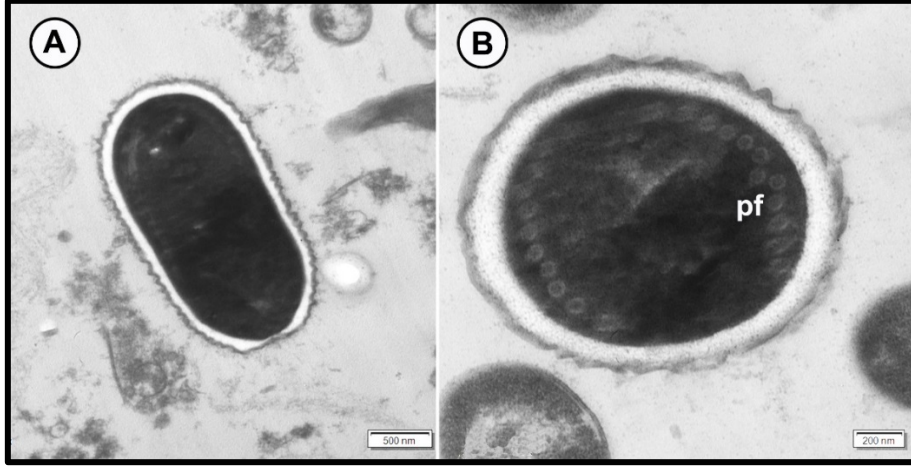


Şekil 9. *X. luteola*'da tespit edilen mikrospor patojenine ait diplokaryotik sporoblast safhası, bar: 10  $\mu$ m

### 3.2.2.2 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Mikrospor Patojeninin İncelenmesi

Yukarıda bahsedildiği gibi karaağaç yaprak böceğinde 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 karaağaç yaprak böceğinde 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 fotoğraflanarak teyit edilmiştir (Şekil 10, 11). Bu tez çalışmasında karaağaç yaprak böceğinde hastalık oluşturan mikrospor patojeninin daha önce tespit edilmemiş yeni bir cinse ait yeni bir tür olduğu tespit edilmiştir.

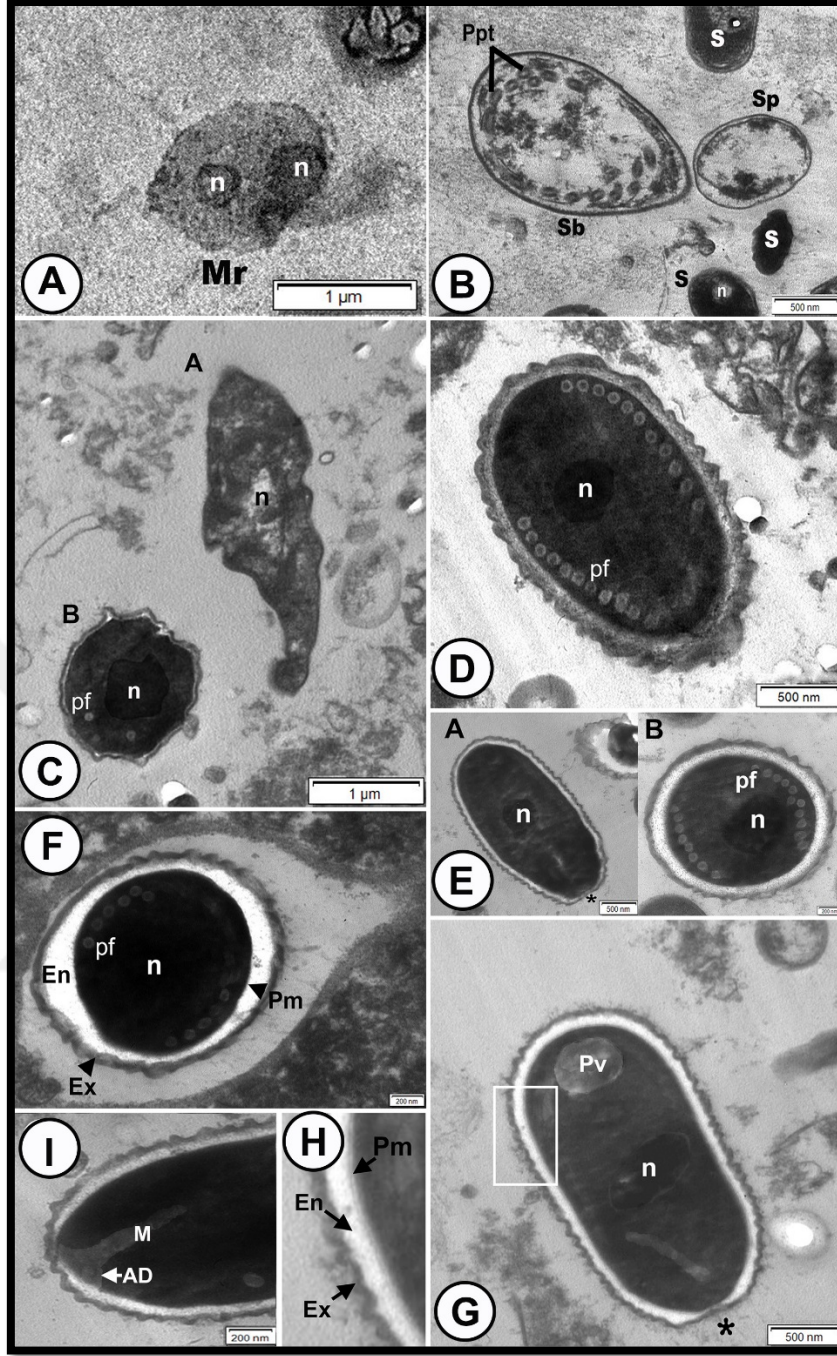
Mikrospor enfeksiyonlarının teşhisinde ve tür tanımlamalarında kullanılan karakteristik safha spor safhasıdır (Şekil 10).



Şekil 10. *X. luteola*' da tespit edilen mikrospor sporları, A: boyuna kesit, B: enine kesit, pf: polar filament

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 (Becnel ve Andreadis, 2014) (Şekil 11).



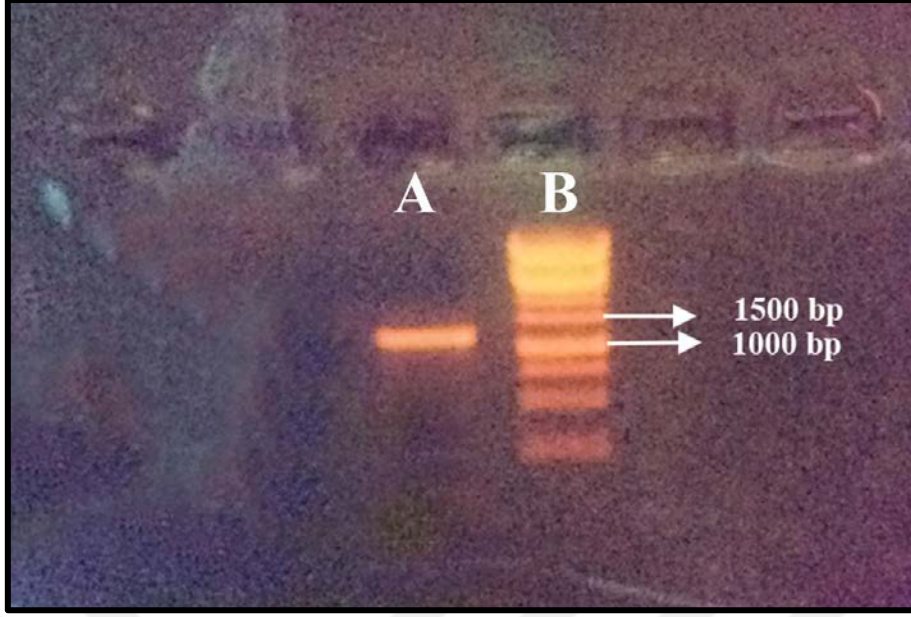


Şekil 11. *X. luteola*' da tespit edilen mikrospora ait olgun spor ve vejetatif safhalara ait TEM fotoğrafları, A: Konak sitoplazması ile doğrudan ilişkili iki çekirdekli (binucleate) meront safhası, B: Küresel sporont ve erken sporoblast safhası, C: (A) erken dönem sporoblast (B) geç dönem sporoblast safhası, D: Olgun spor, E: Boyuna (A) ve enine (B) olgun spor kesiti, F: Olgun spor enine kesit, G: Olgun spor boyuna kesit asteriks ön uçta spor duvarındaki incelleme ve düz yapıyı işaret etmekte, H: Spor duvarı üçlü zar yapısı (trilaminar), I: Olgun spordan ön uç boyuna kesit. Ad Anchoring disc, En Endospore, Ex Exospore, M Manubrium, Mr Meront, n Nucleus, Pf Polar filament, Pm Plasma membrane, Ppt primordial polar tube, Pv Posterior vacuole, S adult spore, Sb sporoblast, Sp sporont.

TEM mikroskobu ile yapılan incelemelerde patojene ait oval sporların tek çekirdekli, monokaryotik olduğu tespit edilmiştir. Yine elde edilen TEM fotoğrafları üzerinde yapılan ölçümlerde spor duvarı kalınlığı 75-115 nm olarak tespit edilmiştir. Spor duvarı ekzospor ve endospor olmak üzere iki tabakadan oluşurken, endospor kalınlığı 65-80 nm, ekzospor kalınlığı ise 34-45 nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca incelenen olgun sporların ön uç (anterior apex) kısımlarında spor duvarının dikkat çekici şekilde incelik (15-20 nm) düzleştiği belirlenmiştir. Mikrospor patojeninin polar filamentleri 11 kıvrımlı ve isofilar polar filament yapısında olduğu belirlenmiştir. Polar filament yapıları üzerinde yapılan ölçümlerde polar filament çapı 67-79 nm olarak belirlenmiştir. Yine bu mikrospora ait polaroplastın lamellar tip olduğu ve anteriörde ince ve posteriörde düzensiz kalın lamellar tip polaroplast olduğu belirlenmiştir.

### **3.3. *X. luteola* Müller’de Tespit Edilen Mikrospor Patojeni Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar**

Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor patojenine ait sporlar üzerinde DNA izolasyonu 16S SSU rRNA amplifikasyonu ve klonlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonucunda elde edilen 16S SSU rRNA’ nın varlığının tespiti ve büyüklüğünün hesaplanabilmesi için etidyum bromür (EtBr) ilave edilmiş %0,9’luk agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen PZR ürününün büyüklüğü hesaplanırken, 100 baz çiftinden (bp) başlayıp 10 kilo baza (kb) varan 16 bantlık bir skala oluşturan DNA ladder kullanılmıştır (Biolabs DNA ladder 1kb). Yürütme işleminin sonunda elde edilen sonuçlar BioDocAnalyze marka UV transilliminatorde görüntülenmiş ve tez konusu olan mikrospor patojenine ait 16S SSU rRNA’nın 1000 bp ile 1500 bp arasında bir büyüklüğe sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. *X. luteola*'da belirlenen mikrospor patojenine ait 16S SSU rRNA'nın agaroz jel görüntüsü; A: Mikrospor patojenine ait 16S SSU rRNA B: DNA ladder,

Tespit edilen mikrospor patojenini diğer mikrosporlarla kıyaslamak için baz dizin analizleri gerçekleştirilmiştir. EcoRI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesim reaksiyonları sonucunda, doğruluğu teyit edilen klonların baz dizin analizleri için MacroGen Inc. firmasının Hollanda şubesine gönderilerek baz dizin uzunluğu 1245 bp olarak tespit edilmiştir ve elde edilen bu baz dizini KR704648 kabul kodu ile NCBI Genbank' a yüklenmiştir (EK-1). Tespit edilen baz dizilimindeki % G+C içeriği Fast PCR programı kullanılarak %36,95 olarak belirlenmiştir.

Baz dizin sonuçları, NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) ara yüzünde diğer kayıtlarla kıyaslanmıştır. Yapılan analiz sonucunda klonlanan 16S SSU rRNA geninin 15 kayıtlı yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

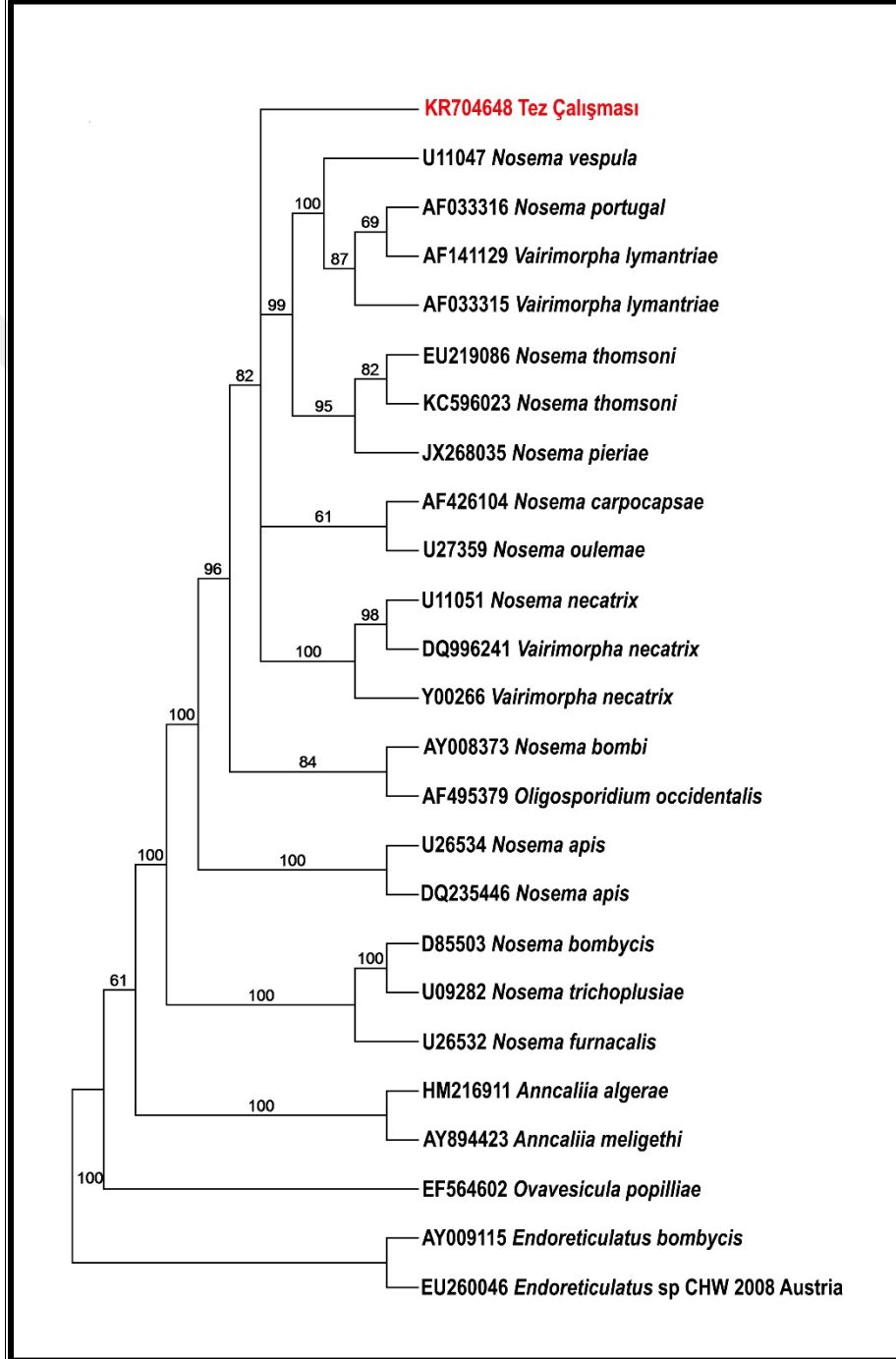
Bu çalışmada karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor patojeninin baz diziliminin yanı sıra, çoğu Lepidoptera takımında doğal enfeksiyona neden olan mikrospor türleri ve ikisi analizlerde dış grup olacak şekilde toplamda 25 farklı veri kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Filogenetik analizlerde kullanılan 16S SSU rRNA baz dizileri

Kabul Kodu	Organizma Adı	Konak	Takım	Familiya
AF426104	<i>Nosema carpocapsae</i>	<i>Cydia pomonella</i>	Lepidoptera	Tortricidae
D85503	<i>Nosema bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae
U11047	<i>Nosema vespula.</i>	<i>Vespula germanica</i>	Hymenoptera	Vespidae
AF033316	<i>Nosema portugal</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae
JX268035	<i>Nosema pieriae</i>	<i>Pieris brassicae</i>	Lepidoptera	Pieridae
EU219086	<i>Nosema thomsoni</i>	<i>Choristoneura conflictana</i>	Lepidoptera	Tortricidae
KC596023	<i>Nosema thomsoni</i>	<i>Choristoneura conflictana</i>	Lepidoptera	Tortricidae
Y00266	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Lepidoptera	Noctuidae
DQ996241	<i>Vairimorpha necatrix</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Lepidoptera	Noctuidae
U27359	<i>Nosema oulemae</i>	<i>Oulema melanopus</i>	Coleoptera	Chrysomelidae
AY008373	<i>Nosema bombi</i>	<i>Bombus agrorum</i>	Hymenoptera	Apidae
AF495379	<i>Oligosporidium occidentalis</i>	<i>Metaseiulus occidentalis</i>	Acari	Phytoseiidae
EU260046	<i>Endoreticulatus sp. CHW-2008 Austria</i>	<i>Thaumetopoea processionea</i>	Lepidoptera	Thaumetopoeidae
U26534	<i>Nosema apis</i>	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	Apidae
DQ235446	<i>Nosema apis</i>	<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	Apidae
U11051	<i>Nosema necatrix</i>	<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Lepidoptera	Noctuidae
AF141129	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae
AF033315	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	<i>Lymantria dispar</i>	Lepidoptera	Erebidae
HM216911	<i>Anncaliia algerae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Primates	Hominidae
AY894423	<i>Anncaliia meligethi</i>	<i>Meligethes aeneus</i>	Coleoptera	Nitidulidae
EF564602	<i>Ovavesicula popilliae</i>	<i>Popillia japonica</i>	Coleoptera	Scarabaeidae
AY009115	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	Bombycidae
U26532	<i>Nosema furnacalis</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Lepidoptera	Crambidae
U09282	<i>Nosema trichoplusiae</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	Lepidoptera	Noctuidae
<b>KR704648</b>	<b><i>Rugispora istanbulensis</i> <i>n. gen., n. sp.</i></b>	<b><i>Xanthogaleruca luteola</i></b>	<b>Coleoptera</b>	<b>Chrysomelidae</b>

PAUP\*, version 4.0a147 for 32-bit Microsoft Windows programı kullanılarak bu verilerle MaximumLikelihood ağaç topolojisi elde edilmiştir. MaksimumLikelihood ağaç topolojisi oluşturulurken dış grup olarak *Endoreticulatus sp. CHW 2008 Austria* ve *Endoreticulatus bombycis* türleri kullanılmıştır. PAUP\*, version 4.0a147 for 32-bit Microsoft Windows programı yardımıyla 1000 bootstrap ve GTR+G evrim modeli kullanılarak 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 16S SSU rRNA'sına ait baz dizisi, MEGA6 programı ile Pairwise distance analizi Kimura-2 modeline göre hesaplanarak türler arasındaki baz farklılıkları da belirlenmiştir (Kimura, 1980; Tamura vd., 2013) (EK - 2).



Şekil 13. PAUP programı ile yapılmış MaximumLikelihood analizi

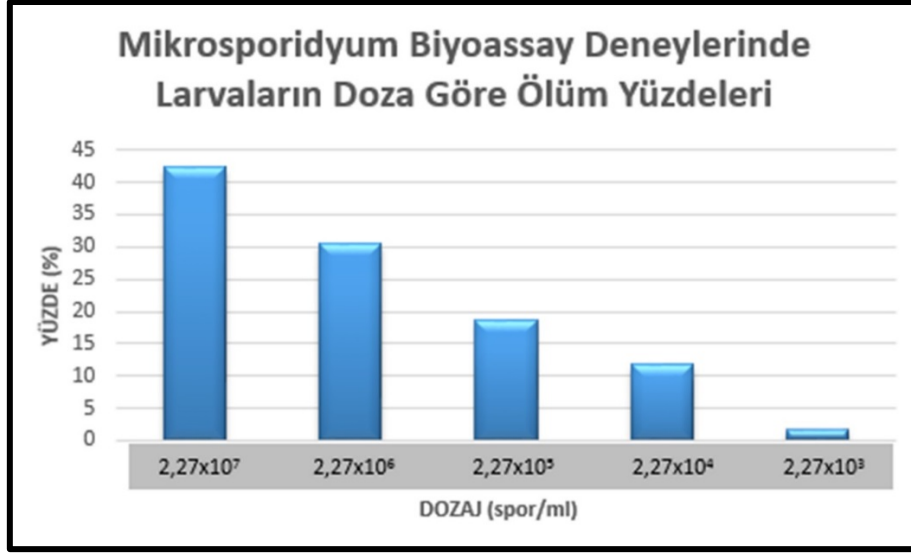
### 3.4. *X. luteola*'da Belirlenen Mikrospor Etmeni Kullanılarak Yapılan Biyoassay Deneyleri

Tez çalışması boyunca enfeksiyon tespit edilen böceklerden izole edilen mikrospor patojeni karaağaç yaprak böceği larvalarına uygulanmıştır. Yapılan bu biyoassay deneyleri ile uygulanan mikrospor patojeninin, karaağaç yaprak böceğinde gerçekleştireceği enfeksiyonun zararlıyı ne şekilde etkileyeceği ortaya konmaya çalışılmıştır. Mikrospor biyoassay deneyleri için toplam 360 tane 2. instar karaağaç yaprak böceği larvası kullanılmıştır. Sonuçların daha güvenilir olabilmesi için deneyler üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Her bir deney için her grupta 20'şer larva olmak üzere 6 grup oluşturulmuştur. Bu gruplardan bir tanesi kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu gruptaki larvalar enfeksiyonsuz besinle beslenmiştir. Diğer gruplarda enfeksiyon dozajları  $2,27 \times 10^7$  spor/ml,  $2,27 \times 10^6$  spor/ml,  $2,27 \times 10^5$  spor/ml,  $2,27 \times 10^4$  spor/ml ve  $2,27 \times 10^3$  spor/ml olarak ayarlanmıştır. Yapılan deneylerde ilk ölüm 7. günde görülmüştür (Tablo 6).

Tablo 6. Biyoassay çalışmalarında larvaların doza göre ölüm zamanları ve yüzdeleri

I. UYGULAMA	Uygulamalar (spor/ml)	Enfekte Larva Sayısı								Enfeksiyon Oranı (%)
		8. Gün	9. Gün	11. Gün	12. Gün	15. Gün	19. Gün	20. Gün	21. Gün	
	$2,27 \times 10^7$	1	1	2	0	0	4	0	2	50
	$2,27 \times 10^6$	0	0	1	0	2	1	1	2	35
	$2,27 \times 10^5$	1	1	0	0	0	0	2	0	20
	$2,27 \times 10^4$	1	1	1	0	0	0	0	0	15
	$2,27 \times 10^3$	0	0	0	0	1	0	0	0	5
	0 (Kontrol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II. UYGULAMA	Uygulamalar (spor/ml)	Enfekte Larva Sayısı								Enfeksiyon Oranı (%)
		7. Gün	9. Gün	10. Gün	13. Gün	17. Gün	19. Gün	20. Gün	21. Gün	
	$2,27 \times 10^7$	0	2	1	0	2	2	0	1	36,8
	$2,27 \times 10^6$	1	0	0	2	1	0	0	2	26,3
	$2,27 \times 10^5$	0	0	0	2	1	1	0	0	15,8
	$2,27 \times 10^4$	0	1	1	0	0	0	0	1	10,5
	$2,27 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0 (Kontrol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III. UYGULAMA	Uygulamalar (spor/ml)	Enfekte Larva Sayısı								Enfeksiyon Oranı (%)
		8. Gün	10. Gün	11. Gün	12. Gün	16. Gün	17. Gün	19. Gün	21. Gün	
	$2,27 \times 10^7$	0	2	1	0	2	1	0	2	40
	$2,27 \times 10^6$	0	0	1	2	0	2	0	1	30
	$2,27 \times 10^5$	1	0	0	2	0	0	0	1	20
	$2,27 \times 10^4$	0	1	0	0	1	0	0	0	10
	$2,27 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0 (Kontrol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Deney sonlandırıldığında dozajı  $2,27 \times 10^7$  spor/ml olan gruptaki ölüm oranı %42,27,  $2,27 \times 10^6$  spor/ml olan gruptaki ölüm oranı %30,4,  $2,27 \times 10^5$  spor/ml olan gruptaki ölüm oranı %18,6,  $2,27 \times 10^4$  spor/ml olan gruptaki ölüm oranı %11,8 ve  $2,27 \times 10^3$  spor/ml olan gruptaki ölüm oranı %1,7 olarak bulunmuştur. Spor dozu azaldıkça ölüm yüzdesinin doğrusal bir şekilde azalmakta olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Biyoassay çalışmalarında larvaların doza göre ölüm yüzdeleri

### 3.5. İklim Verilerinin Tespit Edilen Mikrospor Enfeksiyonu Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik İstatistiksel Analizler

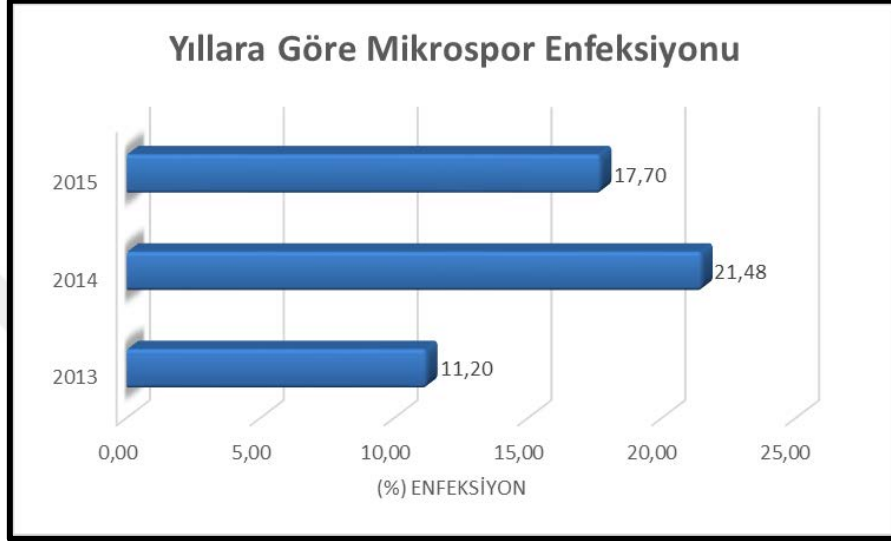
Yapılan bu tez çalışmasında 2013-2015 yılları boyunca İstanbul ilinde yapılan arazi çalışmalarında karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun yıl, ay, nem, yağış ve sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerden etkilenip etkilenmediği istatistiki analizlerle değerlendirilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen ortalama mikrospor enfeksiyon değerleri

YIL	AY	Ortalama Değerler			
		YAĞIŞ	%NEM	SICAKLIK °C	%ENFEKSİYON
2013	Mayıs	25,60	66,22	19,96	10,0
	Haziran	67,40	61,51	22,98	10,4
	Temmuz	3,60	62,63	24,98	5,5
	Ağustos	9,60	66,60	26,16	15,6
	Eylül	11,20	61,47	21,34	14,5
2014	Mayıs	60,00	70,27	18,37	5,8
	Haziran	47,80	70,27	22,08	5,7
	Temmuz	45,80	68,65	25,21	5,0
	Ağustos	57,80	71,51	25,75	50,9
	Eylül	135,80	73,72	21,21	40,0
2015	Mayıs	4,60	67,73	18,50	5,8
	Haziran	30,20	69,41	21,70	5,7
	Temmuz	0,40	64,81	24,78	33,9
	Ağustos	25,20	67,60	25,88	29,7
	Eylül	37,70	81,67	23,46	13,4

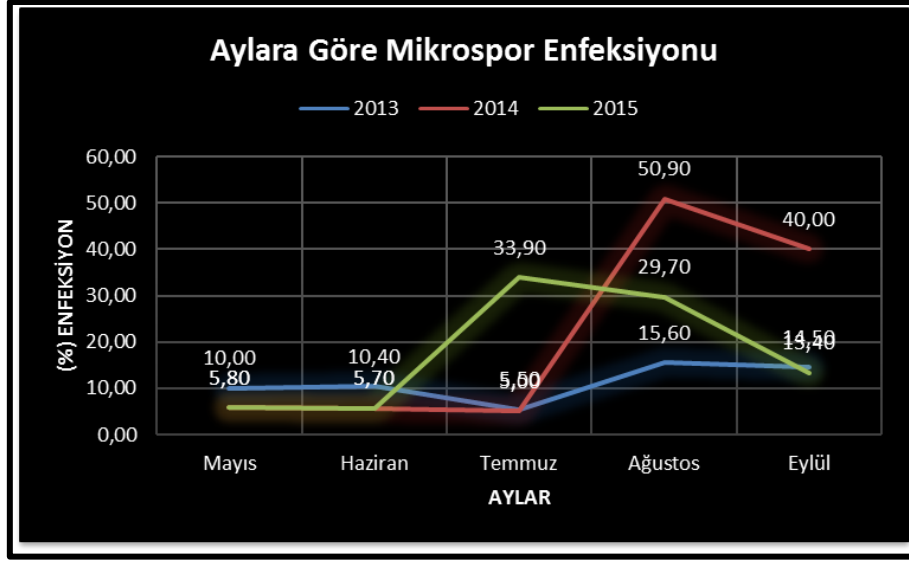


Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonu örnekleme yapılan popülasyonlarda rastlanma sıklığı yüzdece yıllara göre değerlendirildiğinde 2014 yılı ortalama %21,48'lik enfeksiyon oranı ile enfeksiyonun en sık rastlandığı yıl olurken, 2013 yılı ortalama %11,20 enfeksiyon oranı ile enfeksiyon yoğunluğunun en az olduğu yıl olarak tespit edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun yıllara göre rastlanma sıklığı

Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen enfeksiyon yoğunluğu arazi çalışmalarının yürütüldüğü aylara göre değerlendirildiğinde 2013-2014 yıllarında Ağustos ayı sırası ile %15,60 ve %50,90 enfeksiyon oranları ile enfeksiyonun en yoğun görüldüğü ay olurken, 2015 yılında %33,90 oran ile enfeksiyon en yoğun Temmuz ayında belirlenmiştir. Aylar bazında yapılan bu değerlendirmede örnekleme yapılan üç yıl kendi içerisinde ay bazında farklılıklar barındırır da Mayıs ve Haziran ayları her üç yıl içinde enfeksiyon oranının en az olduğu aylar olarak tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun aylara göre rastlanma sıklığı

Bu çalışmada yağış, sıcaklık ve nem gibi iklim verilerinin mikrospor enfeksiyonu üzerinde bir belirleyiciliği olup olmadığını anlamak için 2013-2015 yıllarının Mayıs-Eylül aylarında ki iklim verileri ile mikrospor enfeksiyonu rastlanma sıklığı kıyaslanmıştır. Yapılan inceleme de yağış etkeninin mikrospor enfeksiyonu üzerinde direk etkisinin olmadığı, yağışın en az olduğu dönemlerde (metrekareye 0,40 mm) de enfeksiyonun nispeten yoğun bir şekilde (%33,90) rastlanması ile tespit edilmiştir (Şekil 17). Ayrıca enfeksiyonun en yoğun olduğu (%50,90) 2014 yılının Ağustos döneminde yağış değeri metrekareye 57,80 mm olarak tespit edilirken, en düşük enfeksiyon yoğunluğu (%5,00) yine aynı yılın Temmuz döneminde metrekareye 45,80 mm'lik yağış değerinde tespit edilmiştir.



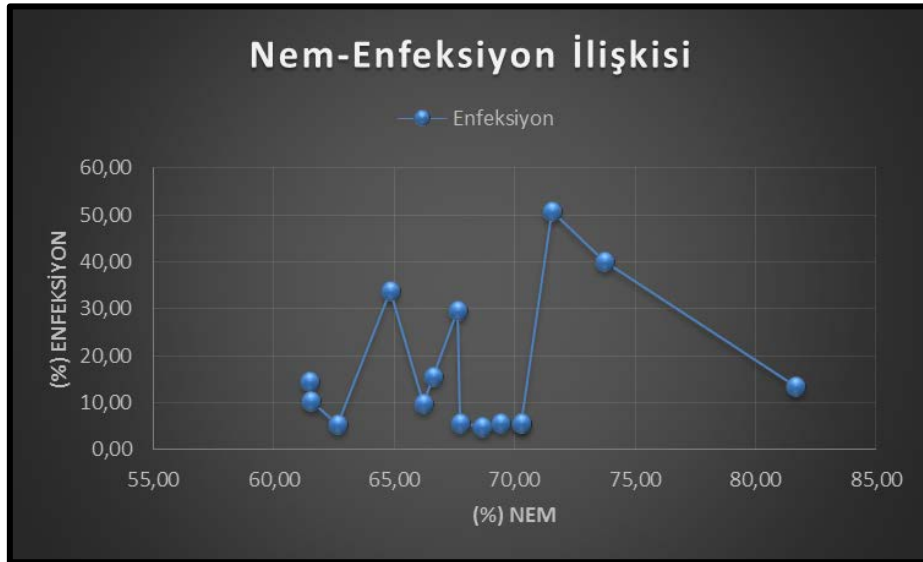
Şekil 17. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun yağış değişkenine göre rastlanma sıklığı

Doğal ortamında sıcaklık değişiminin mikrospor enfeksiyonuna olan etkisinin tespiti için elde edilen sıcaklık verileri, en düşük olan 18,37 °C'den en yüksek olan 26,16 °C'ye göre 17 – 27 °C arasında 2 °C'lik aralıklarla gruplandırılarak, sıcaklık etkeninin enfeksiyon dağılımına olan etkisi grafikleştirilmiştir. Elde edilen grafiğe göre en yüksek enfeksiyon oranı (%50,90) 25,75 °C'de rastlanırken, en düşük enfeksiyon oranı (%5,00) 25,21 °C'de rastlanmıştır (Şekil 18). Sıcaklıkla enfeksiyon arasındaki bu tutarsız ilişki enfeksiyon üzerinde etkili olan diğer değişkenlerin rolü ile açıklanabilir. Bu durum yapılan diğer kıyaslama ve istatistiki analizlerde bu çalışma kapsamında ortaya konmuştur.



Şekil 18. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun sıcaklık değişkenine göre rastlanma sıklığı

Bu çalışmada mikrospor enfeksiyonu üzerine etkisi araştırılan bir diğer değişken olan nem değişkeni açısından mevcut tablo incelendiğinde en yüksek enfeksiyon oranı %71,51'lik nisbi nem oranında tespit edilirken, en düşük enfeksiyon oranı %68,65'lik nem oranında tespit edilmiştir. Diğer dikkat çekici bir bulgu ise nisbi nem oranının %70-75 olduğu bantta enfeksiyonun hızlı bir artış eğilimine girdiği ve %75'lik nem oranından daha yukarı değerlerde ise enfeksiyonun tekrardan azalma eğilimine girdiği tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor enfeksiyonunun nem değişkenine göre rastlanma sıklığı

Yapılan bu tez çalışmasında ayrıca elde edilen iklim verileri ile mikrospor enfeksiyonu arasındaki korelatif ilişkinin boyutunu belirlemeye yönelik korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Veriler üzerinde yapılan Kolmogorov-Smirnov Testi'ne (Justel vd., 1997) göre korelasyon analizi Spearman (Spearman, 1904) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda nem etkeninin mikrospor enfeksiyonu üzerinde en belirleyici değişken olduğu tespit edilirken ( $r = 0,455$ ;  $P < 0,01$ ); yıl değişkeni ile mikrospor enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir ( $r = 0,098$ ;  $P > 0,05$ ) (Tablo 8).

Tablo 8. Mikrospor enfeksiyonu ve iklim verileri arasındaki ilişkiye dönük yapılan Spearman korelasyon testi sonuçları

	Yıl	Ay	Nem	Yağış	Sıcaklık	Enfeksiyon
Yıl	1,000	-0,084	0,175**	-0,282**	0,148*	0,098
Ay	-0,084	1,000	0,525**	0,420**	0,011	0,445**
Nem	0,175**	0,525**	1,000	0,726**	-0,146*	0,455**
Yağış	-0,282**	0,420**	0,726**	1,000	-0,291**	0,421*
Sıcaklık	0,148*	0,011	-0,146*	-0,291**	1,000	0,256**
Enfeksiyon	0,098	0,445**	0,455**	0,421**	0,256**	1,000

\*\* =  $P < 0,01$  anlamlılık düzeyi \* =  $P < 0,05$  anlamlılık düzeyi

Bu çalışmada yapılan korelasyon analizi sonucunda mikrospor enfeksiyonu üzerinde etkinlikleri tespit edilen farklı iklim, yıl ve ay verilerinde meydana gelen değişimlerin enfeksiyon yoğunluğu üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu anlamak için söz konusu bu değişkenler üzerinde Çoklu Regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu analiz sonucunda mikrospor enfeksiyon yoğunluğu %58 oranında bu değişkenlere bağlı olarak değiştiği ve mikrospor enfeksiyonu ile değişkenler arasındaki ilişkinin  $P < 0,01$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca söz konusu bu ilişkinin  $F(5,246) = 68,510$ ;  $P < 0,01$  formülü ile formüle edilebildiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan regresyon denklemi katsayılarının anlamlılık düzeylerine dönük yapılan analiz sonucunda elde edilen **Enfeksiyon = -0,508 Nem + 7,603 Yağış + 3,967 Sıcaklık + 5,260 Yıl + 1,592 Ay - 10641,61** denklemi ile söz konusu etkenlerde meydana gelen değişimlerin mikrospor enfeksiyon yoğunluğunu nasıl etkilediği ortaya konmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

İnsanoğlu uzun yıllar ormanları odun üretimi yapılan sonsuz kaynaklar olarak değerlendirmiştir. Oysaki ormanlar yakacak odun yanında gıda, ilaç hammaddesi vb. ürünler ile yaşam için gerekli olan temiz hava, oksijen ve su gibi paha biçilmez türevler de sağlamaktadır. Bu nedenle gerek içinde barındırdığı canlıların çeşitliliği gerekse başta insanlar olmak üzere diğer canlılara sağladığı çeşitli kaynaklar sebebiyle ormanlar vazgeçilmez bir hazinedir. Doğal dengenin ve canlılığın sürdürülebilmesi için bu denli önemli olan orman alanları; aşırı ve bilinçsiz faydalanma, orman direncini bozan müdahaleler, yangınlar, çevre kirliliği, hastalıklar ve böcek salgınları sayesinde tahribata uğrayıp yok olmaktadır (Kaplan, 2014).

Orman alanları üzerinde ciddi kayıplar meydana getiren hastalık ve böcek salgınları gibi olumsuz etkenler ile mücadele genellikle kimyasal madde kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ancak kimyasal mücadele tekniklerinin gerek insan gerekse çevre üzerinde neden olduğu olumsuzluklardan dolayı son yıllarda alternatif mücadele yöntemleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Acar, 2014). Bu çalışmalar içerisinde biyolojik mücadele metotları hastalık ve zararlı böceklerle karşı etkinliklerinin yanı sıra doğal dengenin korunmasına yönelik faydaları bakımından gelecek vadetmektedir. Özellikle zararlı böcekler üzerinde doğal olarak hastalığa neden olan patojenlerin tespitine ve tanımlanmasına yönelik çalışmalar oldukça dikkat çekmektedir. Ancak bu alanda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Bekircan, 2012).

Bu doktora tezinde dünyada ve Türkiye’de karaağaç türleri üzerinde büyük zararlara neden olan karaağaç yaprak böceği; *X. luteola*’da doğal olarak enfeksiyona neden olan Microsporidia grubundan patojenlerinin varlığı araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma ülkemizde ilk defa *X. luteola*’nın doğal hastalık etmenlerini belirlemeye yönelik yapılmış bir çalışma olup, bu çalışma ile söz konusu böceğin Microsporidia patojenleri açısından ülkemiz için ilk ve dünya literatürü için yeni bir mikrosporidium kaydı yapılmıştır. Söz konusu bu çalışmada, varlığı belirlenen mikrosporidium patojeninin tespiti ve karakterizasyonu için ışık, elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Türkiye’nin farklı illerinde yapılan arazi çalışmaları ile patojenin ülkemizdeki doğal yayılım alanları belirlenmiştir. Yine bu tez çalışması ile belirlenen diğer önemli bir bulgu ise örnekleme yapılan alanlardaki iklim verileri ile patojenin dağılımı arasındaki ilişki farklı istatistiksel analizlerle ortaya konmuştur.

Günümüze kadar karaağaç yaprak böceğinde doğal olarak hastalığa neden olan tek mikrosporidium türü; Toguebaye ve Bouix tarafından 1989 yılında Fransa’nın Montpellier

bölgesinde tespit edilen *Nosema* cinsine ait *Nosema galerucellae* türüdür. Işık ve elektron mikroskopisi yardımı ile tespiti yapılan bu mikrospor türü; diplokaryotik safhaların varlığı, homojen ekzospor, spor duvarı kalınlığı, sistemik enfeksiyona neden olma, horizontal ya da vertikal taşınım ve spor kesesinin bulunmaması gibi *Nosema* cinsine ait tipik taksonomik özelliklere sahiptir (Larsson, 1986, 1988, 1999).

Elektron mikroskopunun keşfinden önce 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 tanımlama açısından gereksiz çalışmalar olarak sonuçlanmıştır (Malone ve Mcivor, 1996). Günümüzde mikrosporların sınıflandırılmasında; spor şekli, spor duvarı kalınlığı, polar filament halka sayısı, polar filament çapı, polaroplast şekli, spor büyüklüğü, enfeksiyon bölgesi ve hayat döngüsü gibi farklı taksonomik karakterler önem arz etmektedir (Larsson, 1986). Bu taksonomik karakterler doğrultusunda, tez konusu olarak üzerinde çalışılan mikrospor patojeninden elde edilen sonuçlar ve *Nosema galerucellae*'nin bazı karakteristik özellikleri Tablo 9' da özetlenmiştir.

Tablo 9. Bu çalışmada tespit edilen mikrospor ve *Nosema galerucellae*'nin taksonomik karakterlerinin karşılaştırması

		<i>Nosema galerucella</i> (Toguebaye ve Bouix, 1989)	Tez Çalışması 2016
Lokalite		Montpellier, Fransa	İstanbul, Türkiye
Konak		<i>Xanthogaleruca luteola</i> Müller, 1766	<i>Xanthogaleruca luteola</i> Müller, 1766
Enfekte Organlar		Bağırsak, Malpigi tüpleri, Yağ doku, Kas doku, Trake	Bağırsak
Spor Şekli		Oval	Oval
Spor Boyutu		4,95 × 2,89 µm	3,40 ± 0,37 × 1,63 ± 0,20 µm
Ultrastrüktürel Karakterler	Spor duvarı kalınlığı	80 – 100 nm	75 - 115 nm
	Polar filament	7-9	11
	Polar filament çapı	54 – 69 nm	67 - 79 nm
	Polar filament tipi	Anisofilar	İsofilar
	Polaroplast	Lamellar	Lamellar
	Çekirdek	Diplokaryotik	Monokaryotik

Karaağaç yaprak böceği üzerinde Toguebaye ve Bouix'in 1989 yılında Fransa'da ışık ve elektron mikroskopisi kullanarak tanımladığı *Nosema galerucellae*, günümüze kadar bu böcekte tespit edilen tek mikrospor türüdür. Yapılan bu çalışmaya göre *N. galerucellae* sporları konak böceğin bağırsak, Malpigi tüpleri, yağ dokusu, kas dokusu ve trake sistemini enfekte ederken spor şekli oval ve spor ölçüleri 4,95 × 2,89 µm olarak belirlenmiştir. *N. galerucellae*'nin tanımlanmasında da belirtilen spor şekli, spor boyutu, enfeksiyon gerçekleştirilen konak türü ve enfekte edilen doku tipi gibi parametreler mikrosporların sistematüğinde büyük önem taşımaktadır (Larsson, 1986; Sprague, 1982, Sprague vd., 1992). Benzer özellikler açısından bu tez çalışmasında tespit edilen mikrospor türü irdelendiğinde söz konusu mikrospor türü; konak böceğin yalnızca bağırsak dokusunu enfekte ederken, oval şekilli taze sporlar 4,25 ± 0,52 (3,3–6,35; n = 500) µm boy ve 2,12 ± 0,25 (1,45–2,91; n = 500) µm en olarak ölçülmüştür. Ayrıca mikrospor sistematüğünde önemli bir parametre olan Giemsa boyalı preparatlar incelendiğinde bahsi geçen mikrospor türünün *N. galerucellae*'dan farklı olarak



monokaryotik olduğu tespit edilirken boyalı sporlar üzerinde yapılan yeniden ölçümlerde spor boyutları  $3,40 \pm 0,37$  (2,50–4,17; n = 970)  $\mu\text{m}$  boy ve  $1,63 \pm 0,20$  (0,92–2,51; n = 970)  $\mu\text{m}$  en olarak tespit edilmiştir. Yine Giemsa boyalı preparatlar üzerinde yapılan incelemelerde sırası ile farklı hayat safhaları olan meront, sporont ve sporoblast safhaları tespit edilmiştir. Yapılan incelemelerde tek çekirdekli ve iki çekirdekli merontlara rastlanmıştır. Küresel şekilli tek çekirdekli merontlar  $5,14 \pm 1,29$  (2,61–8,36; n = 30)  $\times$   $4,89 \pm 0,87$  (2,83–6,57; n = 30)  $\mu\text{m}$  iken, iki çekirdekli merontlar  $7,18 \pm 1,54$  (5,05–11,01; n = 23)  $\times$   $6,25 \pm 1,87$  (3,78–10,83; n = 23)  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde *N. galerucellae*'ya ait oval ya da küresel şekilli iki çekirdekli merontlar  $4,8 \times 5,2$   $\mu\text{m}$  iken, dört çekirdekli merontlar  $5,4 \times 5,8$   $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Yine Toguebaye ve Bouix (1989)'in yapmış olduğu aynı çalışmada sırası ile iki çekirdekli sporontlar  $4,2 \times 4,8$   $\mu\text{m}$  olarak ölçülürken, iki çekirdekli sporoblastlar  $4,2 \times 5,4$   $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Söz konusu bu tez çalışmasında tespit edilen mikrospor türüne ait sporont safhası üzerinde yapılan ölçümler de ise tek çekirdekli oval sporontlar  $3,88 \pm 0,53$  (2,88–5,43; n = 48)  $\times$   $1,66 \pm 0,35$  (1,09–2,52; n = 48)  $\mu\text{m}$  olarak ölçülürken, uzamış sporoblast yapıları  $5,70 \pm 1,16$  (4,11–9,35; n = 38)  $\times$   $2,25 \pm 0,47$  (1,54–4,43; n = 38)  $\mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür.

Mikrosporları sınıflandırmada kullanılan önemli bir taksonomik karakterde ultrastrüktürel yapılardır. Söz konusu bu yapılar; polar filament halka sayısı, polar filament çapı, polar filament tipi, spor duvarı yapısı ve kalınlığı son olarak da polaroplast tipi olarak sıralanabilir (Larsson, 1986). Bu karakterler üzerinde yapılan incelemelerde tez konusu olan mikrospor patojeninin isofilar tip olan polar filament halka sayısı 11 olarak tespit edilirken polar filament çapı ise 67 - 79 nm arasında ölçülmüştür. Spor duvarı üzerinde yapılan detaylı incelemelerde ise elektronca geçirgen olan endospor tabakası kalınlığı 65 – 80 nm arasında değişirken, kırışık şekilli ekzospor tabakası kalınlığı 34 – 45 nm arasında ölçülmüştür. Kısmen ince olan spor duvarı üzerinde yapılan ortalama kalınlık ölçümlerinde ise spor duvarı kalınlığı 75 – 115 nm arasında ölçülmüştür. Yapılan bu spor duvarı ölçümleri esnasında dikkat çeken bir diğer husus ise olgun sporların ön uç kısımlarında spor duvarı yapısı düzleşip en ince halini almış olmasıdır. Bu bölgede yapılan detaylı ölçümlerde ortalama spor duvarı kalınlığı 15 – 20 nm olarak ölçülmüştür. *N. galerucellae* türünde ise polar filament tipi anisofilar iken polar filament halka sayısı 7 – 9 olarak belirlenmiştir. Yine Toguebaye ve Bouix (1989) tarafından yapılan ölçümlerde polar filament çapı 54 – 69 nm, spor duvarı kalınlığı ise 80 – 100 nm olarak saptanmıştır. Yapılan tüm bu kıyaslamaların sonucunda, tez konusu olan mikrospor türünün başta monokaryotik olmasının yanında gerek gelişim safhalarının farklılığı gerekse spor morfolojisi ve ultrastrüktürel yapılarının farklılığından dolayı daha önce karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen *Nosema galerucellae*'dan çok farklı olduğu hatta *Nosema* cinsine ait

olan karakteristik özelliklerden hiçbirini taşımadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu tez çalışması ile tespit edilen mikrospor, tip türleri Coleoptera takımına ait böceklerde tanımlanmış olan *Anncaliia*, *Canningia*, *Chytridiopsis*, *Endoreticulatus* ve *Ovavesicula* cinslerine ait mikrospor türleri ile spor morfolojisi, ultrastrüktürel özellikler ve gelişim safhaları açısından kıyaslanmıştır (Becnel ve Andreadis, 2014).

*Anncaliia meligethi*, ilk defa 1993 yılında Issi ve arkadaşları tarafından polen böceği *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) da tanımlanmıştır. Bu mikrospor türü diplokaryotik gelişim safhası ve diplokaryotik oval sporları ile karakterize edilmiştir. Ayrıca bu mikrospor cinsine özgü olarak olgun sporların spor duvarlarında tübüler çıkıntılar barındırması ile dikkat çekmektedir (Issi vd., 1993). *Chytridiopsis* cinsi günümüzde ilkel mikrosporlar olarak değerlendirilmektedir (Larsson, 2014). Bu cinsin tip türü *Chytridiopsis socius*, karafatma olarak bilinen *Blaps mortisaga* (Coleoptera: Tenebrionidae) da tanımlanmıştır. Bu tür konak dokusuyla oluşturulmuş vakuol içerisinde sporülasyonunu tamamlamaktadır. Olgun sporlar küresel şekilli olup endospor yapısı ve organelleri indirgenmiştir. Ayrıca olgun sporlarda polaroplast yapısı tamamen ortadan kalkarak petek görünümü almıştır (Schneider, 1884). *Canningia spinidentis* 1995 yılında *Pityokteines spinidens* (Coleoptera: Scolytidae) köknar kabuk böceğinde tanımlanmıştır. Bu tür, konak hyaloplazmasında monokaryotik olarak gelişim göstermektedir. Olgun monokaryotik sporlar uzamış oval ya da tübüler yapıdadır. Konakta özellikle yağ dokusu ve Malpighi tüplerini enfekte eden bu mikrospor türü genellikle sistemik enfeksiyon oluşturmaktadır (Weiser vd., 1995). Tip türü Coleoptera takımında tanımlanmış bir diğer mikrospor türü ise *Endoreticulatus fidelis*'dir. 1988 yılında Brooks ve arkadaşları tarafından patetes böceği *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) da tanımlanan bu tür, konağın orta bağırsağında konak endoplazmik retikulumundan meydana gelen parazitofor keseleri içerisinde multiple fizyonla çoğalan tamamen monokaryotik bir türdür. Olgun monokaryotik sporları ovoküler yapıları ile karakterize edilmiştir (Brooks vd., 1988). *Ovavesicula popilliae*, 1987 yılında *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) da tanımlanmıştır. İkili gelişim safhasına sahip olan bu tür gelişiminin ilk safhasında diplokaryotik ara sporlar oluşturduktan sonra bu çift çekirdekli sporlar dört kez sitokinez gerçekleştirmeden karyokinez geçirerek otuz iki çekirdekli plazmodyumlar meydana getirirler. Daha sonra her plazmodyumda sitokinez geçirerek otuz iki adet monokaryotik olgun spor meydana getirmektedir. Olgun sporlar oval ya da küresel şekilli olup larva dönemindeki konağın Malpighi tüplerinde bulunur (Andreadis ve Hanula, 1987). Bu tez çalışması ile karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor ile yukarıda da bahsi geçen tip türler arasında bir benzerlik olmadığı hatta taksonomik karakterler açısından cins düzeyin birbirinden çok farklı oldukları

tespit edilmiştir. Coleoptera takımına ait böceklerde tespit edilen bu tip türlere ve tez konusu mikrospora ait taksonomik özellikler Tablo 10'da belirtilmiştir.



Tablo 10. Bu tez çalışması ile tespit edilen mikrospor ve Coleoptera takımına ait böceklerde tanımlanmış diğer mikrospor türlerinin taksonomik karakterlerinin karşılaştırması

	<i>Anncaliia meligethi</i> (Issi vd., 1993)	<i>Chytridiopsis socius</i> (Schneider, 1884)	<i>Canningia spinidentis</i> (Weiser vd., 1995)	<i>Endoreticulatus fidelis</i> (Brooks vd., 1988)	<i>Ovavesicula popilliae</i> (Andreadis ve Hanula, 1987)	Tez Çalışması 2016	
Lokalite	Rusya	-	Flatz, Avusturya	New York, Amerika	Connecticut, Amerika	İstanbul, Türkiye	
Konak	<i>Meligethes aeneus</i>	<i>Blaps mortisaga</i>	<i>Pityokteines spinidens</i> Yağ dokusu, Malpighi tüpleri, Kas doku, Bağ doku ve Gonadlar	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Popillia japonica</i>	<i>Xanthogaleruca luteola</i>	
Enfekte Organlar	Yağ ve Kas dokusu	Bağırsak	Malpighi tüpleri, Kas doku, Bağ doku ve Gonadlar	Orta bağırsak	Malpighi tüpleri ve Bağırsak	Bağırsak	
Spor Şekli	Oval ya da Piriform	Küresel	Oval ya da Tübüler	Ovoküler ya da Reniform	Küresimsi oval	Oval	
Spor Boyutu	4-5 × 2-3 µm	1,5 × 2,0 µm	1,9-2,0 × 0,8-1,0 µm	2,62 × 1,51 µm	2,0-2,5 × 1,7-1,8 µm	3,40 ± 0,37 × 1,63 ± 0,20 µm	
Ultrastrüktürel Karakterler	Spor duvarı kalınlığı	150-180 nm	-	100-150 nm	-	115-120 nm	75-115 nm
	Polar filament	13-15	-	5-6	5-7	6	11
	Polar filament çapı	-	-	-	-	-	67-79 nm
	Polar filament tipi	Anisofilar	-	İsofilar	-	İsofilar	İsofilar
	Polaroplast	Lamellar ve Tübular	-	Lamellar	-	Lamellar	Lamellar
	Çekirdek	Diplokaryotik	Monokaryotik	Monokaryotik	Monokaryotik	Diplokaryotik/Monokaryotik	Monokaryotik

Son yıllarda mikrosporları tür düzeyinde birbirleri ile karşılaştırmada 16S SSU rRNA geninin V4 bölgesindeki nükleotid dizilerinin kıyaslanması yaygın şekilde kabul gören bir taksonomik parametredir (Malone vd., 1994). Eubakteriler gibi mikrosporlar dışındaki diğer organizma guruplarında 16S SSU rRNA genindeki nükleotid dizileri türden türe bir veya iki nükleotidlik farklar gösterirken, mikrosporlarda büyük farklar göstermektedir (Dams vd., 1988; Barry vd., 1990). Mikrospor türleri arasındaki 16S SSU rRNA geni açısından bu büyük farklılığın nedeni ise çok sayıda hayvan türü üzerinde zorunlu parazit olarak evrimleşmelerinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir (Vossbrinck vd., 1987).

Bu tez çalışmasında, çalışma konusu olan mikrosporun tanımlanmasında ultrastrüktürel çalışmaların yanı sıra moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sırası ile DNA izolasyonu, 16S SSU rRNA amplifikasyonu, klonlama ve baz dizin analizleri olarak gruplandırılabilir. Klonlaması gerçekleştirilen 16S rDNA'nın SSU rRNA genine ait kısmi baz dizisi büyüklüğü 1245 bp olarak tespit edilmiştir ve elde edilen bu baz dizini KR704648 kabul kodu ile NCBI Genbank'a yüklenmiştir. Bu patojenin filogenetik açıdan durumunun ortaya konulması için NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) ara yüzünde diğer kayıtlarla kıyaslama yapılmıştır. Yapılan analizde örtüşme ve benzerlik katsayısı dikkate alınarak on beş mikrospor sekansı analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Ayrıca cinslerini temsil eden tip türlere ait dokuz sekans da literatürden seçilerek filogenetik analizlere dahil edilmiştir.

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 16S SSU rRNA genindeki G+C içeriği %33,93 – 38,73 iken, bu oran *Endoreticulatus* türlerinde %50,96 – 51,12 olarak tespit edilmiştir (Dong vd., 2010). Fast PCR programı kullanılarak karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen ve tez çalışma konusu olan mikrospor da %G+C içeriği ise %36,95 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca filogenetik analizlerde kullanılan diğer mikrospor türlerine ait %G+C içerikleri de hesaplanarak sonuçlar Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor ve filogenetik analizlerde kullanılan diğer mikrospor kayıtlarına ait G+C, benzerlik, örtüşme ve Kimura-2 parametresine göre baz farklılık değerleri. “-“ Belirli bir benzerlik yoktur.

KR704648	<i>Rugispora istanbulensis</i> n. gen., n. sp.	Örtüşme	Benzerlik	Baz Farklılığı	G+C İçeriği (%36,95)
AF426104	<i>Nosema carpocapsae</i>	%99,0	%97,0	0,0296	%35,24
D85503	<i>Nosema bombycis</i>	%99,0	%83,0	0,1940	%34,09
U11047	<i>Nosema vespula.</i>	%100	%97,0	0,0296	%36,79
AF033316	<i>Nosema portugal</i>	%100	%97,0	0,0314	%35,75
JX268035	<i>Nosema pieriae</i>	%93,0	%96,0	0,0306	%36,50
EU219086	<i>Nosema thomsoni</i>	%100	%97,0	0,0296	%36,88
KC596023	<i>Nosema thomsoni</i>	%99,0	%97,0	0,0305	%36,95
Y00266	<i>Vairimorpha necatrix</i>	%100	%95,0	0,0415	%37,38
DQ996241	<i>Vairimorpha necatrix</i>	%100	%96,0	0,0405	%37,05
U27359	<i>Nosema oulemae</i>	%100	%96,0	0,0341	%36,85
AY008373	<i>Nosema bombi</i>	%100	%95,0	0,0479	%38,09
AF495379	<i>Oligosporidium occidentalis</i>	%99,0	%95,0	0,0527	%38,39
EU260046	<i>Endoreticulatus</i> sp. CHW-2008 Austria	%23,0	%77,0	0,4279	%51,27
U26534	<i>Nosema apis</i>	%100	%94,0	0,0584	%38,65
DQ235446	<i>Nosema apis</i>	%99,0	%94,0	0,0584	%38,69
U11051	<i>Nosema necatrix</i>	%100	%96,0	0,0406	%37,05
AF141129	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	%98,0	%97,0	0,0314	%35,89
AF033315	<i>Vairimorpha lymantriae</i>	%100	%97,0	0,0314	%35,38
HM216911	<i>Anncaliia algerae</i>	-	-	0,4675	%46,91
AY894423	<i>Anncaliia meligethi</i>	-	-	0,4722	%47,07
EF564602	<i>Ovavesicula popilliae</i>	%3,0	%94,0	0,6044	%60,95
AY009115	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	%60,0	%78,0	0,4222	%51,30
U26532	<i>Nosema furnacalis</i>	%99,0	%84,0	0,1937	%33,93
U09282	<i>Nosema trichoplusia</i>	%99,0	%83,0	0,1940	%34,09

Analiz sonucunda *Nosema* türlerinde G+C içeriği %33,93-38,69 arasında değişirken, *Vairimorpha* türlerinde %35,38-37,38; *Anncaliia* türlerinde %46,91-47,07 ve *Endoreticulatus* türlerinde %51,27-51,30 olarak belirlenmiştir. Yüzde G+C içeriği dikkate alındığında tez konusu mikrospor %36,95’lik G+C içeriği ile *Nosema* ve *Vairimorpha* türlerine yakınlık göstermektedir. Ancak Kimura-2 modeline göre yapılan baz farklılığı testinde; sırası ile bu cinslerin tip türleri olan *Nosema bombycis*’den %19,40 ve *Vairimorpha necatrix*’den %4,0 farklı olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmayla tespit edilen mikrosporum filogenetik durumunun tam olarak anlaşılması için PAUP\* 4.0a147 for 32-bit Microsoft Windows programı kullanılarak MaximumLikelihood ağaç topolojisi elde edilmiştir. MaximumLikelihood ağaç topolojisi hazırlanırken dış grup olarak *Endoreticulatus bombycis* ve *Endoreticulatus* sp. CHW-2008 Austria kullanılmıştır. MaximumLikelihood analizi sonucuna bakıldığında tez konusu mikrosporum, *Nosema* ve

*Vairimorpha* türlerinin bulunduğu grupta politomi oluşturduğu görülmüştür. Bu durum Microsporidia grubunda sık görülen bir durum olup rRNA'nın küçük alt birimlerine göre yapılan filogenetiğin, Microsporidia sistematikindeki yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Bu durum çoğu zaman morfolojik ve ultrastrüktürel karakterlerin moleküler verilerle çelişmesine neden olmaktadır (O'Mahony vd., 2007; Wang vd., 2015). Ayrıca son dönemde Microsporidia grubunda yapılan moleküler çalışmalar daha önce yüksek taksonların tanımlanmasında kullanılan morfolojik karakterlerin polifiletik olduğunu göstermiştir (Boucias ve Pendland 1998). Bu nedenle daha önce bu karakterlere göre tanımlanmış çok farklı taksonlar filogenetik ağaçlarda aynı yere düşebilmektedir. Benzer şekilde tez konusu mikrospor Nosematidae familyasından *Nosema* ve Burenellidae familyasından *Vairimorpha* cinsine ait türler ile aynı grupta yer almıştır. Ancak tez konusu mikrospor gerek genetik olarak gerekse de morfolojik olarak bu türlerden çok farklıdır. Örneğin, tez konusu mikrospor 16S SSU rRNA sekans dizisi bakımından *Vairimorpha* cinsinin tip türünden 0,0405-0,0415; *Nosema* cinsinin tip türünden ise 0,1940 oranında farklıdır. Morfolojik olarak bakıldığında ise *Vairimorpha* cinsi üç sporülasyon döngüsü ve sporofor kesesi oluşturma gibi bariz taksonomik karakterlerle tez konusu türden net bir şekilde ayrılmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile birlikte karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrospor türü gerek ışık ve elektron mikroskopisi gerekse de moleküler çalışmalarla tespit edilen taksonomik özelliklerle Unikaryonidae familyası ile benzerlik göstermektedir. Unikaryonidae familyasının genel özelliklerine bakıldığında ise bu taksonomik gruba ait mikrospor türleri; direk konak hücrenin sitoplazmasında sporulasyon geçiren, çoğalması polisporoblastik (çoklu bölünme) ya da disporoblastik (ikiye bölünme, binary fizyon) olan, tüm gelişim safhaları monokaryotik ve olgun sporları oval şekilli olmaları ile karakterize edilmiştir (Sprague, 1977). Yapılan incelemeler sonucunda tez konusu mikrosporun; çoğalmasını disporoblastik yolla sağladığı, tüm gelişim safhalarının monokaryotik olup direk konak hücre sitoplazması ile ilişkili olduğu ve oval şekilli olgun sporlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen bu mikrospor Unikaryonidae familyasına yerleştirilmiştir. Tez konusu bu mikrospor türünü gerek spor morfolojisi ve ultrastrüktürel özellikleri gerekse de konak türü, enfeksiyon bölgesi gibi özellikler açısından kıyaslandığında Unikaryonidae familyasına ait diğer mikrospor türlerinden çok farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tez konusu tür genetik açıdan değerlendirildiğinde Unikaryonidae familyasında sadece *Oligosporidium* cinsinin *Oligosporidium occidentale* türü ile yakınlık kurduğu tespit edilmiştir (Becnel vd., 2002). Bu tür, tez konusu mikrospor ile sekans farklılığı açısından kıyaslandığında iki tür arasında %5,27'lik bir baz farklılığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu iki tür %G+C içeri

bakımından değerlendirildiğinde bu oran *Oligosporidium occidentale* de %38,39 iken tez konusu türde bu oran %36,95 olarak tespit edilerek iki türün genetiksel olarak birbirinden çok farklı olduğu saptanmıştır. Bu farklılık MaximumLikelihood analizi ile hazırlanan filogenetik ağaç topolojisi ile de ortaya konulmuştur. Ayrıca bu iki mikrospor türü konak türü, spor morfolojisi ve ultrastrüktürel özellikler gibi taksonomik parametreler açısından kıyaslandığında birbirinden çok farklı oldukları tespit edilmiştir. *Oligosporidium occidentale*; Amerika’da bir akar türü olan *Metaseiulus occidentale* (Acari: Phytoseiidae) de tespit edilirken tez konusu mikrospor karaağaç yaprak böceği *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae)’de tespit edilmiştir. *Oligosporidium occidentale*’in spor morfolojisine bakıldığında ise iki farklı tip spor oluşturduğu tespit edilmiştir. Birinci tip sporlar kısa polar filamentli olup (polar filament halka sayısı 3-5) spor ölçüleri  $2,53 \times 1,68 \mu\text{m}$  iken, uzun polar filamentli olan ikinci tip sporlar (polar filament halka sayısı 8-9)  $3,14 \times 1,77 \mu\text{m}$  boyutlarındadır (Becnel vd., 2002). Tez konusu mikrospor türü ise her iki spor tipinden daha büyük ( $3,40 \times 1,63 \mu\text{m}$ ) ve polar filament halka sayısı 11’dir.

Bu tez çalışması boyunca karaağaç yaprak böceği, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae)’de tespit edilen mikrospor türünün karakterizasyonu için yapılan ışık mikroskopisi, ultrastrüktürel çalışmalar ve moleküler çalışmalar sonucunda bu mikrospor türünün Unikaryonidae taksonuna ait olduğu belirlenmiştir. Ancak sahip olduğu taksonomik karakterlere bakıldığında bu grupta daha önce tanımlanmış hiçbir cinse benzemediği tamamı ile farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bu tez çalışması sonucunda Unikaryonidae familyasına *Rugispora* adlı yeni bir cins ataması uygun görülmüştür ve bu tez çalışması ile tespit edilen mikrospor türü *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp. olarak adlandırılmıştır.



## Taksonomik Tanımlama

Phylum (Şube): Microsporidia (Balbiani, 1882), Familya: Unikaryonidae (Sprague, 1977)

Genus (Cins) *Rugispora* n. gen

Presporülasyon basamakları ve olgun sporlar monokaryotik olup yalnız bir sporülasyon döngüsü gözlenir. Tüm hayat döngüsü konak türün orta bağırsak hücre sitoplazmaları ile doğrudan ilişkilidir. Merogonik gelişim ikiye bölünme (binary fission) ile gerçekleşir. Sporogonik döngü disporblastik olup kırışık (rugose) ekzospor yapısı ile karakterize edilen monokaryotik sporlar meydana getirir. Karasal omurgasızlarda parazitizm yaparlar. *Rugispora istanbulensis* türüne ait 16S SSU rRNA geni kısmi sekans dizisi (Kabul No. KR704648) cins için referans sekansdır.

Tip tür: *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp.

Giemsa boyalı olgun sporlar oval şekilli olup ortalama boyutları  $3,40 \pm 0,37 \times 1,63 \pm 0,20$   $\mu\text{m}$  (n=970)'dir. Taze sporlar ise  $4,25 \pm 0,52$  (3,30-6,35; n=500)  $\mu\text{m}$  boyunda ve  $2,12 \pm 0,25$  (1,45-2,91; n=500)  $\mu\text{m}$  enindedir. Olgun sporlar isofilar tip polar filament yapısına sahip olup polar filament halka sayısı 11'dir. Spor duvarı yapısı üç katmanlı olup en dışta bulunan ekzospor kırışık (rugose) yapılı olup hemen alt kısımdaki kalın yapılı endospor kısmı hücre zarını sarar. Olgun sporların ön uç kısmı düzleşerek spor duvarının en ince olduğu bölgeyi meydana getirir. Polaroplast yapısı lamellar tip olup spor yapısının arka uç kısmında daimî küçük bir vakuol bulunur.

Konak: Karaağaç yaprak böceği, *Xanthogaleruca luteola* (Muller) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Enfeksiyon bölgesi: Ergin ve larva dönemindeki konağın orta bağırsak epiteli

Lokalite: Bu çalışma ile tespit edilen tür İstanbul, Türkiye'den toplanan numuneler ile tespit edilmiştir

Bulaşma: Horizontal (besin yolu ile) ya da vertikal (anne yolu ile) yolla gerçekleşir.

Etimoloji: Cins epiteti "*Rugispora*" olgun sporların kırışık şekilli ekzospor yapılarından esinlenilmiştir. Tür epiteti "*istanbulensis*" patojenin keşfedildiği İstanbul'a atfedilmiştir.

Tip materyali: Işık ve elektron mikroskopisine ait tip numuneleri tez sahibi Çağrı BEKİRCAN'ın şahsi koleksiyonunda ÇRI-01 katalog numarası ile saklanmıştır. Ayrıca *Rugispora istanbulensis*'e ait tip sekansı KR704648 kabul kodu ile GenBank'a yüklenmiştir.

Bu tez çalışması ile tespit edilen *Rugispora istanbulensis*'in konak böcek karaağaç yaprak böceği üzerinde etkilerini anlayabilmek için bioassay deneyleri yapılmıştır. Yapılan bu deneylerle konak böcekle *R. istanbulensis* arasındaki Doz-Ölüm ilişkisi saptanmaya çalışılmıştır. Uygulanan en yüksek dozajda ( $2,27 \times 10^7$  spor/ml) *R. istanbulensis* sporlarının meydana getirdiği enfeksiyonun oldukça yüksek öldürücü etkiye (%42,27) sahip olduğu tespit edilmiştir ve deneyin hipotez aşamasında da tahmin edildiği gibi dozla ölüm arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır. Ayrıca yirmi bir günlük bu deneylerde en erken ölümler ikinci uygulamanın yedinci gününde gerçekleşmiştir. Benzer şekilde Down ve arkadaşlarının, 2008 de bir mikrosporidyum türü olan *Vairiomorpha necatrix* ile *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) üzerinde yaptıkları çalışmada ilk ölüm  $6,7 \times 10^7$  spor/mg'lık dozajda dokuzuncu günde görülmüştür. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlar üzerinden *Vairiomorpha necatrix* ile *R. istanbulensis*'i kıyasladığımızda; *R. istanbulensis* daha düşük konsantrasyonlarda daha erken konak böcek üzerinde ölüme neden olmaktadır. Bu açıdan da *R. istanbulensis*, *Vairiomorpha* cinsinden bariz farklılık göstermektedir.

Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen *R. istanbulensis* enfeksiyonun İstanbul'da yürütülen üç yıllık tez çalışması süresince yıl ve aylara göre dağılımına bakıldığında ise yıl bazında 2014 yılı %21,48'lik oranla enfeksiyonun en yoğun olduğu yıl olurken, %11,20'lik enfeksiyon oranı ile 2013 yılı enfeksiyon yoğunluğunun en az olduğu yıl olmuştur. 2015 yılında ise 2014 yılında görülen %21,48'lik enfeksiyon oranı azalarak %17,70 gibi bir seviyeye gerilemiştir (Şekil 15). *R. istanbulensis* karaağaç yaprak böceğinde meydana getirdiği enfeksiyon oranları aylara göre değerlendirildiğinde ise 2013-2014 yıllarında Ağustos ayı sırası ile %15,60 ve %50,90 enfeksiyon oranları ile enfeksiyonun en yoğun görüldüğü ay olurken, 2015 yılında %33,90 oran ile enfeksiyon en yoğun Temmuz ayında belirlenmiştir. Aylar bazında yapılan bu değerlendirmede örnekleme yapılan üç yıl kendi içerisinde ay bazında farklılıklar barındırsa da Mayıs ve Haziran ayları her üç yıl içinde enfeksiyon oranının en az olduğu aylar olarak tespit edilmiştir (Şekil 16). Ayrıca bu tez çalışmasında yıllık ve aylık bazda meydana gelen enfeksiyon oranlarındaki bu dalgalanmanın hangi etkenlerden kaynaklandığının anlaşılabilmesi için nem, yağış ve sıcaklık gibi iklim değişkenlerinin *R. istanbulensis* enfeksiyonu üzerindeki etkileri istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu değerlendirme ile nem değişkeni *R. istanbulensis* enfeksiyonu üzerinde en belirleyici değişken olurken ( $r = 0,455^{**}$ ;  $P < 0,01$ ) sıcaklık ise ikinci sıradaki önemli etken olduğu saptanmıştır ( $r = 0,256^{**}$ ;  $P < 0,01$ ). İstatistiki olarak elde edilen bu sonuçlar da daha önce literatürde yapılmış çeşitli çalışmalarla birbirini destekler mahiyette olup bu çalışmalarda da nem ve sıcaklık faktörlerinin mikrospor enfeksiyonları üzerinde oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir (Aydın vd., 2005;

Fries, 2010; Malone vd., 2001; Martín-Hernández vd., 2009). Ayrıca yağış faktörünün nem değişkeni üzerinde direk etkisi olduğundan *R. istanbulensis* enfeksiyonu üzerinde dolaylı bir etkisi olduğu tespit edilmiştir ( $r = 0,421^*$ ;  $P < 0,05$ ). Tez süresi boyunca yapılan bu kapsamdaki çalışmalar sonucunda karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen *R. istanbulensis* enfeksiyonunun doğrudan iklimsel verilerden etkilendiği sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuç literatürde yapılan bu kapsamdaki çalışmalarla da birbirini destekler mahiyettedir. Yapılan bu çalışmalarla iklim değişimleri böceklerde hastalık yapan organizmaların dağılımını, yayılımını ve varlığını etkilediği sonucuna varılmıştır (De la Rocque vd., 2008; Martin-Hernández vd., 2009).

Sonuç olarak; ışık, elektron mikroskobu ve moleküler çalışmalardan elde edilen tüm veriler, bu tez çalışması ile karaağaç yaprak böceği, *Xanthogaleruca luteola* (Muller) (Coleoptera: Chrysomelidae) de tanımlanan mikrosporidium patojeninin yeni bir cins olduğunu göstermektedir. *Rugispora* cinsine dahil olan bu yeni türün ismi tespit edildiği şehre atfedilerek *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp. olarak isimlendirilmiştir.

## 5. SONUÇLAR

Bu doktora tezi süresince elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. Coleoptera takımına ait olan karaağaç yaprak böceği *Xanthogaleruca luteola* (Muller) (Coleop: Chrysomelidae) ile biyolojik mücadelede kullanılmak üzere doğal hastalık etmeni mikrospor patojeninin varlığı araştırılmış ve 2013-2015 yıllarının Mayıs – Eylül ayları arasında toplanan numunelerde bir mikrosporidium patojenine rastlanmıştır.
2. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen mikrosporum morfolojik ve ultrastrüktürel özellikleri, ışık mikroskobu, Giemsa boyama ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) çalışmaları ile belirlenmiş ve bu patojenin Unikaryonidae familyası için yeni bir cins kaydı olduğu tespit edilmiştir.
3. Tespit edilen mikrospor sporları üzerinde yapılan moleküler çalışmalar ile bu patojenin Unikaryonidae familyası için yeni bir cins olduğu teyit edilmiştir.
4. Giemsa boyama yöntemi ve elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda elde edilen hayat döngüsü safhaları ve ultrastrüktürel yapı bulguları ve moleküler çalışmalar ile elde edilen veriler ile karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen bu mikrospor patojeni *Rugispora* cinsi olarak atanmıştır. Karakterizasyonu tamamlanan bu tür *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp. tür adı ile bu alanda saygın dergilerden Parasitology Research adlı SCI (Science citation index) dergide yayınlanmıştır. Bu nedenle söz konusu tez çalışması karaağaç yaprak böceğinde (*X. luteola*) tespit edilen mikrospor patojeninin dünya ve Türkiye için ilk kayıdır.
5. Arazi çalışmaları sonucunda yalnızca İstanbul'da elde edilen numunelerin diseksiyonu sonucunda enfeksiyon tespit edilmiştir. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda tüm illerden elde edilen 3217 numunelik grupta enfeksiyon oranı %8,92 iken, İstanbul için bu oran %27,89 olarak belirlenmiştir.
6. Ayrıca bu tez çalışması konak böceğin (*X. luteola*) ülkemizdeki popülasyonu hakkında da detaylı bilgi vermektedir. 2014-2015 yılları arasında yürütülen arazi çalışmaları sonucunda İstanbul bu böceğin en yoğun rastlandığı il olurken, Trabzon en az görüldüğü il olmuştur. Bunun yanında arazi çalışmalarının yürütüldüğü aylar içinde Ağustos ayı, böceğin en yoğun görüldüğü ay olmuştur.
7. Karaağaç yaprak böceğinde tespit edilen *R. istanbulensis*'in konak böcek üzerindeki insektisidal etkisini belirlemek için yapılan bioassay deneylerinde  $2,21 \times 10^7$ 'lik uygulama dozajı böcek üzerinde en yüksek ölüm oranını oluşturmuştur (%42,27). Ayrıca bu deney sonucunda uygulanan dozajla ölüm oranı arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir. Yirmi bir

günlük deney süresi boyunca en erken ölümler ise ikinci uygulamanın yedinci gününde görülmüştür.

8. Bu tez çalışmasında; karaağaç yaprak böceğinde doğal olarak meydana gelen *R. istanbulensis* enfeksiyonu üzerinde iklimsel verilerin etkileride çalışılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar sonucunda nem  $r = 0,455^{**}$ ;  $P < 0,01$  korelatif değerle enfeksiyon üzerinde en belirleyici etken olurken bu değişkeni  $r = 0,256^{**}$ ;  $P < 0,01$  değerle sıcaklık takip etmiştir.

9. İklim verileri ve enfeksiyon arasındaki ilişkiyi formülize edebilmek için yapılan regresyon analizleri sonucunda ise **Enfeksiyon = -0,508 Nem + 7,603 Yağış + 3,967 Sıcaklık + 5,260 Yıl + 1,592 Ay - 10641,61** bağıntısı elde edilmiştir.

10. 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 doktora tez çalışması ile karaağaç yaprak böceği (*Xanthogaleruca luteola* Muller) de doğal hastalık oluşturan; Türkiye ve dünya için cins ve tür seviyesinde yeni bir mikrosporidium patojeni tespit edilmekte, karakterizasyonu ve varlığı açıklanmaktadır. Bunun yanı sıra bu yeni patojenin konak böcek üzerindeki doza bağlı insektisidal etki ve neden olduğu doğal enfeksiyonla iklimsel koşullar arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 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 doktora tez çalışmasında tespit edilen *Rugispora istanbulensis* n. gen., n. sp., ülkemiz ve çeşitli dünya ülkelerinde karaağaç (*Ulmus* spp.) türleri için önemli bir zararlı olan karaağaç yaprak böceği, *Xanthogaleruca luteola* (Muller) (Coleoptera: Chrysomelidae) ile mücadele de kimyasal mücadeleye alternatif olarak kullanılmalıdır. Bu amaçla bu mikrosporidium patojeninin kitle üretimi yapıp patojenite testlerinden geçirildikten sonra gerek şahıslara gereksede 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 Türkiye’de karaağaç türlerinin bulunduğu bölgelerdeki zarar yapan böceklerde patojen varlığı araştırılabilir. Patojenin konak böcekteki 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 Chrysomelidae familyası olmak üzere diğer Coleoptera takımına ait familya ve türlerde enfeksiyon gerçekleştirip gerçekleştirmediği de çalışılabilecek konular arasındadır. Bu tez çalışmasının ülkemiz ve dünya için ilk kayıt olması, bu alanda yapılacak olan diğer çalışmalara kaynak niteliğinde olacaktır. Bu çalışma aracılığı ile sunulan bilgiler kullanılarak diğer orman zararlıları ile mücadelede yeni patojenik ajanların tespiti mümkün olabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Acar, K.F. 2014. Akdeniz Un Güvesi (*Ephestia kuehniella*, Lep.:Pyralidae)'nin Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Mücadelede Kullanılma Potansiyelleri, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Andreadis, T.G. ve Hanula, J.L. 1987. Ultrastructural study and description of *Ovavesicula popilliae* n. g., n. sp. (Microsporidia: Pleistophoridae) from the Japanese beetle, *Popillae japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Protozool., 34, 15-21.
- Aslan, I., Warchalowski, A. ve Özbek, H. 2000. A preliminary review of the subfamily Galerucinae (Coleoptera, Chrysomelidae) in Turkey. Journal of the Entomological Research Society, 2,2, 27-42.
- Aydın, L., Çakmak, İ., Güleğen, E. ve Wells, H., 2005. Honeybee Nosema disease in the Republic of Turkey, Journal of Apicultural Research, 44, 4, 196-197.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Didier, E.S., Maddox, J.V. ve 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.
- Becnel, J.J. ve Andreadis, T.G., 1999. Microsporidia in Insects. In: Wittner, M. Weiss, L.M., eds., The Microsporidia and Microsporidiosis. Asm Press, Washington D.C., 447-501.
- Becnel, J.J. ve Andreadis, T.G., 2014. Microsporidia in Insects. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., 521-570.
- Becnel, J.J., Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. ve Shapiro, A. 2002. Morphological and molecular characterization of a new microsporidian species from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Phytoseiidae). J Invertebr Pathol., 79, 163-172.
- Becnel, J.J., Takvorian, P.M. ve Cali, A. 2014. Checklist of Available Generic Names for Microsporidia with Type Species and Type Hosts In: Weiss, L.M. and Becnel, J.J. (Ed.), Microsporidia: Pathogens of Opportunity. Wiley-Blackwell, USA, 671-687.
- Bekircan, Ç. 2012. Büyük Lahana Kelebeği (*Pieris brassicae* L.; Lepidoptera:Pieridae)'nde Yeni Bir Mikrosporidium (Protista) Türünün Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Bekircan, Ç., Cüce, M., Bekircan, T. ve Tosun, O. 2015. Role of Different *Thymus* Essential Oils on Feeding Performance of *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Chrysomelidae: Coleoptera). Advances in Zoology and Botany, 3,1, 6-9.
- Bekircan, Ç., Cüce, M. ve Sökmen, A. 2014. Antifeedant Activity of the Essential Oils from Four Different Lamiaceae Species against *Agelastica alni* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). Advances in Zoology and Botany, 2, 57 – 62.
- Boucias, D.G. ve Pendland, J.C. 1998. Phylum Microsporidia. In: Principles of Insect Pathology. Springer Science + Business Media, Llc, New York, pp. 399-414.
- Brooks, W.M., Becnel, J.J. ve Kennedy, G.G. 1988. Establishment of *Endoreticulatus* n. g. for *Pleistophora fidelis* (Hostounsky & Weiser, 1975) (Microsporidia: Pleistophoridae) based on the ultrastructure of a microsporidium in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Protozool., 35, 481-488.
- Clair, D.J., Dahlsten, D.L. ve Hart, E.R. 1987. Rearing *Tetrastichus gallerucae* (Hymenoptera: Eulophidae) for biological control of the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola*. Entomophaga, 32,5, 457-461.
- Clausen, C.P. 1978. Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: a World Review. Agricultural Handbook No. 480. Washington DC, USA: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- Çanakçıoğlu, H. ve Mol, T. 1998. Orman Entomolojisi: Zararlı ve Yararlı Böcekler. İTÜ Orman Fakültesi Yayınları, İstanbul.
- Dahlsten, D.L., Rowney, D.L. ve Lawson, A.B. 1998. IPM helps control elm leaf beetle. California Agriculture. 52,2, 18-23.
- 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.
- De la Rocque, S.J., Rioux, A. ve Slingenbergh, J. 2008. Climate change: effects on animal disease systems and implications for surveillance and control, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 27, 339–354.
- 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.
- Down, R.E., Bell, H.A., Bryning, G., Kirkbride-Smith, A.E., Edwards, J.P. ve Weaver, R.J. 2008. Infection by the microsporidium *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporidia) elevates juvenile hormone titres in larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae), J Invertebr Pathol., 97, 223–229.



- Dreistadt, S. 2008. Elm Leaf Beetle, *Xanthogaleruca* (=Pyrrhalta) *luteola* (Muller) (Coleoptera: Chrysomelidae). In: Encyclopedia of Entomology (2nd edition) [ed. by Capinera, J. L.]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1297-1300.
- Dreistadt, S.H., 2014. Integrated Pest Management for Landscape Professionals and Home Gardeners. University of California Agriculture and Natural Resources. Pest Notes Publication 7403, 1-5.
- Dreistadt, S.H., Dahlsten, D.L. ve Lawson, A.B. 2004. Integrated Pest Management for Landscape Professionals and Home Gardeners. University of California Agriculture and Natural Resources. Pest Notes Publication 7403, 1-6.
- Dreistadt, S.H., Dahlsten, D.L., Rowney, D.L., Tait, S.M., Yokota, G.Y., Copper, W.A. 1991. Treatment of destructive elm leaf beetle should be timed by temperature monitoring. Calif. Agric. 45(2), 23-25.
- Ecevit, O. 1988. Zirai Mücadele İlaçları ve Çevreye Olan Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Samsun.
- Flint, M.L., Dreistadt, S. H. ve Clark, J. K. 1998. Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide To Biological Pest Control. Oakland: Univ. Calif. Agric. Nat. Res. Publ., 3386.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), Journal of Invertebrate Pathology., 103, 73–79.
- Glover, T. 1871. Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1870. Washington, DC, USA: Government Printing Office, 65-91.
- 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.
- Higes, M., Martin, R. ve Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe, J. Invert. Pathol., 92,2, 93-95.
- Hylis, M., Weiser J., Obornik M. ve Vavra J. 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia, J. Invert. Pathol., 88,3, 257-260.
- Issi, I.V., Krylova, S.V. ve Nicolaeva, V.M. 1993. The ultrastructure of the microsporidium *Nosema meligethi* and establishment of the new genus *Anncaliia*. Parazitologiya., 27, 127-133.
- Johnson, W.T. ve Lyon, H.H. 1991. Insect That Feed on Trees And Shrubs. Cornell University, 560.

- Joudrey, P. ve Bjørnson, S., 2007. Effects of an Unidentified Microsporidium on the Convergent Lady Beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Coccinellidae), Used for Biological Control, J. Invertebr. Pathol., 94, 140-143.
- Justel, A., Peña, D. ve Zamar, R. 1997. A multivariate Kolmogorov-Smirnov test of goodness of fit. Statist. Probab. Lett., 35,3, 251-259.
- Kaplan, R. 2014. Türkiye II. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, Bartın Üniversitesi Orman Fakültesi ve Orman Genel Müdürlüğü, Antalya.
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. J. Mol. Evol., 16, 111-120.
- 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.
- Larsson, J.I.R. 2014. The primitive microsporidia. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. First ed. (Eds: Weiss L.M. and Becnel J.J.). John Wiley & Sons, Inc., 605–635.
- 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.
- Malone, L.A. ve Mcivor, C.A. 1996. Use of Nucleotide Sequence Data to Identify a Microsporidian Pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). J. Invertebr. Pathol., 68, 231–238.
- Malone, L.A., Gatehouse, H.S. ve Tregidga, E. 2001. Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), J. Invertebr. Pathol., 77, 258–268.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L. ve Higes, M. 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honey bee microsporidia, Applied and Environmental Microbiology, 75, 2554-2557.
- Martin-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A., M., Garrido-Bailón, E. ve Higes, M., 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, Applied and Environmental Microbiology, 73, 20, 6331–6338.
- O'Mahony, E.M., Tay, W.T. ve Paxton, R.J. 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. J Eukaryot Microbiol., 54, 103–109.
- Özcan, N. 2010. *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae)'nın Bir Mikrosporidium Patojeninin Karakterizasyonu ve Varlığı, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Pamay, B. 1992. Park ve Bahçelerimiz İçin Bitki Materyali-I, Ağaç ve Ağaççıklar Bölümü, İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi.
- Radek, R. ve Fabel, P. 2000. A new entomopoxvirus from a Cockroach: Light and electron microscopy, J. Invert. Pathol., 75, 19-27.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-212.
- Riley, C.V. 1883. Report of the entomologist. In: Report of the Commissioner of Agriculture for the Year 1883. Washington, DC, USA: Government Printing Office, 159-170.
- Schneider, A. 1884. Sur le developpement du *Stylorhynchus longicollis*. Arch. Zool. Exp. Gen. 2, 1-36.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. 2008. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Üniversitesi Basım Evi, 199-201.
- Solter, L.F., Becnel, J.J. ve David, H.O. 2012. Microsporidian Entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), Insect Pathology. Elsevier Inc. 221-263.
- Spearman, C.E. 1904. The proof and measurement of association between two things. Am J Psychol., 15, 72–101.
- Sprague, V. 1977. Classification and Phylogeny of the Microsporidia. In: Bulla, L.A. Jr. and Cheng, T.C, eds., Comparative Pathobiology Volume II. Plenum Press, New York and London, 2, 1-31.
- Sprague, V., 1982. Microspora, in: S.P. Parker(Eds.), Synopsis and classification of living organism, 1. McGraw Hill Book Co., New York, N.Y., 589-594.
- Sprague, V., Becnel, J., J. ve Hazard, E., I., 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. Crit. Rev. Microbiol., 18, 285-395.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. ve Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analsis Version 6.0. Mol. Biol. Evol., 30, 2725-2729.
- Togebaye, B.S. ve Bouix, G. 1989. *Nosema galerucellae* n. sp. Microsporidian (Protozoa, Microspora), parasite of *Galerucella luteola* Müller (Chrysomelidae, Coleoptera): development cycle and ultrastructure. Europ J Protistol., 24, 346-353.
- Togebaye, 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, 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.
- Türkmen, Y.M. 2006. Karaağaç Yaprak Böceği [*Pyrrhalta luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae)]'nin Laboratuvarda Bazı Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve

Balcalı (Adana)'da Popülasyon Takibi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Undeen, A. ve Vavra, J. 1997. Research methods for entomopathogenic protozoa. Lacey, L., (ed), Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, San Diego, 117-151.

URL-1, <http://bugguide.net/node/view/105144/tree>. 19 Mayıs 2016.

URL-2, <http://www.treetec.net.au/images/larvae.jpg>. 20 Mayıs 2016.

URL-3, [http://www.maine.gov/dacf/mfs/images/elm\\_leaf\\_beetle\\_and\\_damage.jpg](http://www.maine.gov/dacf/mfs/images/elm_leaf_beetle_and_damage.jpg). 20 Mayıs 2016.

URL-4, <http://www.cabi.org/isc/datasheet/44619>. 18 Mayıs 2016.

URL-5, <http://www.elmleafbeetle.com.au/>. 18 Mayıs 2016.

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.

Vavra, J. ve Larsson, J.I.R. 1999. Structure of the Microsporidia. In: Wittner, M. Weiss, L.M., eds., The Microsporidia and Microsporidiosis. Asm Press, Washington D.C., 7-84.

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.

Wang, Y., Liu, W., Jiang, Y., Huang, L., Irfan, M., Shi, S., Yang, R. ve Qin, L. 2015. Morphological and molecular characterization of *Nosema pernyi* a microsporidian parasite in *Antheraea pernyi*. Parasitol Res., 114, 3327-3336.

Weiser, J.R., Wegensteiner, R. ve Zizka, Z. 1995. *Canningia spinidentis* gen. et sp. n. (Protista: Microspora), a new pathogen of the fir bark beetle *Pityokteines spinidens*. Folia parasitol., 42, 1-10.

Wu, Z.M., Jamieson, S. ve Kielbaso, J. 1991. Urban forest pest management. Journal of Arboriculture, 17,6, 150-158.

Yaman, M., Bekircan, Ç., Radek, R. ve Linde, A. 2014. *Nosema pieriae* sp. n. (Microsporida, Nosematidae): A New Microsporidian Pathogen of the Cabbage Butterfly *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). Acta Protozoologica, 53, 223-232.

Yıldız, B. ve Aktoklu, E. 2010. Bitki Sistematığı. İlk Karasal Bitkilerden Bir Çeneklilere. Palme Yayıncılık, 199-201.

## 8. EKLER

**Ek 1.** Tespit edilen mikrosporidium türünün 16S SSU rRNA'sına ait kısmi baz sırası, toplam uzunluk 1245 bp dir.

```
CACCAGGTTGATTCTGCCTGACGTAGACGCTATTCCTAAGATTAACCCATGCATGTTTTTG
ACATTTGAAAATGGACTGCTCAGTAATACTTACTTTATTTGATGTACATTTGAAAATAACT
ACGTTAAAGTGTAGATAAAAATGTGTACAGTAAGAGTAAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGT
AATGGCTTAACAAGGCAGTGACGGGTAACGGTATTACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCC
TGAGAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACTTGACCTATGGATTTTTT
CTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATATATTGTTTCATATTGTAAAAGTATATGAGGTGATTA
ATTGGAGGGCAAATCAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTCCAAGAGTGTGTATGATG
ATTGATGCAGTTAAAAAGTCCGTAATTTATTTTTAAGAAGCAATATGATGTGTACTGTATAG
TTGGGAGAGAGATGAAATGTGACGACCCTGACTGGACAAACAGAGGTGAAAGCTGTACACTT
GTATGTATTTTCTGAACAAGGACGTAAGCTGGAGGAGCGAAGATGATTAGATAACCATTGTAG
TTCCAGCAGTAAACTATGCCGACGATGTGATCTGCTATAATGTTGTATTACATGATAGAAAT
TTGAGTTTTTTGGCTCTGGGGAAAGTATGATCGCAAGATTGAAAATTAAGAAATGACGGA
AGAATACCACGAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGTAACCTACCAAT
ATTTTATTATTTTGAGACGATAATATATCTGAGAATGATAATAGTGGTGCATGGCCGTTTTT
AATGGATGCTGTGAAGTTTGATTAATTTCAACAAGACGTGAGACCCTTTTTTTATTAGACA
GACACAATCAGTGTAGGAAGGAAAGGATTA AACAGATCCGTTATGCCCTCTGACATTTTGG
GCAGCACGCGCAATACAATAGATATAAAATCTTTATGGGATAATATTTTGTAAGAGATATTT
GAACTCGGAATTGCTAGTAAATTTTATTAAATAAGTAGAATTGAATGTGTCCCTGTTCTTTG
TACACACCGCCCGTCGCTATCTAAGATGATATATGTTGTGAAATTAGTGAAAACCTACTTAA
CAATATGTATTAGATCTGATATAAGTCGTAACATGGTTGCTGTTGGAGAACCATTAGCAGGA
TCATA
```

## Ek 2. 16S SSU rRNA Genine Göre Analizlerde Kullanılan Örneklerin Baz Farklılıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
1 KR704648 <i>Rugispora istanbulens</i>	-																										
2 U11047 <i>Nosema vespula</i>	0.02969	-																									
3 AF426104 <i>Nosema carpocapsae</i>	0.02969	0.01815	-																								
4 AF033316 <i>Nosema portugal</i>	0.03148	0.00171	0.01990	-																							
5 EU219086 <i>Nosema thomsoni</i>	0.02968	0.00773	0.01553	0.00945	-																						
6 KC596023 <i>Nosema thomsoni</i>	0.03057	0.00859	0.01641	0.01032	0.00085	-																					
7 U27359 <i>Nosema oulemae</i>	0.03417	0.01815	0.01207	0.01990	0.01816	0.01904	-																				
8 U11051 <i>Nosema necatrix</i>	0.04060	0.02526	0.01559	0.02703	0.02262	0.02351	0.02084	-																			
9 AY008373 <i>Nosema bombi</i>	0.04793	0.03067	0.03608	0.03067	0.03067	0.03157	0.03507	0.03897	-																		
10 JX268035 <i>Nosema pieriae</i>	0.03066	0.01035	0.01821	0.01209	0.00257	0.00343	0.02087	0.02534	0.03068	-																	
11 U26534 <i>Nosema apis</i>	0.05841	0.04911	0.04544	0.05096	0.04636	0.04728	0.04989	0.04927	0.05619	0.04643	-																
12 DQ235446 <i>Nosema apis</i>	0.05841	0.04911	0.04544	0.05096	0.04636	0.04728	0.04989	0.04927	0.05619	0.04643	0.00000	-															
13 D85503 <i>Nosema bombycis</i>	0.19403	0.18328	0.18225	0.18219	0.17992	0.17991	0.18488	0.18126	0.19134	0.17961	0.19424	0.19424	-														
14 U09282 <i>Nosema trichoplusiae</i>	0.19405	0.18329	0.18226	0.18220	0.17993	0.17992	0.18489	0.18127	0.19136	0.17962	0.19426	0.19426	0.00000	-													
15 U26532 <i>Nosema furnacalis</i>	0.19375	0.18328	0.17882	0.18210	0.18212	0.18211	0.18270	0.18011	0.18912	0.18183	0.19207	0.19207	0.02104	0.02104	-												
16 AF495379 <i>Oligosporidium occide</i>	0.05271	0.03525	0.04162	0.03705	0.03616	0.03706	0.04150	0.04265	0.02611	0.03710	0.05721	0.05721	0.19047	0.19049	0.18616	-											
17 Y00266 <i>Vairimorpha necatrix</i>	0.04159	0.02800	0.01913	0.02978	0.02534	0.02624	0.02355	0.00429	0.04088	0.02808	0.05123	0.05123	0.18290	0.18291	0.18173	0.04363	-										
18 DQ996241 <i>Vairimorpha necatrix</i>	0.04059	0.02527	0.01559	0.02704	0.02262	0.02351	0.02085	0.00000	0.03898	0.02535	0.04928	0.04928	0.18134	0.18136	0.18020	0.04264	0.00342	-									
19 AF141129 <i>Vairimorpha lymantria</i>	0.03148	0.00171	0.01990	0.00000	0.00945	0.01032	0.01990	0.02703	0.03067	0.01209	0.05096	0.05096	0.18219	0.18220	0.18210	0.03705	0.02978	0.02704	-								
20 AF033315 <i>Vairimorpha lymantria</i>	0.03148	0.00257	0.02078	0.00085	0.01032	0.01119	0.02079	0.02793	0.02977	0.01296	0.05189	0.05189	0.18333	0.18334	0.18324	0.03704	0.03068	0.02793	0.00085	-							
21 AY009115 <i>Endoreticulatus bomby</i>	0.42221	0.42257	0.41482	0.42108	0.42078	0.41911	0.41911	0.41530	0.40607	0.42284	0.41466	0.41466	0.46588	0.46710	0.47738	0.41682	0.41495	0.41521	0.42108	0.42079	-						
22 EU260046 <i>Endoreticulatus sp CH</i>	0.42793	0.42799	0.42018	0.42649	0.42617	0.42448	0.42449	0.42067	0.41291	0.42826	0.41853	0.41853	0.46999	0.47121	0.48157	0.42081	0.42031	0.42058	0.42649	0.42620	0.01026	-					
23 HN216911 <i>Anncaliia algerae</i>	0.46757	0.45449	0.45772	0.45264	0.45142	0.45143	0.45439	0.45389	0.46153	0.44829	0.45853	0.45853	0.45494	0.45611	0.44401	0.46418	0.45222	0.45377	0.45264	0.45437	0.44160	0.44544	-				
24 AY894423 <i>Anncaliia meligethi</i>	0.47226	0.46253	0.46587	0.46061	0.45952	0.45954	0.46240	0.46355	0.46625	0.45643	0.46679	0.46679	0.46088	0.46207	0.44802	0.47391	0.46193	0.46344	0.46061	0.46237	0.44970	0.45362	0.01542	-			
25 EF564602 <i>Ovavesicula popilliae</i>	0.60447	0.59660	0.58580	0.59480	0.59675	0.59450	0.59629	0.59395	0.58528	0.59880	0.57807	0.57807	0.63996	0.64133	0.63344	0.57734	0.59679	0.59377	0.59480	0.59478	0.50877	0.51763	0.54999	0.56515	-		

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Atatürk İlkokulu ve Yunus Emre Orta Okulunda, orta öğrenimini Trabzon lisesinde tamamladı. 2005-2006 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2009 yılında mezun oldu. 2009-2010 Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. Yine aynı yıl Eğitim-Öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 2010-2017 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Lisansüstü eğitimi boyunca dünya literatürüne cins düzeyinde iki, tür seviyesinde dört yeni kayıtla katkıda bulundu.

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. Evli ve iki çocuk babasıdır.