



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARADENİZ' DE YAYILIŞ GÖSTEREN KUDOA
(MYXOSPOREA: MULTIVALVULIDA) TÜRLERİNİN 28S
rDNA FİLOGENİSİ**

ERKAN ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
FEN BİLGİSİ EĞİTİMİ BİLİM DALI

**KARADENİZ' DE YAYILIŞ GÖSTEREN KUDOA (MYXOSPOREA:
MULTIVALVULIDA) TÜRLERİNİN 28S rDNA FİLOGENİSİ**

ERKAN ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Erkan ÖZDEMİR tarafından hazırlanan “**KARADENİZ’ DE YAYILIŞ GÖSTEREN KUDOA (MYXOSPOREA: MULTIVALVULIDA) TÜRLERİNİN 28S rDNA FİLOGENİSİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 16.07.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI

Jüri Üyeleri

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI
Ordu Üniversitesi

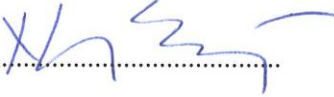
Üye
Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Naciye ERDOĞAN SAĞLAM
Ordu Üniversitesi

İmza

.....


.....


.....


19/07/2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun *19/07/2019* tarih ve *2019.../385*. sayılı kararı ile onaylanmıştır.




Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


ERKAN ÖZDEMİR

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

KARADENİZ' DE YAYILIŞ GÖSTEREN KUDOA (MYXOSPOREA: MULTIVALVULIDA) TÜRLERİNİN 28S rDNA FİLOGENİSİ

ERKAN ÖZDEMİR

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 35 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ CEM TOLGA GÜRKANLI)

Bu çalışmada *Kudoa anatolica* ve *K. niluferi* türlerinin 28S rDNA genlerinin nükleotit dizilerine dayalı filogenetik analizleri amaçlanmıştır. Bu parazitler Karadeniz'in Sinop kıyılarında yakalanan *Atherina hepsetus* ve *Neogobius melanostomus* konaklarından izole edilerek tanımlanmıştır.

Bu amaçla *Kudoa anatolica*'ya ait iki (AO-18, AO-20) ve *K. niluferi*'ye ait bir (AO-24) bir izolatın 28S rDNA gen bölgelerinin nükleotit dizileri belirlenmiş ve Neighbor-Joining, Maximum-Likelihood ve Maximum-Parsimony algoritmaları kullanılarak filogenetik analizleri yapılmıştır.

Filogenetik analizler sonucunda üç farklı algoritma ile oluşturulan ağaçların topolojik olarak farklı oldukları görülmüştür. Bunun sebebi olarak 28S rDNA gen bölgesinin yüksek miktarda varyasyon içermesi bu nedenle cins yada daha yüksek seviyedeki taksonomik kategorileri kapsayan filogenetik çalışmalar için uygun bir genetik markör olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada Karadenize ait bir *Kudoa* soyhattına dair destekleyici genetik bulgularda ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Kudoa anatolica*, *Kudoa niluferi*, 28S rDNA, Moleküler Filogeni, *Myxozoa*

ABSTRACT

28S rDNA DIVERSITY of *Kudoa* spp. FROM THE BLACKSEA

ERKAN OZDEMIR

**ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES**

FISHERIES TECNOLOGY ENGINEERING

MASTER THESIS, 35 PAGES

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. CEM TOLGA GURKANLI)

In the current study phylogenetic analyses depending on the nucleotide sequences of 28S rDNA of *Kudoa anatolica* ve *K. niluferi* were aimed. These parasites were isolated and identified from *Atherina hepsetus* and *Neogobius melanostomus* hosts from Sinop coasts of Blacksea.

For this aim 28S rDNA nucleotide sequences belonging to two *Kudoa anatolica* isolates (AO-18, AO-20) and one *K. niluferi* isolate (AO-24) were determine and and phylogenetic analyses using Neighbor-Joining, Maximum-Likelihood ve Maximum-Parsimony algorithms were performed.

As a result, topological differences were observed between phylogenetic trees created with three different algoritms. The reason of this case is the high amonth of variation within 28S rDNA gene regions which makes it unsuitable genetic marker for phylogenetic studies conserning genus or higher taxonomic levels. Additionally this study reveales additional genetic results supporting a *Kudoa* lineage specific to the Blacksea.

Keywords: *Kudoa anatolica*, *Kudoa niluferi*, 28S rDNA, Molecular Phylogeny,

Myxozoa

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, çalıőmanın yürütölmesi ve yazımı esnasında her aőamada destek veren danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI'ya, birikimiyle destek veren Sayın Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ'ye, laboratuvar ve tez yazım aőamalarında yardımını esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Ümit GÜR'e ve izolasyon aőamasında yardımda bulunan Yüksek Mühendis Sevilay OKKAY'a teşekkür ederim.

Aynı zamanda, manevi desteklerini her an üzerimde hissettiğim annem ve babama teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Myxozoa Grubu Canlılar.....	1
1.2 <i>Kudoa</i> Cinsi Özellikleri.....	1
1.2.1 <i>Kudoa</i> Morfolojik Özellikleri.....	1
1.2.2 <i>Kudoa</i> Sistematığı.....	3
1.2.3 <i>Kudoa</i> ’ ın Konakçı Balıklar Üzerine Etkileri.....	3
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	8
3.1 Materyal.....	8
3.2 Yöntem.....	8
3.2.1 Dokulardan Parazit Ekstraksiyonu.....	8
3.2.2 28S rDNA Bölgesinin PZR ile DNA Yükseltgenmesi.....	12
3.2.3 DNA’ ın Jel Elektroforeziyle Yürütülmesi.....	13
3.2.4 28S rDNA Bölgesinin Nükleotit Dizilemesi ve Filogenetik Analizler.....	15
3.2.5 Kullanılan Çözeltiler.....	16
3.2.5.1 EDTA (0.5 M) pH 8.....	16
3.2.5.2 TBE (Tris Borat-EDTA).....	16
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	28
6. KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	37

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1 Genomik DNA izolasyonu için kullanılan Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit	9
Şekil 3.2 Dokuların tartılması için kullanılan hassas terazi (Radwag AS 220/C/2).....	9
Şekil 3.3 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan sarsaklı inkübatör (Wisd WiseCube WIS-20)	10
Şekil 3.4 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan santrifüj (Sigma D-37520)	11
Şekil 3.5 PZR yükseltgemeleri için kullanılan Thermal Cycler (Techne TC-PLUS)...	12
Şekil 3.6 DNA' nın yürütülmesi için kullanılan elektroforez (Thermo Scientific EC300XL2-B1)	14
Şekil 4.1 28S rDNA gen bölgesinin PZR yükseltgeme ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü	21
Şekil 4.2 Bu çalışmada yaptırılan 28S rDNA nükleotid dizileme işlemine ait kromatogram görüntüsü	22
Şekil 4.3 BioEdit programı ile birleştirilen nükleotid zincirlerini gösteren grafik	22
Şekil 4.4 Bu çalışmada elde ettiğimiz 28S rDNA haplotipleri ile farklı <i>Kudoa</i> türlerine ait haplotiplerin çoklu nükleotid hizalamalarını gösteren grafik	23
Şekil 4.5 Bu çalışmada elde ettiğimiz <i>K. anatolica</i> (AO-18 ve AO-20) ve <i>K. niluferi</i> (AO-24) 28S rDNA haplotipleri ile farklı <i>Kudoa</i> türlerine ait haplotiplerin filogenetik ilişkilerini gösteren NJ ağacı. Bu ağaç HKY+I+G baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve <i>Ceratomyxa shasta</i> türü ile köklendirilmiştir. 50%'nin üzerinde desteklenmiş düğümler için Bootstrap değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir	25
Şekil 4.6 Bu çalışmada elde ettiğimiz <i>K. anatolica</i> (AO-18 ve AO-20) ve <i>K. niluferi</i> (AO-24) 28S rDNA haplotipleri ile farklı <i>Kudoa</i> türlerine ait haplotiplerin filogenetik ilişkilerini gösteren ML ağacı. Bu ağaç HKY+I+G baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş ve <i>Ceratomyxa shasta</i> türü ile köklendirilmiştir. 50%'nin üzerinde desteklenmiş düğümler için Bootstrap değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir	26
Şekil 4.7 Bu çalışmada elde ettiğimiz <i>K. anatolica</i> (AO-18 ve AO-20) ve <i>K. niluferi</i> (AO-24) 28S rDNA haplotipleri ile farklı <i>Kudoa</i> türlerine ait haplotiplerin filogenetik ilişkilerini gösteren MP ağacı. Bu ağaç <i>Ceratomyxa shasta</i> türü ile köklendirilmiştir ve 50%'nin üzerinde desteklenmiş düğümler için Bootstrap değerleri ağaç üzerinde gösterilmiştir	27

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan izolat bilgileri.....	8
Çizelge 3.2 28S gen bölgesinin yükseltgenmesi için yapılan PZR karışımının içeriği	13
Çizelge 3.3 PZR amplifikasyonu için kullanılan PZR programı	13
Çizelge 3.4 Filogenetik analizlerde kullanılan izolatlar	17

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AIC	: Akaike Information Criterion
BIC	: Bayesian Information Criterion
bp	: Baz Çifti
cm	: Santimetre
Cyc	: Cycle/Döngü
ddH₂O	: Double Distile Su
g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ML	: Maximum-Likelihood
MP	: Maximum-Parsimony
NCBI	: National Center Biotechnology Information
NJ	: Neighbor-Joining
pH	: Asidik Bazik Karakter Ölçüsü
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rpm	: Devir/Dakika
spp	: Belirtilen Cinsin Birden Fazla Türünü İfade Eder
µl	: Mikrolitre
TBE	: Tris Borat EDTA
v	: Program Versiyonu
V	: Volt
°C	: Celsius Cinsinden Sıcaklık Derecesi



1. GİRİŞ

1.1 Myxozoa Grubu Canlılar

Myxozoa omurgalı ve omurgasız canlıları ara konakçılar olarak kullanan ve onları sömüren, karmaşık yaşam döngüsüne sahip bir içparazit grubudur (Hartigan ve ark., 2016). Myxozoa, Cnidaria' ın belirli bir grubunun zaman içerisinde ayrılarak küçülmesi, morfolojik olarak basitleşmesi ve komplike bir parazitik yaşam döngüsü geliştirmesiyle oluşmuştur (Okamura ve ark., 2015). Myxospor enfeksiyonu ilk kez nesli tükenmiş bir salmon türü olan *Coregonus fera*'da gözlemlenmiş ve buna balıkta küçük frengi adı verilmiştir (Kodakova, 2014). Myxosporea myxospor ve actinospor olmak üzere iki konakçılı yaşam döngüsüne sahiptir (Wolf ve Markiw, 1984). Actinospor formu belirli halkalı solucan türlerinde bulunurken myxospor formunun genellikle kemikli balıklarda, kıkırdaklı balıklarda, amfibilerde bununla birlikte nadiren sürüngenlerde, kuşlarda, memelilerde, çenesiz balıklarında ve hatta bazı Monogenea ve kafadan bacaklı türlerinde de bulunduğu gösterilmiştir (Kodakova, 2014). Myxosporea balık parazitlerinin önemli bir bölümünü oluşturur (Özer ve ark., 2016). Bunların doğal ve kültüre alınan balık popülasyonu üzerine etkisi önemlidir (Kent ve ark., 2001). Myxozoa hızlı bir DNA evrim oranına sahip olması nedeniyle yüksek derecede tür çeşitliliğine sahiptir (Shpirer ve ark., 2018). Bu surette bu güne kadar 60 balık cinsinden yaklaşık 2180 Myxosporea türü tanımlanmıştır (Özer ve ark., 2016). Bu tez kapsamında Karadeniz'den sırasıyla Çamuka (*Atherina hepsetus*) ve Kum Kaya balıklarından (*Neogobius melanostomus*) izole edilerek tanımlanan *Kudoa anatolica* ve *K. niluferi* (Özer ve ark., 2018) türleri bu cins içerisinde yaygın biçimde kullanılan 28S rDNA genetik markırı kullanılarak filogenetik açıdan incelenecektir.

1.2 *Kudoa* Cinsi Özellikleri

1.2.1 *Kudoa* Morfolojik Özellikleri

Meglitsch, (1947) *Kudoa* cinsi üyelerini histozoik ve özellikle de balığın kaslarında yaşayan parazitler olarak tanımlamıştır. Bu tanıma rağmen bazı *Kudoa* cinsi üyelerinin balıklarda beyin, kalp, gonatlar, bağırsak, solungaçlar ve diğer organları hedef alabildiği belirlenmiştir. Buldukları organlarda *Kudoa* türüne göre kist yada psödokist oluşturur. *Kudoa* türlerinin %60'ı balığın gövde kasını, %9'u merkezi sinir sistemini ve % 6'sı kalbi enfekte etmektedir (Shin ve ark., 2016). *Kudoa* morfolojik olarak, ince membranla dört köşeli veya yıldız biçiminde myxospor ve her biri

kutupsal kapsüle sahip olan dört valf arasında belirsiz birleşim çizgisiyle karakterize edilir (Moran ve ark., 1999). Sahip olduğu kutupsal kapsülleri ve valfleri 4 veya daha fazla sayıda olmasıyla ayrılırlar (Abe ve Maehara, 2013). Bu çok sayıdaki valfin daha fazla yüzey alanı sağlayarak su sütununda süzülmesine neden olduğu ve böylece balığı enfekte etme şansını artırdığı ileri sürülmüştür (Whipps ve ark., 2004). Diğer karakteristik özelliği ise iki tek çekirdekli sporoplazmaya sahip olmasıdır. Bilinen *Kudoa* türleri deniz ve nehir ağzında yaşayan balıkları enfekte eder (Moran ve ark., 1999). *Kudoa* türlerinin çoğu tek konakçıdan tanımlanmasına rağmen bazı türlerin birden fazla konakçıyı enfekte ettikleri belirlenmiştir. Bu türlere örnek olarak *Kudoa thyrisites* (en az 38 farklı konakçı), *Kudoa nova* (20 konakçı) ve *Kudoa iwatai* (19 konakçı) verilebilir (Burger ve Adlard, 2011). *Kudoa* türleri çoğunlukla kemikli balıklarda bulunmasına rağmen bazı kıkırdaklı balıklardan da izole edilmiştir (Gleeson ve ark., 2010). Günümüzde *Kudoa* cinsi'nin sınıflandırılmasında morfolojik karakterlerin yanısıra belirli genlerin nükleotid dizilerinin moleküler filogenetik analizlerinden de faydalanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada sekans sonuçlarının gösterdiğine göre *Kudoa* türlerinin spor morfolojisinden ziyade coğrafik bölgeye göre filogenetik ağaçta yer bulduğu sonucuna varılmıştır (Hervio ve ark., 1997). *Kudoa*'ın sezona bağlı olarak konakçılarda bulunma yoğunluğuna göre çalışmalar da yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada sonbahar, kış, ilkbahar, yaz sezonları ve beş ayrı sınıfta balık (*Trachurus trachurus*) büyüklüklerine göre sınıflandırılmış sonucunda enfeksiyon yaygınlığı tüm sezonlar ve tüm balık gruplarında yüksek bulunmuştur (Cruz ve ark., 2003). Yine sargoz (*Diplodus sargus*) balıklarının ağ kafes içerisindeki yetiştiricilik koşullarında yıl boyunca yapılan bir deneyde *Kudoa* sp. düşük yaygınlık ve yoğunlukta bulunmuştur (Golomazou ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada ise Japon Pisisi (*Paralichthys olivaceus*) çiftliğindeki halkalı solucanlarda yapılan moleküler filogenetik çalışmalarda *Kudoa septempunctata*'nın mayısta % 40 ile en yüksek, sonrasında giderek azaldığı ve Ağustosun sonuna % 0 kaldığı görülmüştür (Paari ve ark., 2017). Bir eşkina balığı türünün (*Stellifer minor*) vücut kas dokusundaki *Kudoa sciaenae* kistleri varlığı üzerine yapılan araştırmada, balık vücudu 7 farklı bölge belirlenerek incelenmiştir. Kist dağılımının vücut kaslarının bu 7 bölgesinde eşit dağılımlı olmadığı gözlenmiştir. *Kudoa sciaenae* kistleri yaygınlığı ve yoğunluğu

balığın kafa bölgesinden, anteriorundan posterioruna doğru azalan bir yüzdede bulunmuştur (Oliva ve ark., 1992).

1.2.2 *Kudoa* Sistematığı

Filum: Cnidaria (Hatchek, 1888)

Subfilum: Myxozoa (Grasse, 1970)

Sınıf: Myxosporia (Bütschli, 1881)

Takım: Multivalvulida (Shulman, 1959)

Familya: Kudoidae (Meglitsch, 1960)

Cins: *Kudoa* (Meglitsch, 1947)

Tip Tür: *Kudoa clupeidae* (Hahn, 1917)

(Kristmundsson ve Freeman, 2014).

1.2.3 *Kudoa*'ın Konakçı Balıklar Üzerine Etkileri

Kudoa yaygın olarak ölüm sonrası pelteleşmiş et olarak bilinen otoliz enfeksiyonlarıyla ilgilidir. Bunun sonucu olarak konakçı balığın kas dokusuna verdiği zararlar ürün kalitesini düşürmektedir. Örneğin, yetiştirilen Atlantik ve Coho Salmonlarının *Kudoa thyrsites* ile enfekte olan filetoalarının hasattan sonra pazarlanmasını güçleştirmesiyle su ürünleri endüstrisine olumsuz etki etmektedir. *Kudoa* enfeksiyonlarının konakçı balığın görünürde fizyolojisi, yaşam süresi, davranışı üzerine etkisi görünmemektedir. Buna rağmen konakçı balığa yayılan psödokistlerin proteolitik enzimleri balığın ölümünden sonra hücreleri yıkması nedeniyle kas bozulmasından sorumludur (Moran ve ark., 1999). Sargoz balıkları (*Diplodus sargus*) üzerinde deneysel kafeslerde yıl boyunca yapılan çalışmada *Kudoa* sp. düşük yaygınlık ve yoğunlukta bulunmasına rağmen balığın vücut kaslarının dorsalinde fibroblast hücrelerinin sporlar tarafından sıklıkla çevrelenmiş ve uzunlamasına lezyonlarla kası dejenere ettiği görülmüştür (Golomazou ve ark., 2006). İki müren türü ve deniz tavşanı (*Anarchias lupus*, *Anarchias minor*, *Cyclopterus lumpus*) İzlanda için önemli ticari balık türleri üzerine yapılan çalışmada *Kudoa islandica* moleküler filogenetik çalışmalarla tanımlanmış ve zararlı etkileri bulunmuştur. Enfeksiyonun görünürde yaşayan konakçıda zararlı herhangi bir etkisi

olmasa da post mortem balık etinin pelteleşmesiyle ülkedeki bir çeşit Müren (*Anarchias minor*) çiftliklerinin kapanmasında önemli bir rol oynamıştır. Ayrıca ülkedeki geleneksel deniz tavşanı (*Cyclopterus lumpus*) kurutma ve tütsülemesinde zarara neden olduğu belirtilmiştir (Kristmundsson ve Freeman, 2014). Meksika körfezinin kuzeyindeki yedi balık türünün kalpleri üzerine yapılan çalışmada moleküler filogenetik çalışmalarla *Kudoa hypoepicardialis* izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu *Kudoa* türünün ise kalbin miyokardiyum katmanının ve epikardiyumun arasındaki fibrinli katmanın enflamasyonu bozulmaya neden olduğu görülmüştür (Blaylock ve ark., 2004). Amazon havzasındaki ticari değeri ve yetiştiricilikte değerlendirilebilecek olan bir çeşit Yayın balığı türünün (*Hypophthalmus marginatus*) özofagusu üzerindeki yapılan çalışmada konakçı örneklerin %60'ının bu bölgesinde *Kudoa* sp. psödokistleriyle enfeksiyon oluşturduğu ve özofausu hasara uğrattığı görülmüştür (Velasco ve ark., 2015). Karaip lapina balıklarının gonatlarında yapılan araştırmada *Kudoa ovivora* üreme hücrelerine yerleştiği ve enfekte olmamış yumurtalar % 98 oranında döllenirken enfekte olmuş yumurta hücrelerinin hiç döllenemediği gözlenmiştir. Bununla birlikte enfekte olmuş dişilerin enfekte olmayanlara göre daha düşük hızlarda büyüyeceği düşünülmektedir. Dahası hermafrodit olan bu balık türlerinin bu koşullarda yetişkin dişilerinin erkeğe dönüşeceği öngörülmektedir (Swearer ve Robertson, 1999). Portekizdeki istavrit (*Trachurus trachurus*) türündeki *Kudoa* sp. varlığının araştırıldığı çalışmada ise aksi olarak *Kudoa* sp. varlığı yüksek oranlarda tespit edilmesine rağmen konakçının ölüm sonrası kaslarında pelteleşme gözlenmemiştir. Dolayısıyla balık etinin pelteleşmesine neden olmamaktadır (Cruz ve ark., 2003). Bazı *Kudoa* türleri su ürünleri sektörü ve deniz balıkçılığında ürünün görünümü üzerine olumsuz etkileri nedeniyle ekonomik olarak önemlidir. Bütün bunların yanında Japonya'da geçmiş yıllarda artan çiğ balık tüketimiyle insanlarda besin zehirlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Abe ve Maehara, 2013). Yapılan çalışmada, kuvvetli ihtimalle Pisi balığının (*Paralichthys olivaceus*) çiğ tüketimiyle *Kudoa septempunctata*'nın gıda kaynaklı hastalıkta etiyolojik etken olduğu bulunmuştur (Kawai ve ark., 2012). Hastalarda yaygınlık sırasına göre ishal, kusma, karın ağrısı, bulantı ve ateş gibi semptomlar görülmüştür (Kim ve ark., 2018).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Karadeniz, Marmara ve Akdeniz çevresinde *Kudoa*'a ait türlerin belirlenmesine yönelik bugüne kadar yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar aşağıda kronolojik olarak sıralanmıştır.

Thelohan, (1895) Akdeniz çevresinden bazı balıklar üzerinde yapmış olduğu çalışmada *Kudoa quadratum* türünü ilk olarak *Chloromyxum quadratum* olarak tanımlamıştır.

Perard, (1928) yapmış olduğu çalışmayla Akdeniz çevresinde gözlenen *Kudoa histolytica* türünü ilk olarak *Chloromyxum histolyticum* olarak tanımlamıştır.

Naidenova ve ark., (1975) Karadeniz çevresinden bazı balıklar üzerinde yapılan çalışmada *Kudoa nova*'ı tanımlamışlardır.

Paperna, (1982) Akdeniz'de kültüre alınmış Çipuralar üzerinde yaptığı çalışmada iki *Kudoa* türünün böbrekte, mezenterde ve peritonyumda bulunduğunu ortaya koymuştur.

Lom ve ark., (1983) yaptıkları çalışmada Akdeniz'de bulunan 3 dil balığı türünün (*Arnoglossus imperialis*, *A. laterna*, *A. thori*) iskelet kaslarından *Kudoa lunata*'ı tanımlamışlardır. Bu türün kist oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Lom ve Dykova, (1988) yaptıkları çalışmada Akdeniz'de yaşayan iki Dil balığından (*Arnoglossus imperialis*, *A. laterna*) izole ettikleri *Kudoa lunata* türünün tüm yapısını, gelişimini ayrıntılarıyla inceleyerek ortaya koymuşlardır.

Naidenova ve Gaevskaya, (1991) Kızıldeniz'de yaşayan Kılıkuyruk balıkları (*Trichiurus haumela*) üzerinde yaptıkları çalışmada *Kudoa mirabilis*'i tanımlamışlardır.

Yurakhno, (1991) Karadeniz'de yaşayan Gümüş balıkları (*Atherina hepsetus*) üzerinde yaptığı çalışmada balığın böbreklerinden *Kudoa stellula*'ı izole etmiş ve tanımlamıştır.

Rigos ve ark., (1999) yedi farklı coğrafik bölgedeki 30 ağ kafes işletmesinden alınan levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*), sivriburun karagöz (*Puntazzo*

puntazzo) ve sinarit (*Dentex dentex*) balıkları üzerinde yapılan araştırmada *Kudoa* sp. ile bağırsaktan ağır olarak enfekte olduğu bulunmuştur.

Golomazou ve ark., (2006) Akdeniz'deki doğal kapalı lagünde hali hazırdaki iki çiftliğin ticari yetiştiricilik yaptığı kafeslerde sargoz (*Diplodus sargus*) balıkları üzerine yaptıkları çalışmada, *Kudoa* sp. yıl boyunca dűřük yaygınlık ve yoğunlukta olduğu bulunmuştur.

Yurakhno ve ark., (2007) Akdeniz'deki kefal balıkları (*Liza ramada* ve *Liza aurata*) üzerine yaptıkları çalıřmada yeni bir *Kudoa* tűrű olan *Kudoa unincapsula*'ı tanımlamıřlardır. Ayrıca bu çalıřma molekűler filogenetik çalıřmalarla desteklenmiř ve parazitin 18S ve 28S rDNA'ı olarak iki ayrı alt birimi çalıřılmıřtır. Bu çalıřmada molekűler filogenetik karakterizasyonda daha çok kullanılan 18S rDNA bűlgesi yerine 28S rDNA bűlgesinin *Myxozoa*'ın yakın iliřkili tűrlerinin filogenetik analizinde kullanılmasının daha kullanıřlı olabileceđi sonucuna varmıřlardır.

Gaglio ve ark., (2010) Akdeniz'deki kılıç balıklarının (*Xiphias gladius*) kas dokusu üzerindeki çalışmasında *Kudoa* sp. varlığını ve enfeksiyonunu çalışmışlardır.

Pascual ve ark., (2012) Karadeniz'deki kaya balıklarındaki (*Neogobius melanostomus*) *Kudoa nova* üzerine yaptıkları çalıřmada molekűler karakterizasyon için ribozomal DNA'nın 18S bűlgesini kullanmıřlardır. Çalıřmada parazitin yaygınlık ve yođunluđunun sezonlara gűre deđiřtiđini ve en önemlisi aynı soy hattından gelen *Kudoa* tűrlerinin belirli bir dokuyu enfekte ettiđi hipotezini destekleyen veriler elde etmiřlerdir.

Yurakhno, (2013) yaptıđı çalıřmada Karadeniz'deki gűműř balıklarının (*Atherina hepsetus*) bűbreklerinden *Kudoa stellula*'ın, iki kaya balıđı tűrűnűn (*Neogobius melanostomus* ve *Gobius niger*) kas dokusundan *Kudoa nova*'ın varlıđını tespit etmiřtir.

Kvach ve ark., (2014) Avrupa'nın dođusundaki istilacı kaya balıklarının (*Gobiidae*) parazit faunası üzerine yaptıkları çalıřmada, Dinyeper'in denize dűkűldűđű sulardaki kum kaya balıklarında (*Neogobius melanostomus*) *Kudoa nova* varlıđı bulunmuřtur.

Őzer ve ark., (2018) Karadeniz'de yařayan kaya balıklarının (*Neogobius melanostomus*) kas dokusundan *Kudoa niluferi*'i, gűműř balıklarının (*Atherina*

hepsetus) kas, üriner kese ve böbreklerinden ise *Kudoa anatolica*'ı izole etmişlerdir. Bu çalışmada filogenetik analizler ribozomal DNA'nın küçük alt birimini kodlayan 18S bölgesi kullanılarak yapılmış ve bu yeni iki türün filogenetik ağaçta *Kudoa nova* ile aynı soy hattından geldikleri bulunmuştur.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada materyal olarak *Kudoa anatolica* ve *K. nilüferi* (Özer ve ark. 2018) türlerine ait Myxozoa izolatları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Parazit örnekleri Sinop Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet ÖZER tarafından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan İzolat Bilgileri

İzolat İsmi	Tür İsmi	Konakçı Tür	Doku	Lokalite
AÖ-18	<i>Kudoa anatolica</i>	Çamuka (<i>Atherina hepsetus</i>)	Böbrek	Sinop
AÖ-20	<i>Kudoa anatolica</i>	Çamuka (<i>Atherina hepsetus</i>)	Kas	Sinop
AÖ-24	<i>Kudoa nilüferi</i>	Kum Kaya Balığı (<i>Neogobius melanostomus</i>)	Kas	Sinop

3.2 Yöntem

3.2.1 Dokulardan Parazit DNA Ekstraksiyonu

Kudoa spp. ile enfekte olmuş konak dokularından toplam genomic DNA izolasyonu için Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit kullanılmıştır (Şekil 3.1). Dokulardan izolasyon üretici firmanın direktifleri doğrultusunda aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.



Şekil 3.1 Genomik DNA
İzolasyonu İçin
Kullanılan Invitrogen
PureLink® Genomic
DNA Mini Kit

- Doku örneklerinden hassas terazi (Şekil 3.2) ile tartılıp 25 mg alınarak mikro santrifüj tüplere aktarılmıştır.



Şekil 3.2 Dokuların Tartılması İçin
Kullanılan Hassas Terazi
(Radwag AS 220/C/2)

- Mikro santrifüj tüplere 180 µl PureLink® Genomic digestan buffer ve 20mg/ml konsantrasyonundaki Proteinase K çözeltisinden 20 µl eklenmiştir.
- Mikro santrifüj tüpler bir gece süreyle 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sarsaklı inkübatörde bekletilmiştir (Şekil 3.3). Bu işlem sonucunda dokular parçalanmıştır.



Şekil 3.3 Genomik DNA
İzolasyonunda Kullanılan
Sarsaklı İnkübatör (Wise
WiseCube WIS-20)

- Mikro santrifüj tüpler oda sıcaklığında maksimum hızda (13 000 g) santrifüj edilerek pellet çöktürülmüştür (Şekil 3.4). Üstte kalan supernatantlar yeni mikro santrifüj tüplere aktarılmıştır.



Şekil 3.4 Genomik DNA
İzolasyonunda Kullanılan
Santrifüj (Sigma D-37520)

- Tüplere 20 µl RNase A ilave edilip kısa süre vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- Mikro santrifüj tüplere 200 µl Genomik Lysis / Binding Buffer ilave edilip vortekslenmiş ve homojen bir solüsyon elde edilmiştir.
- Daha sonra lizata 200 µl % 99'luk etanol ilave edilmiş ve homojen bir solüsyon elde edilene kadar vortekslenmiştir.
- Lizatlar 2 ml'lik PureLink® mini kolonlara aktarılarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne takılmıştır.
- Daha sonra kolon içerisine 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilerek oda sıcaklığında, 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar toplama tüpüne takılmıştır.

- Bu işlemi takiben kolon içerisine 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilerek oda sıcaklığında, maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir ve toplama tüpü atılmıştır.
- Kolonlar yeni birer toplama tüpüne aktarılmış ve içerisine 50 µl PureLink® genomik elüsyon tamponu ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra 10 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- Tüplerin içerisindeki genomik DNA -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 28S rDNA Bölgesinin PZR ile DNA Yükseltgenmesi

Bu çalışmada PZR yükseltgemeleri için Techne TC-PLUS Thermal Cycler kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 PZR Yükseltgemeleri İçin Kullanılan Thermal Cycler (Techne TC-PLUS)

Kudoa spp. örneklerinden 28S rDNA gen bölgelerinin PZR ile yükseltgenmesi için Kt28S1F (5'-CAA GAC TAC CTG CTG AAC-3') / 28S1R (GTG TTT CAA GAC GGG TCG-3') primer çifti kullanılmıştır (Whipps ve ark. 2004). 50 µl'lik PZR karışımı Çizelge 3.2'de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2 28S rDNA Gen Bölgesinin Yükseltgenmesi İçin Yapılan PZR Karışımının İçeriği

İçerik	X1 (µl)
ddH₂O	17
2X Master Mix (Sigma)	25
Primer Forward (Kt28S1F)	1.5
Primer Reverse (28S1R)	1.5
Kalıp DNA	5
TOPLAM (µl)	50

PZR yükseltgemeleri için kullanılan program döngüsü Çizelge 3.3’de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Çizelge 3.3 PZR Amplifikasyonu İçin Kullanılan PZR Programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlkin Denatürasyon	95 °C	3 dak.	X1
Denatürasyon	94 °C	1 dak.	
Primer Bağlanma	49 °C	1 dak.	X40
	(TD -0.1°C / Cyc)		
Uzama	72 °C	1 dak.	
Son Uzama	72 °C	10 dak.	X1

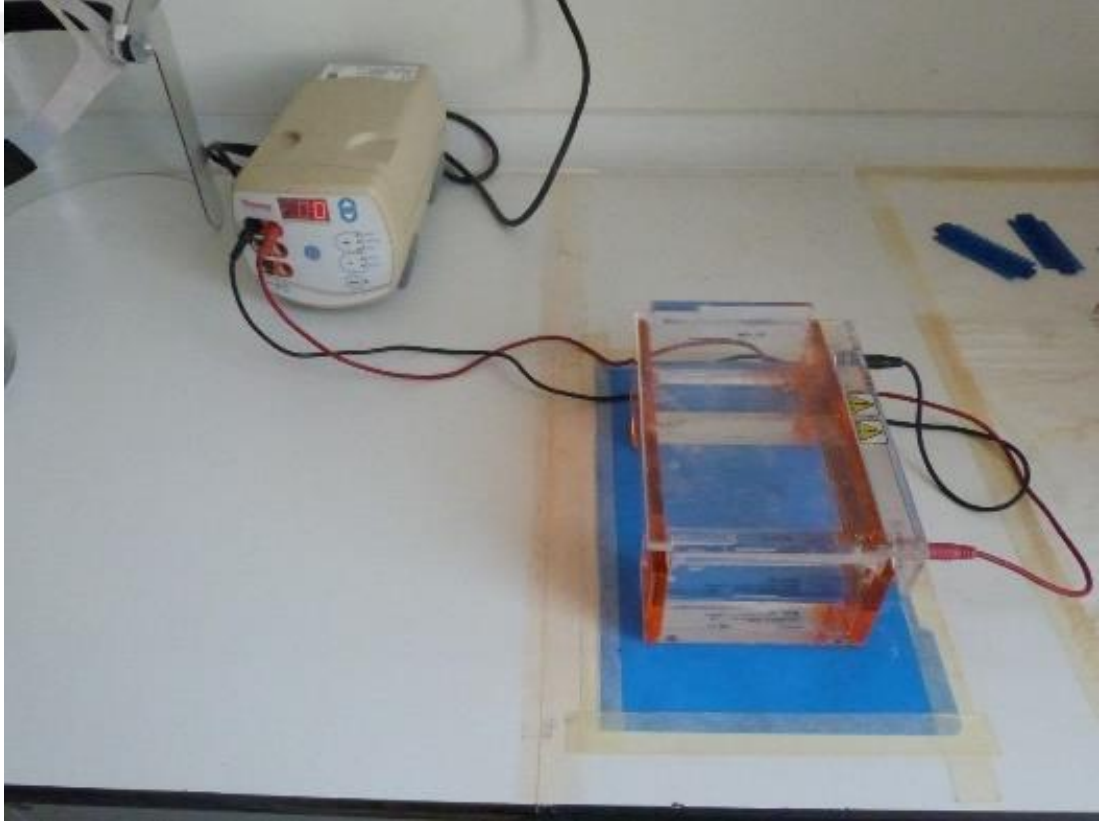
3.2.3 DNA’ ın Jel Elektroforeziyle Yürütülmesi

Genomik DNA izolasyonu ve PZR yükseltgemeleri neticesinde elde edilen DNA’nın gözlenmesi ve kontrol edilmesi için elektroforez yürütmesi yapılmıştır. Elektroforez uygulamaları için agaroz jel %0.8 konsantrasyonda aşağıda açıklandığı şekliyle hazırlanmıştır;

- 100 agaroz hazırlamak için öncelikle 0.8 gr toz halindeki agaroz jel (Sigma A9530-100G) tartılarak Erlenmeyer şişesi içerisine konmuştur.
- Erlenmeyer içerisine toplam hacim 100 ml olacak şekilde 1X TBE (Tris Borat EDTA bkz. 3.2.5) tamponu eklenmiştir.

- 1X TBE tamponu içerisindeki agaroz jel mikrodalga fırın içerisinde eritilmiştir.
- Agaroz jel sıcaklığı yaklaşık 60-65°C'ye düştüğünde içerisine ethidium bromide (10 mgr/ml stoktan 4-5 µl) eklenmiş ve elektroforez tablası içerisine dökülmüştür.
- Tabla agaroz jel tamamen donana kadar hareket ettirmeden düz bir zeminde bekletilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan agaroz jel elektroforez tankı içerisine (1X TBE tampon ile dolu) yerleştirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. DNA'nın Yürütülmesi İçin Kullanılan Elektroforez (Thermo Scientific EC300XL2-B1)

Genomik DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi için yükleme tamponu (Fermentas 6X Loading Dye) kullanılmıştır. Bu işlem için 1 µl yükleme tamponu, 3 µl DNA ve 2 µl su karıştırılarak jel kuyularına yükleme yapılmıştır. Daha sonra agaroz jele 10V/cm'lik akım verilerek DNA'nın jel içerisinde yürütülmesi sağlanmıştır.

3.2.4 28S rDNA Bölgesinin Nükleotit Dizilemesi ve Filogenetik Analizler

PZR ile çoğaltılan 28S rDNA gen gölgelerinin nükleotit dizilemeleri MacroGen Europe B.V. (Hollanda) firması tarafından ticari olarak yapılmıştır. Nükleotit dizilemeleri PZR yükseltgemeleri için kullanılan primer çifti (Kt28S1F / 28S1R) kullanılarak çift yönlü yapılmıştır. Her iki yöndeki kalıp zincirler üzerinden yapılan dizileme sonuçları BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak temizlenmiş ve birleştirilmiştir. Bu şekilde örneklerin 28S rDNA dizileri kontrollü ve doğru bir şekilde elde edilmiştir. Filogenetik analizler için veri seti oluşturulması amacıyla farklı *Kudoa* türlerine ait 28S rDNA haplotipleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından indirilmiştir (Çizelge 3.3). Haplotiplerin homolog bazlarının hizalanması için ClustalX v. 2.1 (Thompson ve ark. 1997) programı kullanılmıştır. Hizalamalar BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak kontrol edilmiş ve gerekli görülen yerler düzeltilmiştir. Hizalanmış veri setine en uygun evrimsel modelin seçilmesi için jModelTest v. 0.1 (Posada, 2008) programı kullanılarak AIC (Akaike Information Criterion; Akaike, 1974) ve BIC (Bayesian Information Criterion) testleri uygulanmıştır. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişkilerin ortaya konulması için genetik uzaklık esasına dayalı Neighbor-Joining (NJ) algoritmasının yanı sıra karakter durumlarına dayalı Maximum-Likelihood (ML) ve Maximum-Parsimony (MP) algoritmaları kullanılarak 3 farklı filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analizlerden NJ ve MP için PAUP 4.0b10 (Swafford, 2003) programı kullanılmıştır. MP analizleri heuristik araştırma metodu, Branch-Swapping ve Tree-Bisection-Connection algoritmaları kullanılarak yapılmıştır. Analizler rasgele 10 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Üçüncü algoritma olan ML analizleri ise PHYML v. 3.0 (Guindon ve Gascuel, 2003) programı kullanılarak yapılmıştır. Ortaya konulan filogenetik ilişkilerin güvenilirliklerinin test edilmesi için Bootstrap analizleri yapılmıştır. Bu analiz NJ için 10 000, MP ve ML ağaçları için ise 1000 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.5 Kullanılan Çözeltiler

3.2.5.1 EDTA (0.5 M) pH 8

Stok 100 ml 0.5 M EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya) çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Bunun için için 14.6 gram EDTA (Sigma, Steinheim, Almanya) 80 ml ddH₂O'ya ilave edilmiştir. Çözelti manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken NaOH eklenmek suretiyle pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Daha sonra ddH₂O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Durmaz, 2001).

3.2.5.2 TBE (Tris-Borat-EDTA)

1000 ml 10X TBE tamponu hazırlamak için 108 gr Trizma Base (Sigma, Steinheim, Almanya), 55 gr Borik Asit (Merck, Darmstadt, Almanya) tartılmış ve içerisine 40 ml 0.5M pH: 8 EDTA (bkz. 3.2.5.1) eklenmiştir. Çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Tampon 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 1/10 oranında sulandırılarak (1X TBE) kullanılmıştır (Maniatis ve ark. 1982).

Çizelge 3.4 Filogenetik Analizlerde Kullanılan İzolatlar

Tür / Vocher	Konak	Ülke	Gen Bank Numarası	Kaynak
<i>Kudoa anatolica</i> / AÖ-18	<i>Atherina hepsetus</i>	Türkiye	-	Bu çalışma
<i>Kudoa anatolica</i> / AÖ-20	<i>Atherina hepsetus</i>	Türkiye	-	Bu çalışma
<i>Kudoa nilüferi</i> / AÖ-24	<i>Neogobius melanostomus</i>	Türkiye	-	Bu çalışma
<i>Kudoa ovivora</i>	<i>Thalassoma bifasciatum</i>	Panama	AY302731	Whipps ve ark. (2004)
<i>Kudoa paraquadricornis</i> / KpCs	<i>Caranx sexfasciatus</i>	Avustralya	FJ792752	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa quadricornis</i> / KqCf2	<i>Carangoides fulvoguttatus</i>	Avustralya	FJ792754	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa grammatorcyni</i>	<i>Grammatorcynus bicarinatus</i>	Avustralya	AY302729	Whipps ve ark. (2004)
<i>Kudoa neothunni</i> / NH-Ksp-2012YK	<i>Thunnus orientalis</i>	Japonya	AB710385	Abe ve Maehara (2013)
<i>Kudoa monodactyli</i> / KmMa	<i>Monodactylus argenteus</i>	Avustralya	FJ792748	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa septempunctata</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Güney Kore	AB693040	Matsukane ve ark. (2011)
<i>Kudoa whippsi</i> / NR	<i>Ostorhinchus aureus</i>	Avustralya	JX090296	Heiniger ve ark. (2013)
<i>Kudoa neurophila</i> / KnSl	<i>Seriola lalandi</i>	Avustralya	GU808774	Burger ve Adlard (2010)

Çizelge 3.4 Filogenetik Analizlerde Kullanılan İzolatlar (Devamı)

<i>Kudoa lethrini</i> / Lf3	<i>Lutjanus fulviflamma</i>	Avustralya	JQ026228	Miller ve Adlard (2012)
<i>Kudoa thalassomi</i> / KtNm	<i>Neoglyphidodon melas</i>	Avustralya	HM022136	Burger ve Adlard (2011)
<i>Kudoa yasunagai</i> / Le5	<i>Lutjanus ehrenbergii</i>	Avustralya	JQ026229	Miller ve Adlard (2012)
<i>Kudoa thyrsites</i> / Kt3S1	<i>Seriola lalandi</i>	Avustralya	GU191935	Burger ve ark. (2009)
<i>Kudoa inornata</i> / IF-2009	<i>Cynoscion nebulosus</i>	A.B.D.	FJ790312	Dykova ve ark. (2009)
<i>Kudoa diana</i> / M0290	<i>Sphoeroides annulatus</i>	Meksika	FJ417058	Bartosova ve ark. (2009)
<i>Kudoa paniformis</i>	<i>Merluccius productus</i>	Kanada	AY302732	Whipps ve ark. (2004)
<i>Kudoa cookii</i> / HI3	<i>Ostorhinchus cookii</i>	Avustralya	JX090303	Heiniger ve ark. (2013)
<i>Kudoa iwatai</i> / K-20110502	<i>Platycephalus sp.</i>	Japonya	AB628193	Abe ve ark. (2011)
<i>Kudoa hemiscylli</i> / Oo2	<i>Orectolobus ornatus</i>	Avustralya	GU446629	Gleeson ve ark. (2010)
<i>Kudoa carcharhini</i> / Cc1	<i>Carcharhinus cautus</i>	Avustralya	GU446630	Gleeson ve ark. (2010)
<i>Kudoa scomberi</i> / NSMT:Pr323	<i>Scomber japonicus</i>	Japonya	AB693045	Li ve ark. (2013)
<i>Kudoa crumena</i> / KcTa4	<i>Thunnus atlanticus</i>	Saint Kitts and Nevis	KC139230	Griffin ve ark. (2014)

Çizelge 3.4 Filogenetik Analizlerde Kullanılan İzolatlar (Devamı)

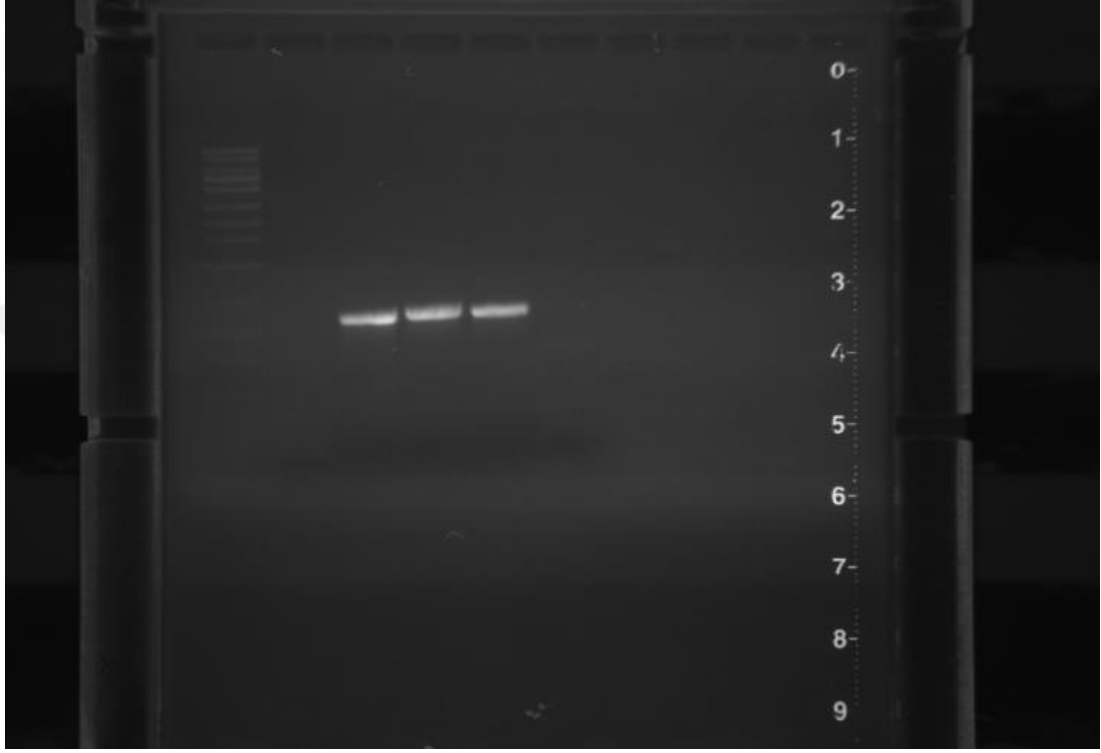
<i>Kudoa leptacanthae</i>	<i>Zoramia leptacantha</i>	Avustralya	JQ974030	Heiniger ve Adlard (2012)
<i>Kudoa thunni</i> / NSMT:Pr277-279	<i>Thunnus alalunga</i>	Pasifik Okyanusu	AB553306	Matsukane ve ark. (2011)
<i>Kudoa trachuri</i> / NSMT:Pr273-275	<i>Trachurus japonicus</i>	Japonya	AB553305	Matsukane ve ark. (2011)
<i>Kudoa amamiensis</i> / KaAb1	<i>Abudefduf bengalensis</i>	Avustralya	FJ792727	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa kenti</i> / KkPl	<i>Plectroglyphidodon leucozonus</i>	Avustralya	FJ792747	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa quraishii</i>	<i>Rastrelliger kanagurta</i>	Sudi Arabistan	KF830722	Mansour ve ark. (2014)
<i>Kudoa cheilodipteri</i> / LI 28S	<i>Cheilodipterus quinquelineatus</i>	Avustralya	JX090299	Heiniger ve ark. (2013)
<i>Kudoa gunterae</i> / KgAsor	<i>Abudefduf sordidus</i>	Avustralya	FJ792735	Burger ve Adlard (2010)
<i>Kudoa islandica</i> / Atlwlf/Lmp	<i>Cyclopterus lumpus</i>	İzlanda	KJ857071	Kristmundsson ve Freeman (2014)
<i>Kudoa unicastula</i>	<i>Liza ramada</i>	İspanya	AM490335	Yurakhno ve ark. (2007)
<i>Kudoa miniauriculata</i>	<i>Sebastes paucispinis</i>	A.B.D.	AY302730	Whipps ve ark. (2004)
<i>Kudoa musculoliquefaciens</i>	<i>Istiophorus platypterus</i>	Japonya	LC097084	Kasai ve ark. (2016)
<i>Kudoa pleurogrammi</i>	<i>Pleurogrammus monopterygius</i>	A.B.D.	LC097086	Kasai ve ark. (2016)
<i>Kudoa trifolia</i>	<i>Liza aurata</i>	İspanya	AM490336	Yurakhno ve ark. (2007)

Çizelge 3.4 Filogenetik Analizlerde Kullanılan İzolatlar (Devamı)

<i>Kudoa ogawai</i>	<i>Hyperoglyphe japonica</i>	Japonya	AB636471	Yokoyama ve ark. (2012)
<i>Ceratonova shasta</i> / Bartholomew IG-CO-902	Coho Salmon	A.B.D.	FJ981818	Evans ve ark. (2010)

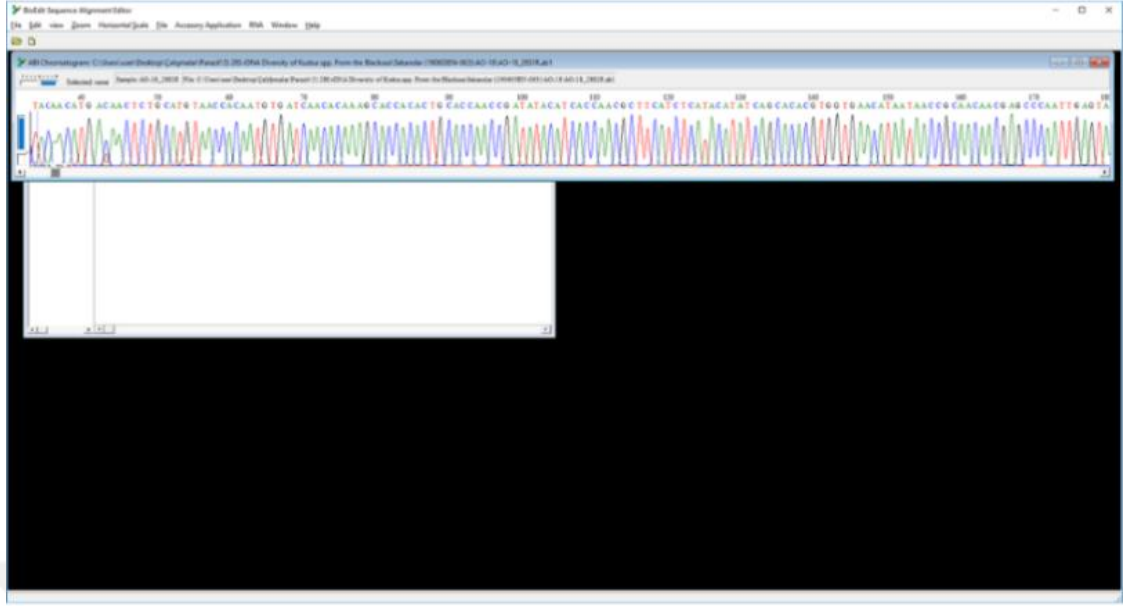
4. BULGULAR

Ribozomal RNA'nın büyük alt birimini kodlayan 28S rDNA gen bölgesinden Kt28S1F / 28S1R primer çifti kullanılarak yapılan PZR yükseltmeleri sonucunda beklenen büyüklükte (yaklaşık 750 bp) DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 28S rDNA Gen Bölgesinin PZR Yükseltme Ürünlerine Ait AgaroZ Jel Görüntüsü

Macrogen Europe B.V. (Hollanda) firması tarafından PZR yükseltmeleri için kullanılan primer ile (Kt28S1F / 28S1R) iki zincir üzerinden (çift yönlü olarak) nükleotid dizilemeleri başarılı bir şekilde yapılmıştır (Şekil 4.2).



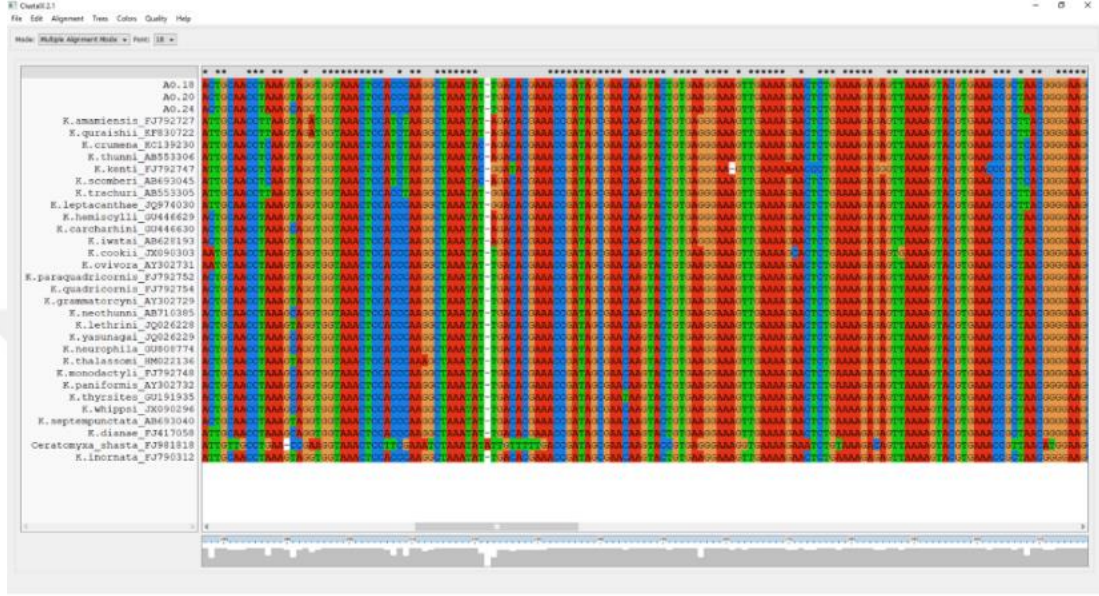
Şekil 4.2. Bu Çalışmada Yaptırılan 28S rDNA Nükleotid Dizileme İşlemine Ait Kromatogram Görüntüsü

Gen bölgesinin çift yönlü olarak yapılan dizilemeleri BioEdit programı kullanılarak kontrol edilmiş ve birleştirilmiştir. Bu şekilde dizilemesi yapılan 28S rDNA gen bölgesinin kısmi nükleotid dizileri (yaklaşık 730 bp) elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. BioEdit Programı İle Birleştirilen Nükleotid Zincirlerini Gösteren Grafik

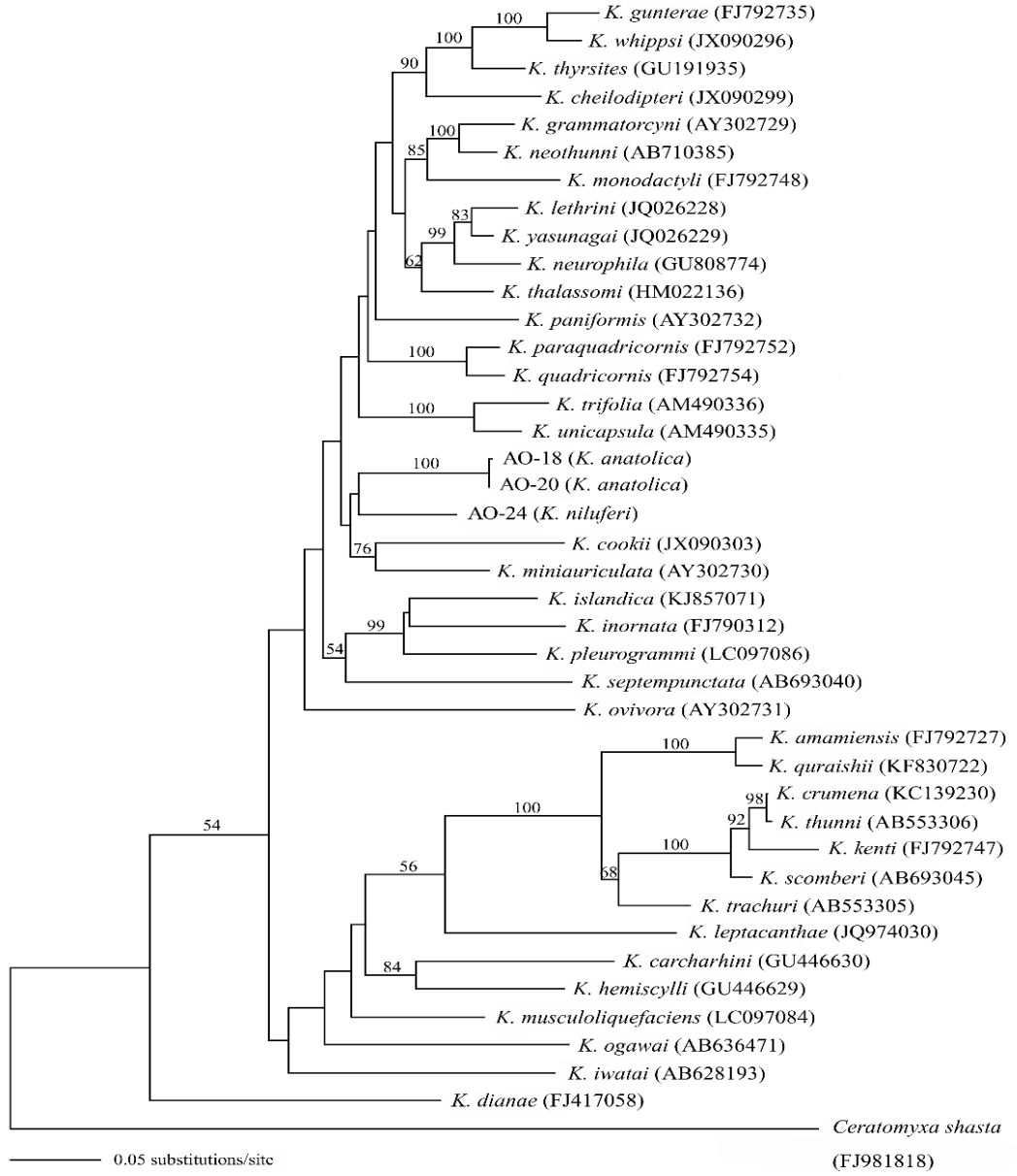
GenBank'tan tanımlanmış *Kudoa* türlerine ait 28S rDNA haplotipleri indirilerek veri seti oluşturulmuş ve yeni *K. anatolica* ve *K. nilüferi* haplotiplerimizle birlikte çoklu nükleotid hizlamaları yapılmıştır (Şekil 4.4). Bu şekilde homog bazlar altalta gelecek şekilde hizalamalar yapılmıştır.



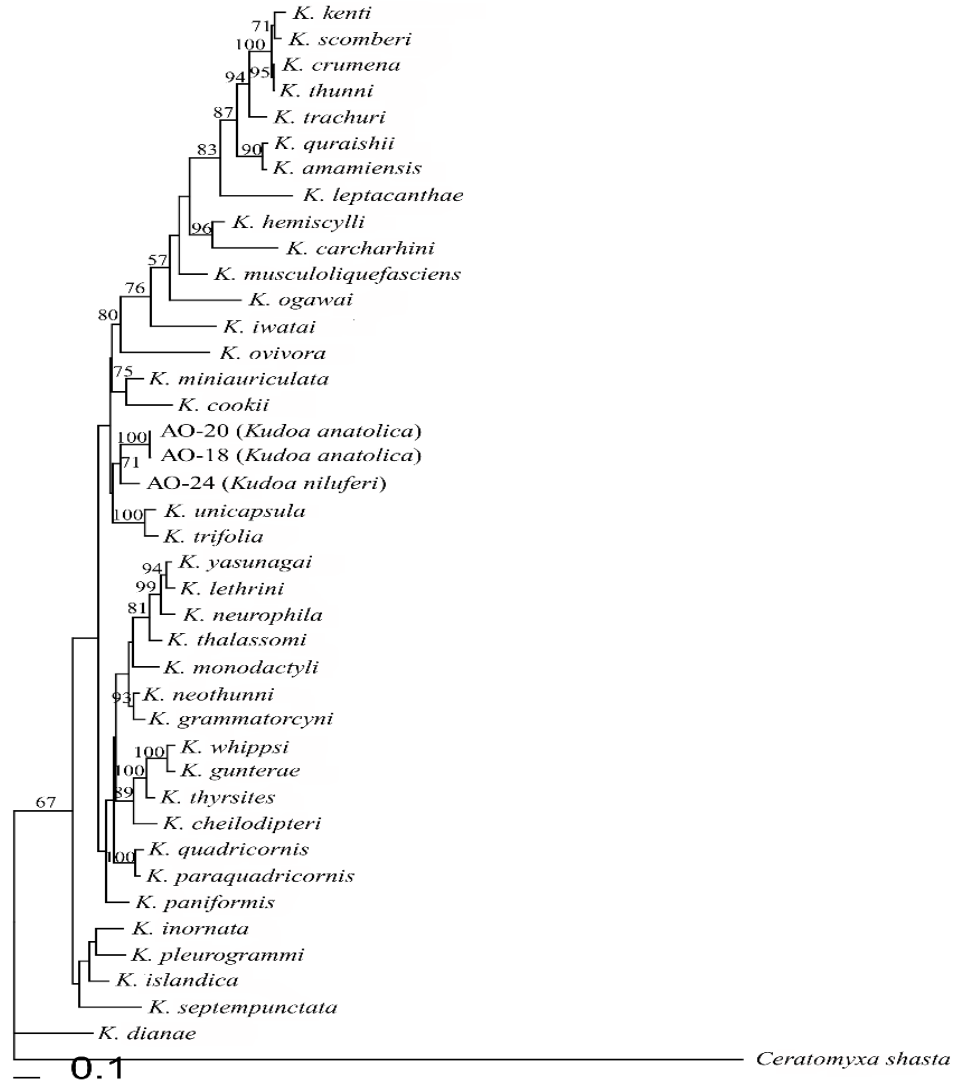
Şekil 4.4. Bu Çalışmada Elde Ettiğimiz 28S rDNA Haplotipleri İle Farklı *Kudoa* Türlerine Ait Haplotiplerin Çoklu Nükleotid Hizlamalarını Gösteren Grafik

Filogenetik analizler bu çalışmada elde ettiğimiz *K. anatolica* ve *K. nilüferi* 28S rDNA haplotiplerine ek olarak GenBank tan indirilen 37 farklı *Kudoa* türüne ait haplotler kullanılarak yapılmıştır. Oluşturulan ağaçlar *Ceratomyxa shasta* türü ile köklendirilmiştir. Analizler 305 polimorfik bölge içeren toplam 703 hizalanmış baz üzerinden yürütülmüştür. Bununla birlikte veri setindeki toplam mutasyon miktarı (insersiyon ve delesyon mutasyonları dahil) 523 olarak belirlenmiştir. jModelTest v. 0.1 programı kullanılarak yapılan AIC ve BIC testleri sırasıyla TPM3uf+I+G (I: 0.149; G:0.72) ve HKY+I+G (I: 0.15; G:0.712) baz değişim modellerini önermiştir. HKY+I+G modeli daha yüksek Bootstrap değerleri verdiği için bu tez çalışmasında bu model kullanılarak oluşturulan Neighbor-Joining (NJ; Şekil 4.5) ve Maximum-Likelihood (ML; Şekil 4.6) ağaçları verilmiştir. Parsimony analizleri 220 sinapomorfik karakter üzerinden yürütülmüştür. Analizler sonucunda eşit uzunlukta (2486 basamak) 13 ağaç elde edilmiş olup (CI:0.412309; RI: 0.588451; HI:0.587691) bu ağaçların

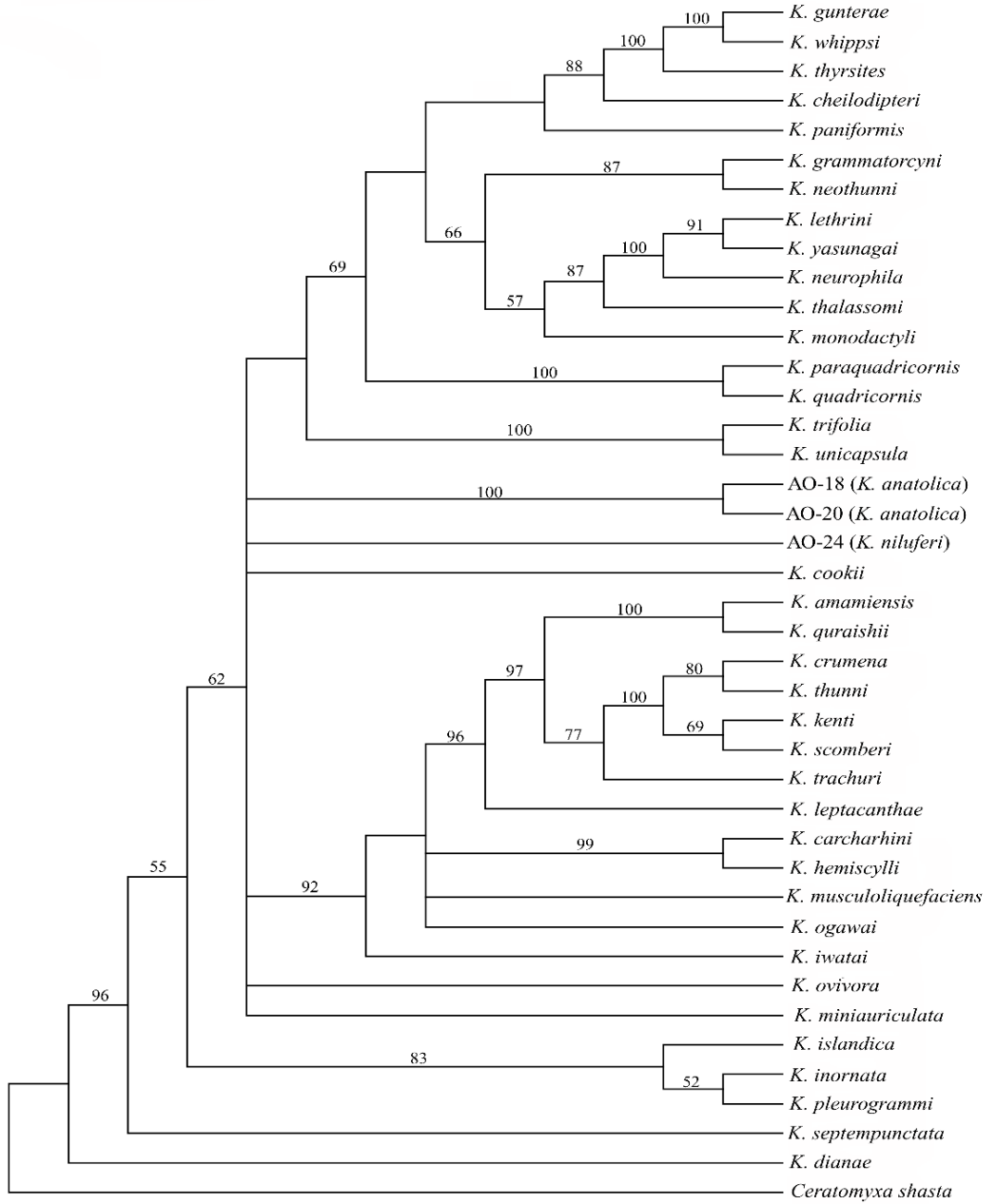
konsensüs ağacı Şekil 4.7’de gösterilmiştir. NJ (Şekil 4.5), ML (Şekil 4.6) ve MP (Şekil 4.7) algoritmaları ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda topolojik olarak farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışmadaki hedef türlerden birincisi olan *K. anatolica* izolatları (AO-18 ve AO-20) arasında %99,8’lik bir 28S rDNA nükleotit dizi benzerliği belirlenmiştir ve bu iki izolat tüm ağaçlarda %100’lük Bootstrap değerleri ile desteklenen ortak bir soy hattı oluşturmuştur. Diğer türümüz olan *K. niluferi* (AO-24) ise AO-18 ve AO-20 ile sırasıyla 87,2% ve 87,3%’lük nükleotit dizi benzerliği göstermiş ve *K. anatolica* ile ortak bir soy hattı oluşturmuştur. Bu türlerin her ikisinde Karadenizin Sinop ili kıyılarından izole edilip tanımlanmış türler olduğundan bu türlerin oluşturduğu soy hattı Karadeniz soy hattı olarak adlandırılabilir. Bu soy hattı NJ (Şekil 4.5) ve ML (Şekil 4.6) algoritmaları ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda gözlenirken, MP (Şekil 4.7) ağacında *K. cookie* türü ile birlikte politomi şeklinde bir ilişki ortaya koymuşlardır. NJ ağacında *Kudoa cooki* ve *K. miniauriculata* türleri Karadeniz soy hattı ile ilişkili çıkmış ve ortak bir soy hattı oluşturmuştur ancak bu ilişki yeterli Bootstrap değeri ile desteklenememiştir. Buna karşın ML ağacında ise Karadeniz soyhattı İspanya’dan tanımlanan *K. unicasula* ve *K. trifoli* türleri ile ortak bir soy hattı oluşturmuşlardır. Benzer şekilde bu ilişkide yeterli Bootstrap değeri ile desteklenememiştir.



Şekil 4.5. Bu Çalışmada Elde Ettiğimiz *K. anatolica* (AO-18 ve AO-20) ve *K. niluferi* (AO-24) 28S rDNA Haplotipleri ile Farklı *Kudoa* Türlerine Ait Haplotiplerin Filogenetik İlişkilerini Gösteren NJ Ağacı. Bu Ağaç HKY+I+G Baz Değişim Modeli Kullanılarak Oluşturulmuş ve *Ceratomyxa shasta* Türü ile Köklendirilmiştir. 50%'nin Üzerinde Desteklenmiş Dğümler İçin Bootstrap Değerleri Ağaç Üzerinde Gösterilmiştir



Şekil 4.6. Bu Çalışmada Elde Ettiğimiz *K. anatolica* (AO-18 ve AO-20) ve *K. niluferi* (AO-24) 28S rDNA Haplotipleri ile Farklı *Kudoa* Türlerine Ait Haplotiplerin Filogenetik İlişkilerini Gösteren ML Ağacı. Bu Ağaç HKY+I+G Baz Değişim Modeli Kullanılarak Oluşturulmuş ve *Ceratomyxa shasta* Türü ile Köklendirilmiştir. 50%'nin Üzerinde Desteklenmiş Dügümler İçin Bootstrap Değerleri Ağaç Üzerinde Gösterilmiştir



Şekil 4.7. Bu Çalışmada Elde Ettiğimiz *K. anatolica* (AO-18 ve AO-20) ve *K. niluferi* (AO-24) 28S rDNA Haplotipleri ile Farklı *Kudoa* Türlerine Ait Haplotiplerin Filogenetik İlişkilerini Gösteren MP Ağacı. Bu Ağaç *Ceratomyxa shasta* Türü ile Köklendirilmiştir ve 50%'nin Üzerinde Desteklenmiş Düğümler İçin Bootstrap Değerleri Ağaç Üzerinde Gösterilmiştir

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında Myxozoa grubuna ait *Kudoa anatolica* ve *K. niluferi* parazit türlerinin 28S rDNA genlerinin nükleotit dizilerine dayalı filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu parazitler Karadeniz'in Sinop kıyılarında yakalanan *Atherina hepsetus* ve *Neogobius melanostomus* konaklarından izole edilerek tanımlanmıştır (Özer ve ark., 2018).

Myxosporea 17 familya ve 64 cins içerisinde sınıflandırılan yaklaşık 2200 tür içeren önemli bir balık parazit grubudur (Fiala ve ark., 2015). Bu grup içerisindeki önemli cinslerden biri olan *Kudoa* Meglitsch, 1947 oldukça geniş bir coğrafik alanda genellikle deniz balıklarını enfekte eden önemli bir Myxozoa cinsidir. Bu güne kadar cins içerisinde 95 nominal tür tanımlanmıştır ve hemen hiçbirinin yaşam döngüsü tam olarak bilinmemektedir (Eiras ve ark., 2014). Bu parazit cinsin üyeleri histozoik ve iskelet kasları içerisinde tanımlanmıştır (Özer ve ark., 2018). Bu cins içerisindeki bazı türler ölüm-sonrası et yumuşaklığına (post-mortem myoliquefaction) sebep olduğu için ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle akuakültürde önem taşımaktadır, buna ek olarak bazı türleri gıda zehirlenmelerine de neden olabildiği için insan sağlığı açısından da önem taşımaktadır (Burger ve Adlard 2011; Kawai ve ark., 2012). Bu cinsin sporları tipik olarak her biri polar kapsül içeren dört yada daha fazla kabuk valfi bulundurmaktadır ve cins içerisinde tür teşhis ve tanımlamaları temel olarak bu sporların morfolojilerine ve morfometrilerine dayanmaktadır (Lom ve Arthur 1989; Whipps ve ark., 2004). Bununla birlikte, Woese ve Fox (1977)'un yaptığı öncü çalışma ile başlayan moleküler filogeni alanındaki gelişmeler canlılar arasındaki evrimsel ilişkileri moleküler seviyede inceleme imkanı ortaya koymuştur. *Kudoa* taksonomisinde bu gelişmelerden etkilenmiş ve son yıllarda morfolojik karakterlerin yanı sıra moleküler filogenide teşhis ve tanımlamalarda olmazsa olmaz bir hal almıştır. Myxosporea içerisindeki ilk moleküler tabanlı çalışmalar 1990'lı yılların ilk yarısında yapılmıştır (Smothers ve ark. 1994; Siddal ve ark., 1995). Genel olarak 18S rDNA oldukça yavaş evrimleştiğinden, dolayısıyla büyük oranda korunmuş olduğundan uzak akraba soy hatları arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Sogin 1989). Bununla birlikte genel kabulün aksine bu gen bölgesinin *Myxozoa* içerisinde oldukça yüksek oranda varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir bu nedenle günümüzde inter ve intra-spesifik ilişkilerin ortaya konmasında

yaygın olarak kullanılmaktadır (Kent ve ark., 2001). *Kudoa* cinsi için ilk çarpıcı moleküler tabanlı çalışma Hervio ve ark., (1997) tarafından yapılmış olup araştırmacılar 18S rDNA gen bölgesini genetik markör olarak kullanmışlardır. İlerleyen dönemlerde ısı şok protein (*hsp70*) ve ITS-1 gibi farklı genetik markörler de bu cins için kullanılsa da çok anlamlı sonuçlar elde edilememiştir (Whipps ve Kent 2006), dolayısıyla günümüzde *Kudoa* cinsini de kapsayan *Myxosporaea* grubu için temel genetik markör olarak 18S rDNA kullanılmaktadır. Diğer *Myxosporaea* grubu cinslerinden farklı olarak *Kudoa* cinsi için 18S rDNA'ya ek olarak 28S rDNA gen bölgesi de yaygın olarak kullanılmaktadır, bu nedenle tanımlanmış pek çok *Kudoa* türüne ait 28S rDNA haplotipi GenBank'ta hali hazırda bulunmaktadır. Bu çalışmada Karadeniz'den tanımlanan iki *Kudoa* türünün (*Kudoa anatolica* ve *K. niluferi*) 28S rDNA gen bölgesine dayalı filogenisi yapılmıştır. Üç farklı algoritma (NJ, ML ve MP) kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda topolojik olarak farklılıklar gözlemlenmiştir. Ayrıca internal düğümlerde Bootstrap değerleri ya elde edilememiş yada %50'nin altında kalmıştır. Bu durum bizim kanımızca 28S rDNA gen bölgesinin yüksek miktarda varyasyon içermesinden kaynaklanmaktadır. Bir cinsin bütün türlerini kapsayan yada daha yüksek taksonomik seviyedeki filogenetik analizler için kullanılan genetik markörün yeterli varyasyon yanında korunmuş bölgelerde içermesi gerekmektedir. Yukarıda belirtildiği üzere 18S rDNA bu amaç için uygundur, buna karşın 28S rDNA daha fazla varyasyon içermektedir. Bu durum bir avantaj gibi görünse de evrimsel açıdan uzak örnekler içeren geniş veri setleri üzerinde çalışılırken tam tersi olarak dezavantaj oluşturmaktadır. Bu durumun temel nedeni homolog bazların doğru şekilde hizalanamaması dolayısıyla bir homoplazi durumunun ortaya çıkma olasılığıdır. Ayrıca bölge yüksek miktarda insersiyon veya delesyon mutasyonu içerdiğinden hizalama sonucunda çok miktarda boşluk (gap) oluşmaktadır, bu durum filogenetik açıdan önemli pek çok verinin (nükleotitin) analizlerde kullanılamamasına (missing data) neden olmaktadır. Bu nedenle bizim sonuçlarımız 28S rDNA gen bölgesinin *Kudoa* cinsi ve muhtemelen tüm Myxozoa için tür içi yada yakın ilişkili türler arasındaki ilişkilerin ortaya konması için kullanılmasını işaret etmektedir.

Özer ve ark., (2018) 18S rDNA nükleotit dizileri kullanarak yaptıkları filogenetik analizlerde, tanımladıkları *K. anatolica* ve *K. niluferi* türlerinin yine Azak Denizi'den *Neogobius melanostomus*'dan izole edilmiş *K. nova* izolatu ile aynı soy hattı içerisinde

yer aldığını belirtmişler ve bu bulguya dayanarak *Kudoa* cinsi içerisinde Karadeniz'e özel bir soy hattı olabileceğini ifade etmişlerdir. *K. nova* dünyanın farklı bölgelerinden ve farklı balık türlerinden rapor edilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmalar morfolojik tabanlı olup moleküler veri içermemektedir. Pascual ve ark., (2012) *K. nova*'nın tür tanımı anlamında geniş bir morfolojik plastisite gösterdiğini dolayısıyla gerçekte içerisinde birden fazla tür barındıran bir kompleks olabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bu türünün Karadeniz için endemik bir tür olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışma kapsamında 28S rDNA nükleotit dizileri kullanarak oluşturduğumuz filogenetik ağaçlarda Karadeniz'den tanımlanan *K. anatolica* ve *K. niluferi* türleri ortak bir soy hattı oluşturduğundan bu gen bölgesinde 18S rDNA gen bölgesi gibi *Kudoa* cinsi içerisinde Karadeniz'e özel bir soy hattı olabileceği düşüncesini desteklemiştir. Bununla birlikte elimizde *K. nova* izolatu olmaması ve ayrıca GenBank'ta bu türe ait bir 28S rDNA haplotipinin bulunmaması bir eksiklik olarak ortaya çıkmıştır. İlerleyen aşamalarda daha fazla sayıda *K. anatolica* ve *K. niluferi* izolatlarına ek olarak Karadeniz'den izole edilmiş *K. nova* izolatlarında temin edilerek 28S rDNA nükleotit dizileri belirlenecek ve bu Karadeniz soy hattının varlığı net olarak ortaya konulacaktır.

Sonuç olarak bu çalışmada daha önceden Özer ve ark., (2018) tarafından *Kudoa* cinsi içerisinde varlığı önerilen Karadeniz soy hattına dair daha fazla moleküler kanıt elde edilmiştir. Ancak bu hipotezin doğruluğunun kanıtlanması için daha *K. nova* izolatlarının yanı sıra daha fazla sayıda *K. anatolica* ve *K. niluferi* örneğine ihtiyaç vardır. Ayrıca elde edilen diğer bir sonuçta 28S rDNA gen bölgesinin yüksek miktarda varyasyon içermesinden dolayı tür içi yada aynı soy hattı içerisindeki yakın ilişkili türler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak için ideal bir genetik markör olduğudur.

6. KAYNAKLAR

- Abe, N., Maehara, T., Kashino, M., & Ohyama, M. (2011). Identification of Parasites Found in Fresh Fish by Morphological and Sequencing Analyses. *Annual Report of Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences*, 73, 29-37.
- Abe, N., & Maehara, T. (2013). Molecular characterization of kudoid parasites (Myxozoa: Multivalvulida) from somatic muscles of Pacific bluefin (*Thunnus orientalis*) and yellowfin (*T. albacores*) tuna. *Acta Parasitologica*, 58, 226-230.
- Akaike, H. (1974). A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.
- Bartosova, P., Fiala, I., & Hypsa, V. (2009). Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 81-93.
- Blaylock, R. B., Bullard, S. A., & Whipps, C. M. (2004). *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa: Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. *American Society of Parasitologists*, 90, 584-593.
- Burger, M. A., Deveney, M. R., Philips, P., & Adlard, R. D. (2009). *Kudoa thyrsites* (Myxosporea: Multivalvulida) infecting *Seriola lalandi* from Australia. *The School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, Cooper Rd, St Lucia, Qld 4072, Australia*.
- Burger, M. A., & Adlard, R. D. (2010). Four new species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxosporea: Multivalvulida) from Australia with recommendations for species descriptions in the Kudoidae. *Parasitology*, 137(5), 793-814.
- Burger, M. A., & Adlard, R. D. (2011). Low host specificity in the Kudoidae (Myxosporea: Multivalvulida) including seventeen new host records from *Kudoa thalassomi*. *Folia Parasitologica*, 58(1), 1-16.
- Cruz, C., Vaz, A., & Saratva, A. (2003). Occurrence of *Kudoa* sp. (Myxozoa) in *Trachurus trachurus* L. (Osteichthyes) in Portugal. *Parasite*, 10, 165-167.
- Dykova, I., Buron, I., Fiala, I., & Roumillat, W. A. (2009). *Kudoa inornata* sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida) from the skeletal muscles of *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae). *Folia Parasitologica*, 56(2), 91-98.
- Eiras, J., Zhang, J. Y., & Molnar, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 1(88), 11-36.
- Evans, N. M., Holder, M. T., Barbeitos, M. S., Okamura, B., & Cartwright, P. (2010). The Phylogenetic Position of Myxozoa: Exploring Conflicting Signals in Phylogenomic and Ribosomal Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 27(12), 2733-2746.

- Fiala, I., Sojkova, P., & Whipps, C. M. (2015). Classification and phylogenetics of Myxozoa. B. Okamura, A. Gruhl, & J. L. Bartholomew içinde, *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* s. 85-110. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-14753-6_5
- Gaglio, G., Marino, F., Monaco, S., & Giannetto, S. (2010). Lesioni muscolari da *Kudoa* sp. (Myxosporea: Multivalvulida) in un esemplare di pesce spada (*Xiphias gladius*) pescado nel Mediterraneo. *Large Animal Review*, 16, 291-293.
- Gleeson, R. J., Bennett, M. B., & Adlard, R. D. (2010). First taxonomic description of multivalvulidan myxosporean parasites from elasmobranchs: *Kudoa hemiscylli* n. sp. and *Kudoa carcharhini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulidae). *Parasitology*, 137(13), 1885-1898.
- Golomazou, E., Athanassopoulou, F., Vagianou, S., Sabatakou, O., Tsantilas, H., Rigos, G., & Kokkokiris, L. (2006). Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30, 389-396.
- Griffin, M., Quiniou, S., Ware, C., Bogdanovic, L., & Soto, E. (2014). *Kudoa thunni* from blackfin tuna (*Thunnus atlanticus*) harvested off the island of St. Kitts, West Indies. *Journal of Parasitology*, 100(1), 110-116.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696-704.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie*, 41, 95-98.
- Hartigan, A., Wilkinson, M., Gower, D. J., Streicher, J. H., Holzer, A. H., & Okamura, B. (2016). Myxozoan infections of caecilians demonstrate broad host specificity and indicate a link with human activity. *International Journal for Parasitology*, 46, 375-381.
- Heiniger, H., & Adlard, R. D. (2012). Host specificity and local infection dynamics of *Kudoa leptacanthae* n. sp. (Multivalvulida: Kudoidae) from the pericardial cavity of two *Zoramia* spp. (Perciformes: Apogonidae) at Lizard Island lagoon, Queensland, Australia. *Parasitology International*, 4(61), 697-706.
- Heiniger, H., Cribb, T. H., & Adlard, R. D. (2013). Intra-specific variation of *Kudoa* spp. (Myxosporea: Multivalvulida) from apogonid fishes (Perciformes), including the description of *K. cheilodipteri* n. sp and *K. cookii* n. sp., from Australian waters. f two new species. *Systematic Parasitology*, 84(3), 193-215.
- Hervio, D. M., Kent, M. L., Khattra, J., Sakanari, J., Yokoyama, H., & Devlin, R. H. (1997). Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporea), using a small-subunit ribosomal DNA sequence. *Canadian Journal of Zoology*, 75, 2112-2119.
- Kasai, A., Li, Y. C., Mafie, E., & Sato, H. (2016). Morphological and molecular genetic characterization of two *Kudoa* spp., *K. musculoliquefaciens* and *K. pleurogrammi* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), causing myoliquefaction of commercial marine fish. *Parasitology Research*, 115(5), 1883-1892.

- Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Ohnishi, T. (2012). Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 1046-1052.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., & El-Matbouli, M. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal Eukaryot Microbiology*, 48, 395-413.
- Kim, J. J., Ryu, S., & Lee, H. (2018). Foodborne illness outbreaks in Gyeonggi province, Korea, following seafood consumption potentially caused by *Kudoa septempunctata* between 2015 and 2016. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 9, 66-72.
- Kodadkova, A. (2014). Myxosporean phylogeny and evolution of myxospore morphotypes. Ph.D.Thesis. *University of South Bohemia, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, Ceske Budejovice*.
- Kristmundsson, A., & Freeman, M. A. (2014). Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp. (Myxosporea: Kudoidea) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, 135-146.
- Kvach, Y., Kornyychuk, Y., Mierzejewska, K., Rubtsova, N., Yurakhno, V., Grabowska, J., & Ovcharenko, M. (2014). Parasitization of invasive gobiids in the eastern part of the Central trans-European corridor of Ponto-Caspian hydrobionts. *Parasitology Research*, 113, 1605-1624.
- Li, Y. C., Sato, H., Tanaka, S., Ohnishi, T., Kamata, Y., & Sugita-Konishi, Y. (2013). Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Tunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Parasitology Research*, 112(5), 1991-2003.
- Lom, J., Dykova, I., & Lhotakova, S. (1983). *Kudoa lunata* n.sp. (Myxozoa, Myxosporea) and notes on the nature of muscular 'cysts' of the genus *Kudoa*. *Archiv für Protistenkunde*, 127, 387-397.
- Lom, J., & Dykova, I. (1988). Sporogenesis and spore structure in *Kudoa lunata* (Myxosporea, Multivalvulida). *Parasitology Research*, 74, 521-530.
- Lom, J., & Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, 2(12), 151-156.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Mansour, L., Harrath, A. H., Abd-Elkader, O. H., Alwasel, S., Abdel-Baki, A. A., & Al Omar, S. Y. (2014). Structural and molecular characterization of *Kudoa quraishii* n. sp. from the trunk muscle of the Indian mackerel *Rastrelliger kanagurta* (Perciforme, Scombridae) in Saudi Arabia coasts. *Parasitology Research*, 113(4), 1361-1370.
- Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., & Sugita-Konishi, Y. (2011). *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp. *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp.

- (Myxosporean: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitology Research*, 108(4), 913-926.
- Meglitsch, P. A. (1947). Studies on Myxosporidia from the Beaufort Region: II. Observations on *Kudoa chupeidae* (Hahn), gen. nov. *J. Parasitology*, 33, 271-274.
- Miller, T. L., & Adlard, R. D. (2012). Brain infecting kudoids of Australia's coral reefs, including a description of *Kudoa lemniscati* n. sp. (Muxosporea: Kudoidae) from *Lutjanus lemniscatus* (Perciformes: Lutjanidae) off Ningaloo Reef, Western Australia. *Parasitology International*, 61(2), 333-342.
- Moran, J. W., Whitaker, D. J., & Kent, M. L. (1999). A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture*, 172, 163-196.
- Naidenova, N. N., Shulman, S. S., & Donets, Z. S. (1975). Protozoa, Mastigophora, Sporozoa, Cnidosporidia, Plasmosporidia. *Key to the Parasites of Vertebrates of the Black and Azov Seas*, 7-70.
- Naidenova, N. N., & Gaevskaya, A. V. (1991). *Kudoa mirabilis* sp.n. (Myxosporidea, Multivalvulea) from ribbonfish of the Indian Ocean. *Hidrobiology J.*, 27, 66-68.
- Okamura, B., Gruhl, A., & Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. *Springer International Publishing*. doi:10.1007/978-3-319-14753-6_1
- Oliva, M., Luque, J. L., Teran, L., & Llican, L. (1992). *Kudoa sciaenae* (Myxozoa: Multivalvulidae) cysts distribution in the somatic muscles of *Stellifer minor* (Tschudi, 1844) (Pisces: Sciaenidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87, 33-35.
- Özer, A., Özkan, H., Gürkanlı, C. T., Yurakhno, V., & Çiftçi, Y. (2016). Morphology, histology and phylogeny of *Henneguya sinova* sp. nov. (Myxobolidae: Myxozoa) infecting gills of *Parablennius tentacularis* in the Black Sea, Turkey. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118, 207-215.
- Özer, A., Okkay, S., Gürkanlı, C. T., Çiftçi, Y., & Yurakhno, V. (2018). Two novel myxosporean parasites *Kudoa niluferi* sp. nov. and *Kudoa anatolica* sp. nov. (Cnidaria: Myxosporea) in Black Sea fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128, 3.
- Paari, A., Jeon, C., Choi, H., Jung, S., & Kim, J. (2017). Molecular detection of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in sea water and marine invertebrates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20, 16.
- Paperna, I. (1982). *Kudoa* infection in the glomeruli, mesentery and peritoneum of cultured *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 5, 539-543.
- Pascual, S., Abollo, E., Yurakhno, V., & Gaevskaya, A. (2012). Molecular characterization of *Kudoa nova* (Myxosporea: Multivalvulida) infecting the round goby *Neogobius melanostomus* from the Sea of Azov. *Morsky Ekologichny Journal*, 66-73.

- Perard, M. C. (1928). Sur une maladie du maquereau (*Scomber scomber* L.) due a une Myxosporidie: *Chloromyxum histolyticum* n.sp. *C.R. Academic Scienses*, 186, 108-110.
- Posada, D. (2008). jModel test phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- Rigos, G., Christophologiannis, P., Yiagnisi, M., Andriopoulou, A., Koutsodimou, M., Nengas, I., & Alexis, M. (1999). Myxosporean infections in Greek mariculture. *Aquaculture International*, 7, 361-364.
- Shin, S. P., Shirakashi, S., Hamano, S., Kato, K., Lasso, L. T., & Yokoyama, H. (2016). Phylogenetic study of the genus *Kudoa* (Myxozoa: Multivalvulida) with a description of *Kudoa rayformis* sp. nov. from the trunk muscle of Pacific sierra *Scomberomorus sierra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 98, 337-345.
- Shpirer, E., Diamant, A., Cartwright, P., & Huchon, D. (2018). A genome wide survey reveals multiple nematocyste-specific genes in Myxozoa. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 138.
- Swearer, S. E., & Robertson, D. R. (1999). Life history, pathology, and description of *Kudoa ovivora* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea): an ovarian parasite of caribbean labroid fishes. *The Journal of Parasitology*, 85, 337-353.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4 beta 10. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- Thelohan, P. (1895). Recherches sur les myxosporidies. *Bull. Scie. Fr. Belg.*, 26, 100-394.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniyak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alingment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Researces*, 25, 4876-4882.
- Velasco, M., Videira, M., Silva, J. V., Sanches, O., Matos, P. S., Clemente, S. S., & Matos, E. (2015). Esophagel infection due to *Kudoa* sp. (Myxozoa) in mapara catfish, *Hypophthalmus marginatus*. *Aquaculture Reports*, 2, 22-25.
- Whipps, C. M., & Kent, M. L. (2006). Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 5(53), 364-373.
- Whipps, C. M., Gossel, G., Adlard, R. D., Yokoyama, H., Bryant, M. S., Munday, B. L., & Kent, M. L. (2004). Phylogeny of the Multivalbulidae (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *The Journal of Parasitology*, 90, 618-622.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11(74), 5088-5090.
- Wolf, K., & Markiw, M. E. (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa - new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, 225, 1449-1452.

- Yokoyama, H., Yanagida, T., & Shirakashi, S. (2012). *Kudoa ogawai* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the trunk muscle of Pacific barrelfish *Hyperogype japonica* (Teleostei: Centrolophidae) in Japan. *Parasitology Research*, 110(6), 2247-2254.
- Yurakhno, V. M. (1991). New species of Myxosporidia from fishes of the Black Sea. *Parazitologiya*, 25, 104-109.
- Yurakhno, V. M. (2013). The nature protection aspect of the black sea fish myxosporean studies. *Vestnik Zoologii*, 47(6), 62-70.
- Yurakhno, V. M., Ovcharenko, M. O., Holzer, A. S., Sarabeev, V. L., & Balbuena, J. A. (2007). *Kudoa unicapsula* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) a parasite of the Mediterranean mullets *Liza ramada* and *L. aurata* (Teleostei: Mugilidae). *Parasitology Research*, 101, 1671-1680.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Erkan ÖZDEMİR
Doğum Yeri	Ulubey
Doğum Tarihi	26.03.1986
Uyruğu	T.C.
Telefon	+90 534 693 7068
E-Posta Adresi	ozdemir.erkant@outlook.com.tr
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Su Ürünleri Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	19.10.2011

