

**BATI KARADENİZ'DE BAZI AMFİBİ  
TÜRLERİNDE FUNGAL PATOJENİNİN  
(*Batrachochytrium dendrobatidis*) REAL-TİME  
PCR TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Fahri PAT

DANIŞMAN

Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs, 2015

Bu tez çalışması 113Z139 numaralı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BATI KARADENİZ'DE BAZI AMFİBİ TÜRLERİNDE FUNGAL  
PATOJENİNİN (*Batrachochytrium dendrobatidis*) REAL-TİME PCR  
TEKNIĞİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Fahri PAT**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Mayıs, 2015**

## TEZ ONAY SAYFASI

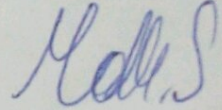
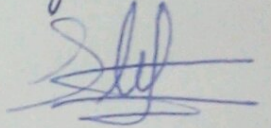
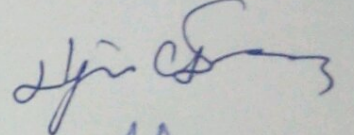
Fahri PAT tarafından hazırlanan "BATI KARADENİZ'DE BAZI AMFİBİ TÜRLEİNDE FUNGAL PATOJENİNİN (*Batrachochytrium dendrobatidis*) REAL-TİME PCR TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

Başkan : Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Semra MALKOÇ  
Anadolu Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama  
ve Araştırma Merkezi



Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....  
Prof. Dr. İbrahim EROL  
Enstitü Müdürü

**BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI**  
**Afyon Kocatepe Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**15/05/2015**

**İmza**  
**Fahri PAT**

**ÖZET**  
Yüksek Lisans Tezi

BATI KARADENİZ’DE BAZI AMFİBİ TÜRLERİNDE FUNGAL PATOJENİNİN  
(*Batrachochytrium dendrobatidis*) REAL-TİME PCR TEKNİĞİ İLE  
ARAŞTIRILMASI

Fahri PAT

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

Bu araştırmada, Türkiye’nin Batı Karadeniz Bölgesinde dünya çapında amfibi ölümlerine yol açtığı bilinen *Batrachochytrium dendrobatidis*’in Real-time PCR tekniği ile ilk kez çalışılmıştır. Ülkemizin önemli ormanlık alanlarının ve doğal sulak alanların bulunuşu ve türlere ait birey sayısı açısından zengin olan bölgemizde, dünyanın pek çok bölgesinde kitlesel amfibi ölümlerine neden olan *Batrachochytrium dendrobatidis* bu çalışma ile bölgemizdeki varlığı tespit edilmiş olacaktır. Yapılan bu çalışmada 2013 ve 2014 yıllarında birer kez arazi çalışması yapılmıştır. Bu arazi çalışmaları sonucunda toplanan 25 örnekten 7 tanesinde pozitif sonuç alınmıştır. Pozitif sonuç alınan türler içerisinde soyu tehlike de olan türler listesinde bulunan *Rana dalmatina* örneklerinde Bd pozitif sonuca rastlanılmıştır.

Ülkemizde sadece Adapazarı ve Trakya’da bulunan *Bombina Bombina* türü de çalışmalar sonucunda bu fungal patojenin tehdidi altında olduğu görülmüştür. Araştırma sonucunda ayrıca ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesinin ekolojik zenginliğinin de bu fungal patojen tarafından tehdit altında olduğu görülmüştür.

Yapılmış olan bu tez çalışması sonucunda bölgemizde amfibi türlerinin korunması için yasal düzenlemeler yapılabilir. Bu fungal patojenin bölgemize hangi yolla geçtiği daha sonraki çalışmalar ile araştırılabilir.

**2015, ix + 45 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycosis, qPCR

**ABSTRACT**  
M.Sc Thesis

INVESTIGATED SOME AMPHIBIAN FUNGAL PATHOGEN (*Batrachochytrium dendrobatidis*) TO THE WESTERN BLACK SEA REGION BY REAL-TIME PCR TECHNIQUE

Fahri PAT

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** Associate Professor Safiye Elif KORCAN

In this study, we have tried Turkey's western Black Sea, known to cause amphibian deaths worldwide. District *Batrachochytrium dendrobatidis* Real-time PCR technology for the first time. Our country's major forest areas and natural wetlands discovery and our region is rich in the number of individuals of the species, the world's lead to massive amphibian death in many parts of the *Batrachochytrium dendrobatidis* presence in our region this work will have been determined. In this study it is made once a land operation in 2013 and 2014. These field studies were positive results in seven of the 25 samples collected as a result. In the list of species that are in danger of soy in the species *Rana dalmatina* has received positive results seen in the example of the positive results Bd.

In our country, not only on the type of *Bombina bombina* in Adapazari and thrace it was also found to be at the bottom of this fungal pathogen threats as a result of studies. As a result of the ecological wealth of our country is also the Western Black Sea Region that has been shown to be threatened by fungal pathogens.

Our region as a result of this thesis can be made legal arrangements for the protection of amphibians. This fungal pathogen with which our region be investigated in further studies now that way.

**2015, ix + 45 pages**

**Key Words:** *Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycosis, qPCR

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN ve Sayın Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarım ve deneysel çalışmalar süresince yardımlarını esirgemeyen Uzman Biyolog Pınar AĞYAR'a ve Ahmet ÇELİKKIRAN'a her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve bu tez çalışmasını 113Z139 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen hayat arkadaşım Hatice Kübra KIZIL'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Fahri PAT

AFYONKARAHİSAR, 2015

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....	3
2.1 Chytridiomycosis .....	3
2.2 Bd'nin yaşam döngüsü.....	4
2.3 Bd'nin Dünyadaki yayılışı .....	5
2.4 Bd'nin Türkiye'deki Yayılışı.....	10
2.5 Bd enfeksiyonunun Tespiti .....	11
2.5.1 Bd Enfeksiyonunun Histolojik tespiti .....	12
2.5.2 Canlı örnekler üzerinden Real-Time PCR ile tespiti .....	13
2.6 Çalışma Bölgesinin Tanımı .....	14
2.6.1 Zonguldak ili .....	15
2.6.2 Sakarya İli .....	16
2.6.3 Bolu ili .....	16
2.6.4 Karabük ili .....	17
2.6.4 Kastamonu ili .....	18
2.7 Çalışılan Türler .....	20
2.7.1 <i>Bombina bombina</i> (Kırmızılı Kurbağa).....	20
2.7.2 <i>Bufo Bufo</i> (Siğilli Kurbağa) .....	20
2.7.3 <i>Pelophylax ridibundus</i> (Ova Kurbağası) .....	21
2.7.4 <i>Rana dalmatina</i> (Çevik Kurbağa).....	21
3. MATERYAL ve METOT .....	23
3.1 Materyal .....	23
3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar .....	23
3.2 Metot .....	24



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (DEVAM)

	<b>Sayfa</b>
3.2.1 Arazi Çalışmaları ve Örneklemeler .....	24
3.2.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> ' in Moleküler Analizler İle Belirlenmesi	25
3.2.2.1 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> için DNA ekstraksiyonu .....	25
3.2.2.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> için Real Time PCR İşlemi .....	25
4. BULGULAR .....	28
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	31
6. KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

dH <sub>2</sub> O	Distile su
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Tris-HCl	Tris Hidroklorik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
TAE	Tris Asetat Edta
NaCl	Sodyum Klorür
TNE	Tris Sodyum EDTA
Ct	Cycle Treshold (Döngü Eşiği)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
°C	Santigrat Derece
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
mL	Mililitre
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
µL	Mikrolitre
M	Molar
mM	Mili Molar
ng	Nanogram
Km	Kilometre
µg	Mikrogram
m	Metre

### Kısaltmalar

---

Bd	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
Rpm	Rotation per minute(Dakikadaki devir sayısı)
MCP	Major Capsid Protein
İE	Immediate early
NPH	Yeni patojen hipotezi
RNA POL II	Ribonükleik asit polimeraz II enzimi
UV	Ultra Viyole ışık
QPCR	Quanttative Polimeraz Zincir Reaksiyonu

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>B.dendrobatidis</i> 'in yaşam döngüsü.....	5
---	---

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1</b> Türkiye’deki Bd çalışmaları.....	10
<b>Çizelge 3.1</b> Bd tespiti için yapılan Rt- PCR’ da kullanılan malzemelerin miktarları ....	26
<b>Çizelge 3.2</b> Bd tespiti için Rt-PCR amplifikasyon protokolü (Primer Desing, İngiltere).....	26
<b>Çizelge 4.1</b> Arazi çalışması gerçekleştirilmiş olan bölgeler ve konumları .....	28
<b>Çizelge 4.2</b> Türlerle ait örnek sayısı.....	29
<b>Çizelge 4.3</b> Çalışılan örneklerde Batrachochytrium dendrobatidis prevalansı ve ortalama genetik ekuivalent .....	29

## RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Resim 2.1</b> <i>B.dendrobatidis</i> küresel dağılım haritası .....	6
<b>Resim 2.2</b> Bd-maps.net verileri kullanılarak regresyon modelinde türetilmiş <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) testip oranı .....	10
<b>Resim 2.3</b> <i>B.dendrobatidis</i> histolojik kesit örneği.....	12
<b>Resim 2.4</b> <i>B.dendrobatidis</i> elektron mikroskopu görüntüsü.....	13
<b>Resim 2.5</b> Real-Time PCR görseli.....	14
<b>Resim 2.6</b> Batı Karadeniz Bölgesi'nin Türkiye Genelinde Konumu .....	14
<b>Resim 2.7</b> <i>Bombina bombina</i> (Kırmızılı Kurbağa).....	20
<b>Resim 2.8</b> <i>Bufo bufo</i> (Siğilli Kurbağa) .....	21
<b>Resim 2.9</b> <i>Pelophylax ridibundus</i> (Ova Kurbağası) .....	21
<b>Resim 2.10</b> <i>Rana dalmatina</i> (Çevik Kurbağa).....	22
<b>Resim 3.1</b> Moleküler çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	23
<b>Resim 3.2</b> Moleküler çalışmada kullanılan kitler .....	24
<b>Resim 3.3</b> Tez çalışması kapsamında yapılan arazi çalışmaları .....	24
<b>Resim 3.4</b> Bioneer firması tarafından oluşturulmuş standart eğri örneği.....	27
<b>Resim 4.1</b> Hastalık belirtileri taşıyan ve ölü Amfibi Örnekleri .....	28

## 1. GİRİŞ

Türkiye üç kıta olan Asya, Avrupa ve Afrika' nın kesişme noktasında bulunmaktadır. Türkiye'nin bu konumu bütün jeolojik devirler boyunca çok hareketli bir sahada bulunmasına yol açmıştır. Ülkemizin bu jeolojik devirlerden Üçüncü Zamanda (Tersiyer'de) Köroğlu Dağları, Ilgaz Dağları, Küre Dağları, Canik Dağları, Köse Dağları, Giresun Dağları, Doğu Karadeniz Dağları, Mescit Dağı, Yalnızçam Dağları, Tecer, Mercan, Allahuekber Dağlarını içerisinde barındıran Kuzey Anadolu Dağlarının oluşmasına yol açmıştır (İnt.Kyn.1). Kuzey Anadolu Dağlarının oluşması ile birlikte ülkemizin Batı Karadeniz Bölgesinin iklimini [Karadeniz iklimi (Okyanusal İklim veya ılıman Deniz İklimi)] oluşturmuştur. Karadeniz iklimi özelliklerinden dolayı Batı Karadeniz de her mevsim yağışlı (yıllık yağış miktarı 1000-1500 mm) yıllık ortalama sıcaklık 13-15 °C dir. Ayrıca doğal bitki örtüsü ormandır. Bitki örtüsü alçak kesimlerde kışın yaprağını döken yayvan yapraklı ormanlardır. Yükselti arttıkça bitki örtüsü değişir ve karma yapraklı ormanlara rastlanır. Daha yukarılarda ise iğne yapraklı ormanlar ve Alpin çayırlar görülür (İnt.Kyn.2). Bu bitki örtüsü sayesinde ülkemiz Batı Karadeniz Bölgesinde biyoçeşitlilik ve canlı sayısı çoktur (İnt.Kyn.3). Ancak biyoçeşitliliğin çok olması biyoçeşitliliği tehdit eden unsurların ortaya çıkmasına da yol açmaktadır.

Biyoçeşitliliği tehdit eden unsurlardan bir tanesi de dünya genelinde amfibi türlerinde kitlesel ölümlere yol açması ve amfibi azalışları nedeni ile Dünya Sağlık Örgütünün Yaban Hayat Organizasyonu (World Organisation for Animal Health) yaban hayat hastalıkları listesinde *B.dendrobatidis*'in (Bd) etken olduğu Chytridiomycosis yer almıştır (Berger *et al.* 1998, Bosch *et al.* 2001, Rachowicz *et al.* 2006, Daszak *et al.* 2000).

Ekolojik dengenin bozulması ile güney yarım kürede dağılış gösteren *B. dendrobatidis* kuzey yarım kürede yayılış göstermiştir. Dünya da pek çok araştırmaya konu olmuş bu patojen fungus ile ilgili ülkemizde yeteri kadar kayıt bulunmamaktadır. Chytridiomycosis, *B. dendrobatidis* tarafından sürekli olarak cildin enfeksiyonuna bağlı bir hastalıktır. Bulaşma su aracılığıyla taşınan zoosporlar ve anura larvalarının ağız parçalarının parazite olmasıyla, amfibilerin post metamorfik safhada enfeksiyonu ile olur. Bazı durumlarda larval kaudatlarda da Chytrid oluşumu bildirilmiştir (Brodman and Brigler 2008, Kriger and Hero 2007, Berger *et al.* 1998, Longcore *et al.* 1999, Marantelli

*et al.* 2004). Chytridiomycosis oluştuğunda, amfibi epidermisi arasındaki elektrolit taşınımı %50 ye kadar engellenir, hücre sitoplazmasındaki sodyum ve potasyumun konsantrasyonu düşer ve asistolik kalp durması ölümlere sebep olur (Voyles *et al.* 2009). Sağlam deri amfibi iç dengesinin korunmasında önemli faktörlerin başında gelmektedir ve deri fonksiyonunu bozan nedenin doğrudan *B. dendrobatidis*' in metabolitlerinin oluşturduğu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Voyles *et al.* 2009). Son 40 yıldır, birçok amfibi türü dünya çapında dramatik bir azalış göstermektedir. Son zamanlarda ki küresel değerlendirmelere göre 1/3 'i ya da dünyadaki 6593 amfibi türünün %32'si büyük tehlike altındadır. 122 amfibi türü 1980 den beri yok olma tehlikesindedir ve popülasyon büyüklükleri %43 oranında azalmıştır. Bu toplu amfibi azalmalarının birçok nedeni olmasına karşın yapılan çalışmalar en önemli nedenin patojenler olduğunu ortaya koymaktadır(İnt.Kyn.6).

Bu çalışmada; *B. dendrobatidis*' in ülkemiz Batı Karadeniz Bölgesinde (Sakarya, Zonguldak, Kastamonu, Karabük) bulunup bulunmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. *B.dendrobatidis* tespiti, güvenilir ve hızlı bir yöntem olması nedeni ile 16SrDNA bulunan ITS1-3 bölgesine özgü primerler kullanılarak, Real-Time PCR ile gerçekleştirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1 Chytridiomycosis

Yaklaşık son 30 yılda *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) sebebi ile 200'ü aşkın kurbağa türünde ya popülasyonda büyük düşüşler görülmüş ya da türler bir yıl içerisinde yok olmuştur (Skerratt *et al.* 2007). Bu hızlı ve beklenmedik düşüş tüm dünyada saptanmıştır (Costa Rica: Crump *et al.* 1992, Panama: Lips 1999, Lips 2003a, Lips 2003b: Brazil: Hayer *et al.* 1988, Weygoldt 1989, Avustralya: Laurence *et al.* 1996 ). Bunun yanı sıra son yıllarda Bd beklenmedik bir şekilde Orta Amerika semenderlerde görülmektedir (Rovito *et al.* 2009). Son yıllarda 350'den fazla amfibi türünün Bd ile enfekte olduğu saptanmıştır (Fisher *et al.* 2009).

Bd amfibi derisindeki keratin içeren tabakaya yüzeysel olarak yerleşerek enfeksiyona neden olur (Berger *et al.* 1998). İribaş'larda keratinli doku sadece ağızda bulunur ve etken burada lokalize olur (Berger *et al.* 1998). Ağıza yerleşen Bd burada bazı defektlere ve pigment kaybına neden olur (Rachowicz and Vredunberg 2004). Metamorfoz esnasında vücuttaki derinin keratinleşmesi ile fungus enfeksiyon yetişkinlerin ve hassas türlerinde derisi üzerine yayılabilir.

Genç ve yetişkin kurbağalarda Bd enfeksiyonları ve tümör özellikle göbek, parmak ve pelvik kısımdaki deri hücreleri içindedir (Berger *et al.* 1998). Enfeksiyon esnasında deri kalınlaşır (hiperkerata) ve soyulur (Berger *et al.* 1998). Ozmatik düzenleme (regülasyon) giderek bozulur kandaki elektrolit düzeyi düşer ve kalbin durmasın'dan kaynaklı ölüm gerçekleşir (Voyles *et al.* 2009). Mortalite oranı, patojenin dozuna, sıcaklığa, yaşa, türe, Bd straine bağlı olarak değişir (Berger *et al.* 1999,2004, Lamirande and Michds 2002, Woodhams *et al.* 2005). Enfeksiyon yoğunluğu önemli bir faktör olarak gözükmektedir. Çünkü kurbağa ve semenderlerde enfeksiyonda yükü yaklaşık 10.000 mantar zoosporuna ulaştığında ölüm olur (Verdenburg *et al.* 2010, Cheng *et al.* 2011).

Berger (2005)' e göre post metamorfik kurbağalarda refleks kaybı iştahsızlık, uyuşukluk, arka ayakta abnormal postür ile oluşan anormal duruş genişliği, Parker (2002)'in çalışmasında belirtildiği gibi deride lekeler ve keratinize dokuda kayıplar, Rachowicz vd.



(2004)'e göre iribaşlarda ağız parçalarında pigmentsiz bölgeler, semenderlerde ventral yüzeyde küçük koyu noktalar ve deri dökülmeleri görülür (Davidson *et al.* 2003, Cummer *et al.* 2005).

Laboratuvar koşullarında birçok kurbağa türünde Bd'nin oldukça yüksek patojenite gösterdiği ve hatta başlangıç seviyelerindeki düşük dozun bile ölüme neden olabildiği bildirilmiştir (Skerrott *et al.* 2007). *Rana catesbeiana* gibi diğer kurbağa türlerinin yetişkin ve iribaş'ları Bd ile enfekte olmakla birlikte, düşük dozlardaki enfeksiyon öldürücü olmayıp bu türler fungusun taşınmasında rol aldığı bildirilmiştir (Skerratt *et al.* 2007). Semenderler ise Bd enfeksiyonlarının rezervuarı olarak hareket edebilirler (örneğin Doğu Kaplan Semenderi, *Ambystoma tigrinum*).

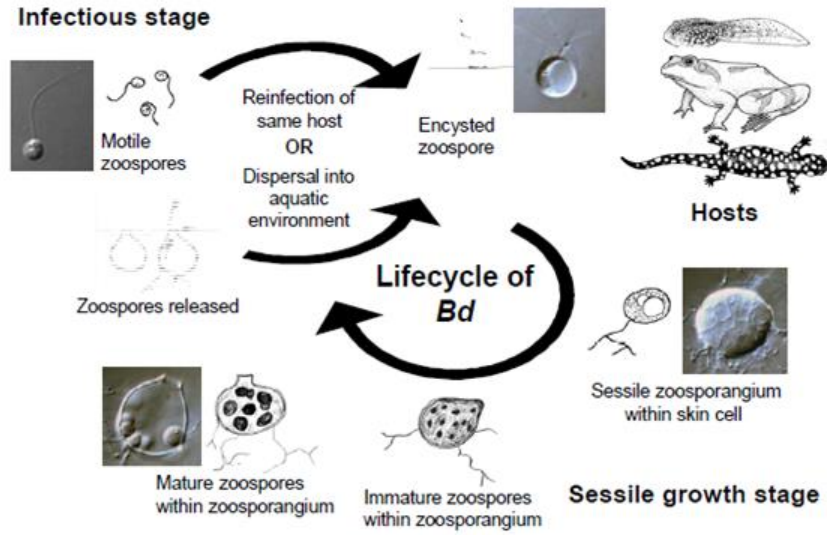
Weinstein (2009) yaptığı çalışmada alandan topladığı enfekte *Batrachoseps attenuatus*'ları örneklerinin kuru mikrohabitatda % 100'ünün öldüğünü saptamıştır. Bu sonuç bazı semender türlerinin diğerlerine göre Bd ye daha hassas olduklarını göstermektedir. Rovito vd. (2009) Orta Amerikadaki semenderlerin azalışının Bd olduğunu bildirdi. Daha sonra Cheng vd. (2011) formalin ile fikse edilmiş müze örneklerinde qPCR çalışmasında Bd enfeksiyonunun Orta Amerika semender türlerinde ve birçok Meksika türünde var olduğunu ortaya koymaktadır. İki neotropikal semender türünün (*Rseudoeuryea leprosa* ve *Bolitoglossa refescen*) Bd'ye karşı oldukça hassas olduğu Cheng vd. (2011) tarafından bildirildi.

## **2.2 B. dendrobatidis'in Yaşam Döngüsü**

*Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycota şubesi, Chytridiomycetes sınıf, Chytridiales takımında yer alır, toprak ve suda bulunur (Hyatt *et al.* 2007). Bd kozmopolit ve geniş dağılıma sahip olan heterotrofik bir fungustur (Sparrow 1960, Karling 1977). Genellikle buldukları ortamda kitin, keratin ve bitki tortuları gibi yüzeyleri kullanırlar. Bazı cinsler fakültatif ya da obligat anaeroblardır ve birçoğu mantarların, alglerin, tohumlu bitkilerin, rotiferlerin, nematodların ya da böceklerin obligat parazitleridir. Burada bildirilen chytrid Chytridiomycota filumunun omurgalı paraziti olarak kabul edilen ilk üyesidir (Barr 1990).

*B. dendrobatidis* iki yaşam döngüsü bulunan sucül bir organizmadır (Berger *et al.* 2005).

Bu yaşam döngülerinden ilkinde zoosporlar su içerisinde posteriorda bulunan flagellum yolu ile hareketlidirler. Reproductive zoosporangium aşamasında ise sesildir. *B. dendrobatidis* zoosporları doğrudan konağın keratinize tabaklarına tutunarak uyum sağlar ve rizoidler ile birlikte zoosporangium halinde olgunlaşır (Resim 2.1). Yaklaşık olarak *B. dendrobatidis* sporlarının yaşam süresi dört gün kadardır ve bu sürede 400'ün üzerinde zoospor üretirler. Bu döngüler zoosporların uygun ortam bulması durumunda tekrarlanır. Zoosporlar aynı konakta çoğalabileceği gibi yeni bir konakta bulabilirler. Bu da *B.dendrobatidis*'in zorunlu parazit olmadığını gösterebilir (Davidson *et al.* 2003, Longcore *et al.* 1999).



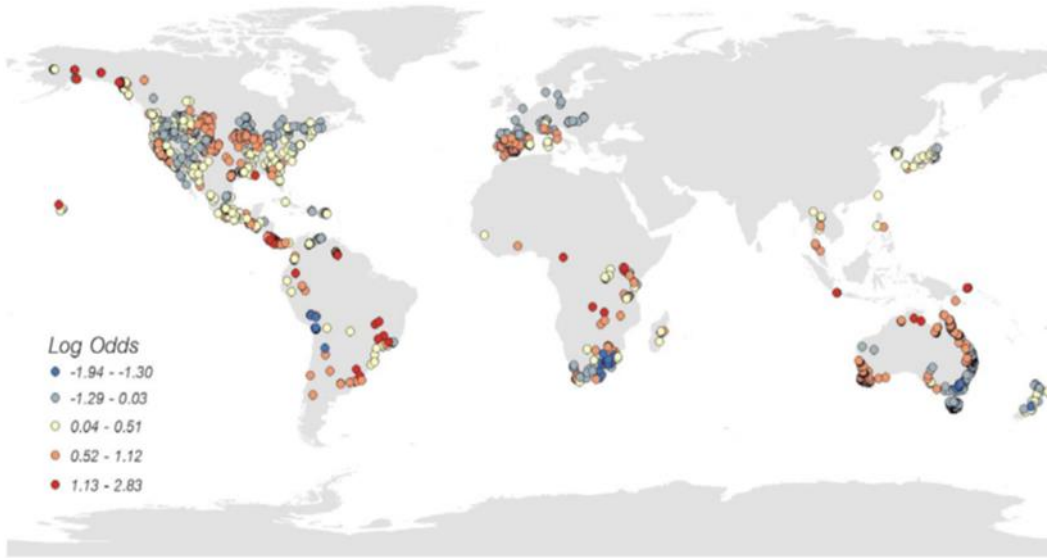
Şekil 2.1 *Bd*'in yaşam döngüsü.

*B.dendrobatidis* çevrede geniş bir bölgede bulunabilir. Chytridiomycosis kaynaklı ölüm, esas olarak belirli bir konum için yılın soğuk zamanlarında ya da serin yüksek bölgelerde görülebilir (Berger *et al.* 1999, Piotrowski *et al.* 2004). Kültür ortamında chytrid 4° C -25° C' de büyür, buna karşın 17° C ile 25° C' de (Piotrowski *et al.* 2004). 28°C'nin üzerinde ve 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda chytrid büyümesi durur veya büyümesi yavaşlar. Bu sıcaklıklarda enfeksiyonlar ölüme yol açmazlar, çünkü fungus büyüme tercih etmez (Piotrowski *et al.* 2004).

### 2.3 *B. dendrobatidis*'in Dünyadaki Yayılışı

*B. dendrobatidis*' in iklim değişikliği ve uluslararası kurbağa ticareti nedeni ile pek çok

bölgeye yayıldığı saptanmıştır. Çalışmacılar Afrika, Güney Amerika, Orta Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Yeni Zelanda'da 287 amfibi türü ve 25 amfibi familyasında Bd tespit etmişlerdir (Bosch *et al.* 2007, Kerry M. Krigger 2009, Lips *et al.* 2008, Laurance 2008, Rohr *et al.* 2008, Skerratt *et al.* 2007) (Resim 2.2, Resim 2.3).



**Resim 2.1** *B.dendrobatidis* küresel dağılım haritası (İnt.Kyn.4)

Avustralya'da kuzey toprakları hariç tüm eyaletlerde 4 zonda Bd bulunmuştur. Bu zonlar; 1-) Doğu kıyılarındaki New South Wales, Queensland yağmur ormanlarında ve Victoria'da ki dağ ve dağ eteklerindeki ormanlarda ( Berger *et al.* 1999)

2-) Güneybatıda Perth'e kadar uzanan bölgede (Berger *et al.* 1999)

3-) Adelaide civarında ( Berger *et al.* 1999)

4-) Tasmania (Oberdorf 2005, 2006 )

Şu ana kadar kuzey topraklarına Bd pozitif rapor edilmemiştir (Van Sluys and Hero 2010). Müze örneği çalışmaları Canondale alanı ve Güney Queenslandda Bd enfeksiyonunu Aralık 1978'de Doğu kıyılarında bulunduğu, Güney batıda Ekim 1985, Adelaide Mayıs 1996, Tasmania'da ise 2004'de bulunduğu bildirilmiştir (Oberdorf 2005). En azından bir kurbağa türünün (*Toudoctylus acutirostris* ) Bd nedeniyle 1993 te yok olduğu bilinmektedir. Ayrıca *Rheobatrachus vitellinus*, *Rheobatrachus silus* ve *Taoudoctylus diurnus* türlerinin Bd enfeksiyonu nedeniyle ortadan kalktığından şüphelenilmektedir (Laurance *et al.* 1996, Berger *et al.* 1998).

Avustralya da amfibilerdeki hızlı düşüşler güney Queensland ve Brisbane yakınlarında 1970'lerin sonlarına doğru başlamış ve 1980'lerin ortalarında ortadoğu Queensland'ın kuzeyine kadar ilerlemiştir. Kıyı Queensland'da patojenin ilerleme oranının yılda 100 km olduğu tahmin edilmektedir (Laurance et al 1996). Tanzania' da bu düşüşler 1970'lerin sonlarında başlamıştır. Düşüşler ilk defa 1970'lerin sonları, 1980'lerin başlarında D'Aguilar, Blackall ve Güneydoğu Queensland'da Brisbane yakın bölgelerde fark edilmiştir (Laurance et al. 1996).

Güne Gün Kurbağası (*Taudoctylus diurnus*) 3-4 yıl içerisinde yok olmuştur. 1975'de Aguilarda daha sonra 1978'lerin sonlarına doğru Blackall'da ve son olarak 1979'un başlarında Canandale'de görülmüştür (Czechura and Ingram 1990). Benzer olarak ağız yolu ile doğum yapan alışılmamış bir kurbağa türü olan *Rheobatrachus silus* 1979'dan sonra Canondale'de ortadan kalkmış ve son olarak 1981'de Blackall'da görülmüştür.

Aynı zaman periyodu içinde *Litoria peorsonia*, *Mixophyes iteratus* ve *M. fleayi* türlerinin Güneydoğu Queensland ve New South Wales'de bulunan popülasyonunda %90'dan fazla düşüş kaydedilmiştir (Ingram and McDonald 1993). 1980'lerin ortalarına geldiğinde doğu Queensland'da, tropik yağmur ormanlarındaki Brisbane'nin 700km batısında Avustralya amfibilerinde azalış görüldüğü tespit edilmiştir.

*Rheobatrochus vitellinus* 1984 yılında keşfedilmiş ve yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Mahony et al. 1984). *Yaudactylus eungelensis*' de 1984 yılı boyunca yaygın olduğu rapor edilmiştir (McDonald 1990). Bu türlerin popülasyondaki ilk düşüşler deniz seviyesinden 400 m üzerinde Ocak 1985'de görülmüştür (Winter and McDonald 1986). Buna rağmen yüksek seviyelerde türlerin hala yaygın olarak görüldüğü saptanmıştır. Mart 1985'de yani sadece 3 ay sonra *Rheobatrachus vitellinus*'un yüksek seviyelerde yaşayan türlerinde hiçbir iz kalmamıştır (McDonald 1990). Mart 1985'ten buyana bu tür ile ilgili hiçbir kayıt bildirilmemiştir. *Taudactylus eungellensis* 1986 Haziranı'ndan beri görülmemiştir (McDonald 1990).

Bd, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri ve aynı zamanda Meksika'da da bulunmuştur. Müze örneklerinde ki histolojik çalışmalar Bd'nin 1961'lerde Kanada ve Amerika'dan

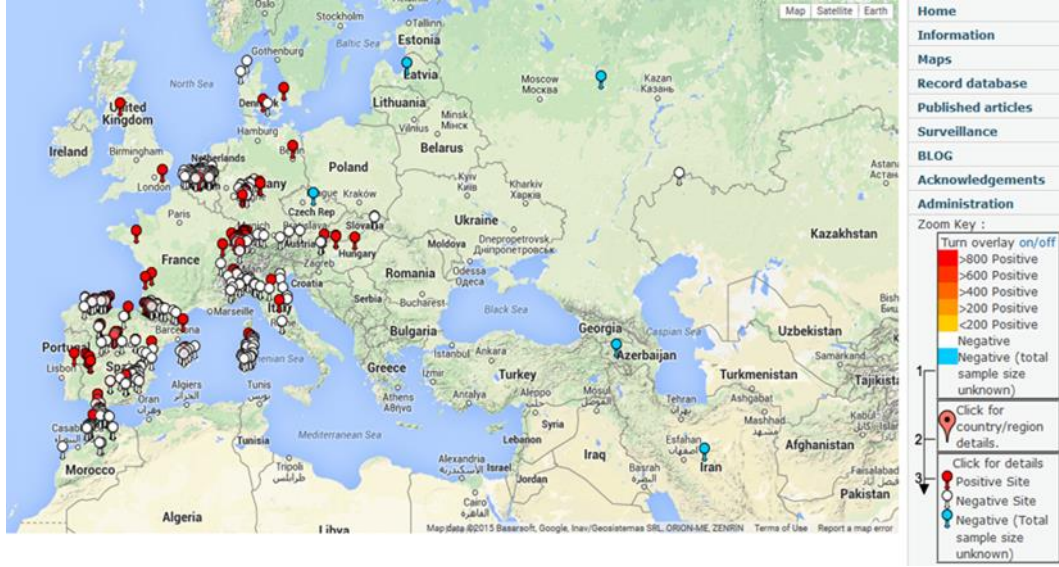
kaynaklandığını açık bir şekilde göstermektedir. *Rana catesbeianan*'nın Bd taşıyıcısı olduğu bilinmektedir. Dünyaya yayılımından bu türün sorumlu olduğu genom çalışmaları sonucunda ortaya çıkarılmıştır (Rosenblum *et al.* 2010, Garner *et al.* 2006, Quelliet *et al.* 2005, Mazzoni *et al.* 2003).

Afrika'da en eski chytrid enfeksiyonu Kamerun bölgesindeki *Xenopus fraseri* örneklerinde 1933 de (Soto-Azat *et al.* 2010) ve Güney Afrika'da *Xenopus laevis* örneklerinde 1938 de saptanmıştır (Weldon *et al.* 2004). Bugüne kadar ise Afrika kıtasında yer alan 13 ülkede Bd enfeksiyonu bildirilmiştir. Bu ülkeler; Botswana, Kamerun, Kongo, Gana, Kenya, Lesotho, Malavi, Nijerya, Güney Afrika, Svaziland, Tanzania, Uganda Demokratik Cumhuriyeti, Zambiya olup dokuzunda (Botswana, Cameroon, Ghana, Kenya, Malawi, South Africa, Swaziland, Tanzania, Uganda, ve Zambia) *Xenopus* türlerinde enfeksiyon tespit edilmiştir. Bugüne kadar, Afrika amfibi türlerinden Kihansi Sprey kurbağasında (*Nectophrynoides asperginis*) chytridiomycosis nedeniyle popülasyonun da düşüş olduğu bildirilmiştir (Weldon and Du Preez 2004, Channing *et al.* 2006). Blackburn vd. (2010) Kamerun dağlarının endemiği *Xenopus longipes* da nedeni bilinmeyen düşüşlerin olduğunu bildirmesine rağmen bu düşüşün nedeninin Bd olduğuna dair hiç bir kanıt bulunamamıştır. Benzer bir durum Madagaskar'da da söz konusu olup endemik amfibi faunasında nedeni tespit edilemeyen düşüşler görülmektedir (Weldon *et al.* 2008, Andreone *et al.* 2008). Niş modelleme analizlerine göre orta ve doğu Madagaskar bölgelerdeki amfibi popülasyonlarındaki düşüşün nedeninin Bd olabileceği düşünülmektedir (Ron 2005). Karayipler'de Bd ilk 1970'lerin ortalarında Porto Riko tespit edilmiştir (Burrows *et al.* 2008). Özellikle 1990'lı yıllarda bu bölgede amfibi popülasyonlarında önemli azalmalar olmuştur (Burrows *et al.* 2004). Dominika'da, 2002 yılında Dağ Tavuk kurbağası olan *Leptodactylus fallax* da chytridiomycosis salgını, *Leptodactylus fallax* nüfusunu büyük ölçüde, yerli Karayip amfibi türlerini ise sadece bir kaç ay içinde harap etmiştir (McIntyre 2003). Küba'da, 2006 Ekim de *Bufo longinasus* da enfeksiyonlar nedeniyle ölümlerin olduğu bulunmuştur (Daz *et al.* 2007). Tobago adasındaki *Mannophryne olmonae*'ların üç ayrı popülasyonunda Chytrid enfeksiyonu tespit edilmiştir (Alemu I. 2008). Yeni Zelanda'daki endemik türleri de içine alan amfibi türlerinde chytridiomycosis olduğu bilinmektedir. Burada Coromandel Yarımadasında ve Kuzey Ada da enfeksiyona bağlı ilk amfibi

popülasyonunda düşüşler *Leiopelma archeyi* (Archeý Kurbağası) de 1995 de görölmüştür (Bell *et al.* 2004). Bunu takiben 1996 da Tapu Ridge'de *Leiopelma archeyi* popülasyonda düşüş olduğu bildirilmiştir (Bell *et al.* 2004). Avustralya türü olan *Litoria raniformis* da ilk Bd 1999 da Christchurch da saptanmıştır (Norman and Waldman 2000, Waldman *et al.* 2001), daha sonra 2000 de *Litoria ewingii* da (Bishop 2000) 2001 de *Leiopelma archeyi* Bd enfeksiyonu bildirilmiştir (Bell *et al.* 2004). Farklı lokalitelerde yaşıyan aynı türlerin Chytridiomycosis'e karşı dirençlerinin farklı olduğu görölmüştür.

1996-2001 yılları arasında karasal kurbağa *Leiopelma archeyi*, Coromandel Yarımadası üzerinde düşüşler yaşarken Bell vd. (2004) yarı-sucul *Leiopelma hochstetteri* popülasyonlarında düşüş olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, Kuzey Adası'nın batı kısmında ki Whareorino ormanlarında bulunan *Leiopelma archeyi* lerde Bd saptanmıştır ancak enfeksiyon nedeniyle popülasyonda azalma görölmemiştir (Bell *et al.* 2004).

Avrupa'da, Guadarrama Pealara Milli Parkındaki yabancı amfibilerde chytridiomycosis'in neden olduğu ölümcül salgınlar ilk 1997 görölmüştür (Bosch *et al.* 2001). Günümüzde ise Bd enfeksiyonları İspanya, Portekiz, İtalya İsviçre Büyük Britanya, Fransa, Almanya, Lüksemburg gibi birçok Avrupa ülkesinde bildirilmiştir. İspanyada Bd kökenli ilk salgın vakaları 1997 de tespit edilmiş olup bunu 1998 ve 1999 da ki vakalar takip etmiştir (Bosch *et al.* 2001). 1999'ların başlarında Pealara Dođa Parkında yaşıyan *Salamandra salamandra* larda chytrid Bd ile bağlantılı kısa sürede ölümler görölmüştür. 1982-1986 yılları arasında ve 1999 da *Bufo calamita* kitlesel ölümler, *Bufo bufo*'da ise enfeksiyon saptanmıştır. *R. perezii*'nin ve *Rana catesbeiana*'nin Peruvian Andes'de Bd taşıyıcısı olabileceği bildirilmiştir (Seimon *et al.* 2006). Fransa'da Pyrenees dağlarındaki Bođa Kurbağalarında Bd görölmüştür (Garner *et al.* 2006). 1970'ler ve 2001 yılları arasında Languedoc yerli kurbağa popülasyonlarında amfibi düşüşleri ile ilgili hiçbir kanıt bulunamamıştır (Crochet *et al.* 2004). Garner vd. (2006) İtalya'da Bd enfeksiyonlu Bođa kurbaları, Stagni vd. (2002) ise Bd enfeksiyonlu *Bombina pachypus* bildirmiştir (Resim 2.3).



**Resim 2.2** Bd-maps.net verileri kullanılarak regresyon modelinde türetilmiş *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) testip oranı(İnt.Kyn.5).

## 2.4 *B. dendrobatidis*'in Türkiye'deki Yayılışı

Ülkemizde Bd ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Göçmen vd. (2013) Gönyük Kanyonunda bulunana iki *Pelophylax bedriagae* örneğinin birinde Bd saptamış ve enfeksiyon oranınının 3.5 GE olduğunu bildirmiştir. Erişmiş vd (2014) nın Göller Bölgesinde yaptıkları çalışmada *Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Bufoetes variabilis* ve endemik Beyşehir Kurbağası *Pelophylax caralitanus* da Bd olduğunu bildirmişlerdir (Çizelge 2.1)

**Çizelge 2.1** Türkiye'deki Bd çalışmaları

Tür	Lokalite	n	Prev	GE	Kaynak
<i>Lyciasalamandra. atifi</i>	Fersin	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra.</i>	Hurma Kasabası	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra billae</i>	Kale Hill	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra irfani</i>	Göynük kanyonu	14	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra</i>	Tahtalı Dğı	9	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra</i>	Gedelme	10	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra arikani</i>	Dağdibi	10	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra. l.</i>	Boldağ	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra l.</i>	Saklikent	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra. l.</i>	Cevreli	31	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra. l.</i>	Karadere	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra. fazilae</i>	Gökbel	30	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Lyciasalamandra.</i>	Marmaris	30	-	-	Göçmen vd. 2013

**Çizelge 2.1** (Devam) Türkiye’deki Bd çalışmaları

<i>Pelophylax bedriagae</i>	Göynük Kanyonu	2	0,50	3,5	Göçmen vd. 2013
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Golcük Gölü	9	11,1	20,4	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Işıklı Gölü	39	20,5	350,5	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Egirdir Gölü	57	14,0	365,4	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax caralitanus</i>	Beyşehir Gölü	20	32,1	264	Erişmiş vd. 2014
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Cevreli	1	-	-	Göçmen vd. 2013
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Akoren Gölü	13	23,1	30,6	Erişmiş vd. 2014
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Golcük Gölü	7	14,2	10,8	Erişmiş vd. 2014
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Tınaztepe Göleti	7	14,2	30,3	Erişmiş vd. 2014
<i>Pseudepidalea variabilis</i>	Erkmen Göleti	9	22,2	30,2	Erişmiş vd. 2014
<i>Hyla orientalis</i>	Akoren Gölü	6	16,7	20,8	Erişmiş vd. 2014
<i>Hyla orientalis</i>	Golcük Gölü	3	-	-	Erişmiş vd. 2014
<i>Hyla orientalis</i>	Erkmen Göleti	1	-	-	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelobates syriacus</i>	Akoren Gölü	1	-	-	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Akoren Gölü	14	42,9	50,7	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Tınaztepe Göleti	11	18,2	40,8	Erişmiş vd. 2014
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Erkmen Göleti	15	13,3	40,8	Erişmiş vd. 2014
<i>Rana macrocnemis</i>	Tınaztepe Göleti	3	-	-	Erişmiş vd. 2014
<i>Triturus karelinii</i>	Golcük Gölü	6	-	-	Erişmiş vd. 2014

## 2.5 B. dendrobatidis Enfeksiyonunun Tespiti

Ölü ya da ölmekte olan kurbağalar Bd den olduğu kadar diğer patojenler tarafından da enfekte edilmiş olabilir. Post-metamorfik kurbağalar çeşitli klinik belirtiler gösterir. Bu belirtiler iştahsızlık, uyuşukluk, arka ayakları genişletilmiş anormal duruş ve refleks düzeltilmesi eksikliğidir (Berger *et al.* 2005). İribaşlarında ise ağız çevresinde pigment kaybı olarak göze çarpar (Rachowicz and Vredenburg 2004). Semenderlerde chytrid enfeksiyonu ventral yüzey üzerinde küçük koyu lekeler görülür ve ciltte döküntülere neden olabilir (Davidson *et al.* 2003, Cummer *et al.* 2005, Bovero *et al.* 2008, Weinstein 2009).

Bd enfeksiyonu genellikle iki şekilde doğrulanır; birincisi, deriden alınan kesit ile histolojik olarak, ikinci olarak swaplama işlemi ile alınan DNA örneklerinin real-time PCR yöntemi ile tespiti (qPCR) (Boyle *et al.* 2004).

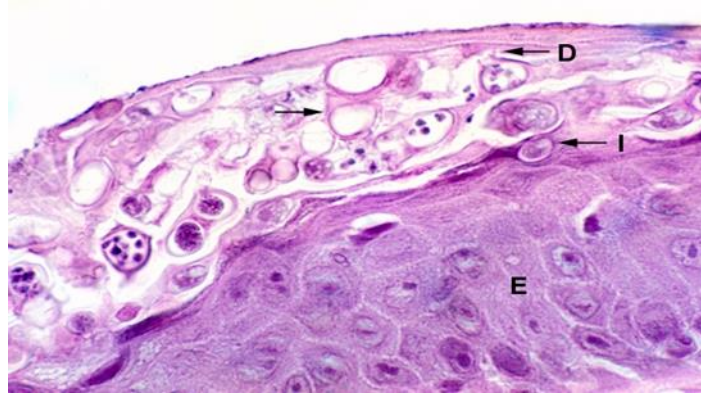
Çok yakın zamana kadar sadece canlıdan alınan örneklerde Bd tesbiti qPCR yapılabiliyor



iken müze örnekleride Bd tesbiti için histolojik metotlar kullanılıyordu. Ancak Soto-Azat vd. (2009) etanol ile fikse edilmiş amfibi örneklerinde qPCR kullanarak Bd enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Fakat formalin ile fikse edilmiş örnekler kullanıldığında, müze örneklerinde qPCR yöntemi ile Bd tesbiti yapılamamıştır. Bunu takiden Walker vd. (2008) formalin ile fikse edilmiş örneklerde qPCR yöntemi ile Bd DNA tespiti yapabilmışlerdir.

### 2.5.1 *B. dendrobatidis* Enfeksiyonunun Histolojik Tespiti

Ağır chytrid enfeksiyonu gösteren bir Beyaz Ağaç Kurbağası (*Litoria caerulea*) derisinin bir kısmından alınan histolojik kesit ile hazırlanmış elektron mikroskopu kesiti ile tespit edilir. *B. dendrobatidis* ile enfekte olmuş bir kurbağa derinin bir bölümü bir fotomikrografıdır (Resim 2.3). Mantar sporangialar stratum korneum tabakasında bulunan yuvarlak yapılardır. Doğal epitel hücreleri sayısında artan *B. dendrobatidis* varlığına yanıt nedeni ile normalde bir kurbağanın stratum korneum yaklaşık 2-3 hücre kalınlığında bir tabaka olmasına rağmen enfeksiyon ile stratum corneum çok katmanlı ve düzensiz hale gelir (Berger *et al.* 2005).

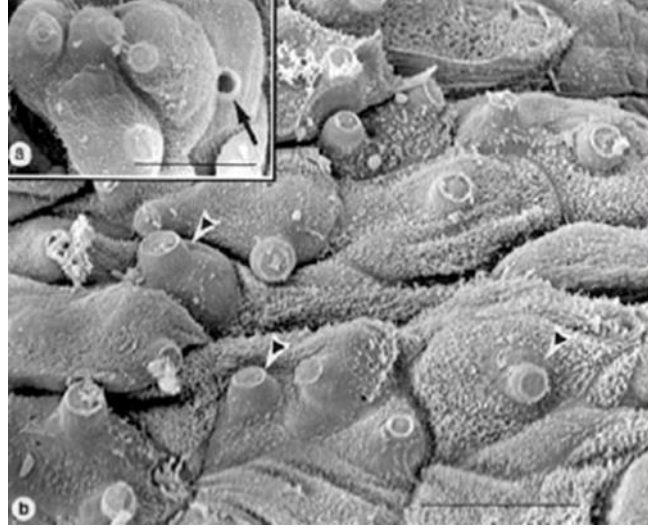


**Resim 2.3** *B.dendrobatidis* histolojik kesit örneği

I: Olgunlaşmamış zoosporangium. D: Zoosporları içeren olgun zoosporangium.  
Ok: Boş zoosporangium. E: epidermis (Berger *et al.* 1999).

Ağır chytrid enfeksiyonu gösteren, *Litoria lesueuri* gelen ayak deri yüzeyinin taramalı elektron mikroskopu Enfekte bir kurbağa epitelinde deşarj gösteren *B. dendrobatidis* ile yüzeyde çıkan papillaların varlığı gözlenmiştir. Sağlıklı bir amfibi türünde epitel yüzeyi nispeten düzgün ve iyi organize olmuş halde bulurken Bd ile enfekte olmuş hayvanın

epitel hücreleri pürüzlü hale gelir (*Berger et al. 2005*).



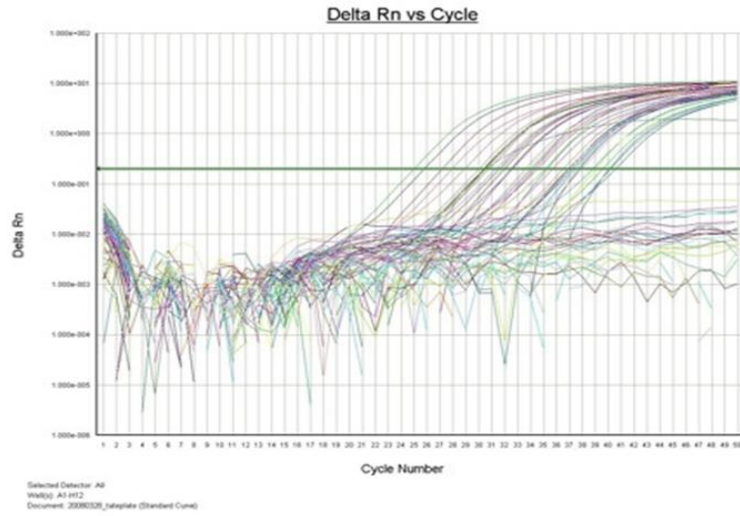
**Resim 2.4** *B.dendrobatidis* elektron mikroskopi görüntüsü

Yüzeyde bulunan her bir epitel hücrenin erişkin olmuş zoosporların salınımı (*Berger et al.2005*).

### 2.5.2 Canlı Örnekler Üzerinden Real-Time PCR ile Bd'nin Tespiti

Örnek yetişkin hayvan ya da juvenil amfibi swaplama işlemi yoluyla toplanır. Larva safhasındaki hayvanlardan ağız kenarından swap alınmalıdır (*Retallick et al. 2006*). Swaplama işlemi eldiven takılarak hayvanın alt kısmından, karından, alt uyluk ve alt ayak kısmından yaklaşık 30 sefer olmak üzere alınır. Alınan swap örnekleri daha sonra DNA elde edilebilmesi için steril mühürlü kapaklı tüp içerisine yerleştirilerek real-time PCR işlemine geçilir.

Swaplardan DNA elde edildikten sonra real-time PCR olarak bilinen teknik kullanılarak deri swaplarından elde edilen Bd zoosporlarının varlığı ve miktarı tespit edilebilir. Real-time PCR örnekleri içerisindeki Bd DNA miktarını evrensel Bd standart kullanarak tespit edilmelidir. Cihazın çalışması sırasında örneklerin durumu görüntülenebilir. Sonuçları görüntüleme sırasında yatay yeşil çizgiler ait olduğu örneğin Bd pozitif olduğunu gösterir (*Resim 2.5*).



**Resim 2.5** Real-time PCR:( SFTU laboratuvarında Vredenburg)

## 2.6 Çalışma Bölgesinin Tanımı

Batı Karadeniz Bölgesi ülkemizin kuzeybatısında bulunur. Kızılırmak Deltası'nın batısından başlayıp Adapazarı ve Bilecik'in doğusuna kadar olan bölgedir (Resim 2.7). Bolu, Düzce, Zonguldak, Bartın, Amasra, Karabük, Kastamonu ve Sinop bölgede bulunan illerdir. Batı Karadeniz Bölgesi'nin nüfusu daha çok kıyı kesimlere çekilmiştir, ancak iç kısımlarda nüfus genellikle akarsu boylarında yoğunlaşmaktadır.



**Resim 2.6** Batı Karadeniz Bölgesi'nin Türkiye genelindeki konumu.

Batı Karadeniz genel olarak dağlıktır. Bölgenin yeryüzü şekillerini, III. Jeolojik devirde Alp kıvrımları sonucunda oluşan Kuzey Anadolu Dağları oluşturur. Dağlar kıyıya paralel uzandığı için kıyı şeridinde kıyı özellikleri görülür, doğal limanlar azdır ve falezler oldukça fazladır. Ayrıca deniz etkisi iç kısımlara kadar ulaşmadığı için buralarda karasal iklim görülür. Kıyıda ise ılıman bir iklim olan Karadeniz iklimi görülür. Karadeniz'den gelen nemli hava kıyıya paralel uzanan dağların yamaçlarına bol yağış bırakır. Türkiye'nin en yağışlı bölgesi olan Karadeniz Bölgesi'nde bütün bir yıl boyunca yağış olabilir. Dolayısıyla bu bölgede kuraklık diğer bölgelere göre daha az görülür.

Maksimum yağış sonbaharda, minimum yağış ilkbaharda düşer. Yıllık yağış miktarı 1000-1500 mm'dir. Yıllık ortalama sıcaklık 13-15 °C'dir. Ocak ayı ortalama 8 sıcaklığı 6-7 °C iken Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 21-23 °C'dir. Batı Karadeniz'in doğal bitki örtüsü ormanlardır ve dağların yüksek kesimlerinde çayırlara rastlanılır (Öz 2007).

### **2.6.1 Zonguldak İli**

Zonguldak Batı Karadeniz Bölgesi'nde Karadeniz kıyısında, İstanbul'un yaklaşık 360 km. doğusunda, Ankara'nın 270 km. kuzeyinde, dağlık, engebeli, yeşili çok renkli ve bol olan, Türkiye'nin tek koklaşabilir taşkömürünün üretildiği bir ildir

Zonguldak doğuda Bartın ve Kastamonu, güneyde Düzce ve Karabük, batı ve kuzeyden Karadeniz ile çevrilidir. 41q ile 41q 271 kuzey enlemleri, 31q 481 ve 32q 131 doğu boylamları arasında Türkiye'nin topraklarının % 1,1'ini kaplar.

İlin Batı Karadeniz Bölgesinde bulunması nedeniyle dağlar kıyıya paralel şekilde bulunmaktadır. Dağların ilin güneyinde bulunması iç Anadolu ile bağlantıyı güçleştirmektedir. İlde büyük ova ve yayla yoktur ancak yağışın her mevsimde olması ve arazinin fazla eğimi nedeniyle sellere elverişli bulunan alanlarda küçük ovalar oluşmuştur. Dağlık bir yörede yer alan ilin topraklarının sadece % 29,17'si % 20'den az eğimli olup kentsel yerleşime ve tarıma uygundur. Zonguldak ilinin % 56'sı dağlarla, % 31'i platolarla, % 13'ü ovalarla kaplıdır. Dağlar Karadeniz'e paralel üç sıra halinde uzanır (Öz 2007).

### **2.6.2 Sakarya İli**

Sakarya İli, ülkemizin kuzey batısında, Marmara Bölgesinin kuzeydoğu ucunda yer almaktadır. Doğudan Bolu, batıdan Kocaeli ve Bursa, güneyden Bilecik ve kuzeyden de Karadeniz ile çevrelenmiştir. İlimiz, doğudan Bolu'nun; Göynük, Mudurnu, Düzce ve Akçakoca, güneyinden Bilecik'in; Gölpazarı ve Osmaneli, batıdan Kocaeli'nin; Kandıra ve Gölcük İlçeleri, kuzeyden ise Karadeniz ile çevrilidir.

Sakarya ilinin yüzey şekilleri sade bir özellik gösterir. Bunları üç bölümde incelemek mümkündür. Kuzeyde tepelik alan, Ortada Adapazarı ovası veya Akova denilen düzlük, Güneyde engebeli topraklar bulunur. İl alanı, güneyden kuzeye doğru uzanarak Kocaeli penneleğini yani, yarı ovalarının doğusunda Karadeniz'e açılır. Üçüncü zamanın sonları ile dördüncü zamanın başlarında oluşmuştur (Öz 2007).

### **2.6.3 Bolu İli**

Türkiye yüz ölçümünün % 1,05'lik bölümünü kaplayan Bolu ili, 8 294 km<sup>2</sup> yüzölçümü ile Karadeniz Bölgesi'nin Batı Karadeniz bölümünde yer alır. Bolu'nun, batısında Düzce ve Sakarya, güneybatısında Bilecik ve Eskişehir, güneyinde Ankara, doğusunda Çankırı, kuzeyinde Zonguldak ve kuzey doğusunda Karabük yer alır.

Dağlar doğu-batı doğrultusunda uzanır ve bunların arasında ovalar, vadiler ve akarsu yatakları bulunmaktadır. Kuzeyde Kaplıdede ve Orhan Dağları, iç kısımlarda ise yükseklikleri 2 000 metreye yakın Göl, Sünnice, Bolu, Elmacık ve 11 Keremali Dağları yer almaktadır. İlin güneyinde ise Köroğlu, Beylik ve Seben Dağları en yüksek sırayı oluşturur. Bolu İlinin en yüksek noktası 2 499 m olan Köroğlu Tepesi olmakla birlikte kuzeyden güneye doğru yükselen bu dağ sırası geniş ormanlık alanları meydana getirir. Dağlar ile birbirinden ayrılan Bolu, Gerede ve Mudurnu Ovaları bulunmaktadır. Düzce Ovasının doğusundaki Bolu Ovası dağ sırasının ardında bulunduğu için iklimi sert ve toprak verimi düşüktür. Yükseltisi fazla olan Gerede Ovası etrafındaki dağların etkisiyle ani yağışlar almasına rağmen verimsiz topraklara sahiptir. Bolu'da debisi düşük çok sayıda akarsu bulunmaktadır. Yağışların düzensiz olması akarsuların debilerinin düşük olmasına neden olmaktadır. Büyüksu, Mudurnu Çayı, Gerede Çayı, Göynük Çayı, Aladağ

Çayı ve Çatak Çayı başlıca akarsulardır. Bolu ilinde ormanlık alanlarda çok sayıda göl bulunmaktadır. Bunlar; Abant Gölü, Yeniçağa Gölü, Çubuk Gölü, Sünnet Gölü, Karagöl, Karamurat Gölü ve Yedigöller (Büyükgöl, Seringöl, Deringöl, Nazlıgöl, Küçükgöl, İncegöl, Sazlıgöl) dir (Özmen 2000).

Bolu ve civarında Paleozoik, Mesozoik ve Tersiyer kaya türleri görülmektedir. Paleozoik yasta olanlardan metamorfikler kuzeyde bulunur ve yaylaların yüksekleri ve tepeleri bunlardan oluşur. Arkoz, kuvarsit gibileri ise yine kuzeyde dağınık yüzeylenmeler halinde görülmektedir. Mermer küçük yüzeylenmeler halinde kuzeydoğuda, diğer yerlerde geniş alanlar kaplar. Bunların yanında kireçtaşı Devoniyen'e ait kayrak ve fillitler üzerinde bulunur (Özmen 2000).

#### **2.6.4 Karabük İli**

Karabük, kuzeyde Bartın, doğuda Kastamonu, güneyde Çankırı ve Bolu, batıda ise Zonguldak ile komsudur. İl, Araç ve Soğanlı Çayları'nın birleştiği noktada kurulmuştur. Karabük'ün yüzölçümü 4 145 km<sup>2</sup>'dir. İlin en önemli akarsuları Yenice, Araç, Soğanlı ve Eskipazar Çayları'dır.

Karabük, Araç ve Soğanlı Çayları'nın birleşerek oluşturduğu Yenice Çayı'nın oluşturduğu vadiler ve bunlar arasında kalan platolardan meydana gelir. Karabük ilinin etrafı dağ ve tepelerle çevrili bir havza özelliğindedir. Karabük'te genelde dağlık olan 12 dalgalı bir arazi yapısı görülür ve büyük ova ve düzlüklere nadiren rastlanır. Karabük ve Safranbolu'nun kuzeyindeki dağlık alanın tektonizmaya uğramasıyla burada bir fay hattı meydana gelmiştir. Yapı bakımından geçirimsiz, yumuşak ve dirençsiz kayalar heyelanlara uygundur. Eğimin fazla olduğu alanlarda yağmurlardan sonra sık sık heyelanlar görülür. Bu bölgedeki dağlar Kuzey Anadolu Dağları'nın bir kısmını oluşturur. Bu dağların yüksekliği 200 metreyi geçmez ancak ilin kuzeyinde batıya doğru uzanan dağlık alanda ortalama 1 400 metre yükseklikte dağlar bulunur. Batı Karadeniz Bölgesi'nin en yüksek noktası olan Keltepe 1 999 metredir. Eskipazar'da yer alan dağlar ise Bolu ve Köroğlu Dağları'nın uzantılarıdır.

Karabük oldukça engebeli ve eğimli bir yapıya sahip olduğundan burada düzlüklere ve ovalara fazla rastlanmaz. Daha çok Soğanlı Çayı ve Araç Çayı'nın kenarlarında küçük düzlükler yer almaktadır (Öz 2007).

Karabük-Safranbolu Tersiyer havzası tümüyle Eosen yaşlı tortul kayalarla dolu huni biçiminde bir alandır. Bu havza tektonik niteliklidir. Bölgede Paleozoik yaşlı formasyonlar sınırlı alanlarda yüzeylenmiştir. En üstte yatay ve yataya yakın katmanlı birimler Senozoik yaşlı formasyonlardan oluşmuştur. Akarsu vadilerinde Kuvaterner yaşlı alüvyon çökelleri en genç birimleri oluşturur. Kuzey Anadolu Dağları'nın bir parçası olan Karabük'teki dağlar, ana çatısı Alp Orojenezisi olan kıvrımlı dağlardır. Üçüncü jeolojik zamanda oluşan kireçtaşı araziler geniş alanları kaplar. Kireçtaşları arasında kumlu ve killi tabakalar bulunmaktadır. Kuvaterner (IV.jeolojik) zamanda Ovacık çevresinde kalker tabaka alanı oluşmuştur. Vadiler ise Kuvaterner'de akarsu gelişmesiyle meydana gelmiştir. Safranbolu ve Eflani yöresinde zengin mermer yatakları oluşmuştur. Bunun yanında Eflani'de çakmaktaşı ve kömür yatakları da bulunmaktadır. Ovacık'ta alçı taşı, gnays ve 13 bazaltlar da görülmektedir. Ayrıca Yenice'de dolomit ve kuvarsit, Eflani'de kuvarsit yataklarına rastlanmaktadır. Karabük'te farklı dönemlere ait jeolojik oluşumlar görülmektedir. Farklı yerlerde, farklı litolojik özelliklerle oluşan bu birimler farklı zamanlardaki tektonik olaylarla kıvrılmış, kırılmış, yer yer çöküntü yer yer yükselmeler meydana getirmişlerdir (Öz 2007).

#### **2.6.4 Kastamonu İli**

Batı Karadeniz bölgesinde bulunan Kastamonu, doğuda Sinop, güneyde Çankırı ve Çorum, kuzeybatıda Bartın ve batıda Karabük ile komşudur. Kastamonu 13 108 km<sup>2</sup>'lik alan kaplayarak Türkiye'nin %1,7'sini oluşturur. İl genel olarak dağlık yapıdadır. Kuzeyde Küre Dağları, güneyde Ilgaz Dağları uzanır. Karadeniz'e kıyı uzunluğu 170 km'dir. İlin büyük kısmı dağlık olduğu için tarıma elverişli düzlük alanlar kısıtlıdır. Vadiler etrafında küçük ovalar bulunur. İlin ormanlık alanları da fazladır. Araç, Devrekani ve Gökırmak Çayları önemli akarsulardır. Bunların kolları olan diğer kaynaklar ise Devrez Çayı, Valay Çayı, Daday Çayı, Karaçomak Çayı, Karasu, Kumluca, Karadere, Basören ve Dona Dereleri'dir.

Batı Karadeniz ve Kızılırmak havzaları arasında kalan Kastamonu, Küre ve Ilgaz Dağları arasında engebeli bir alandır. İlin  $\frac{3}{4}$ 'ü dağlık alan iken ovalar %4'ünü, platolar ise %22'sini kaplamaktadır. Platolar genellikle Küre ve Ilgaz Dağları arasındadır ve bu platolar da havza özelliğindeki çöküntü alanlar ile parçalanmıştır. 1 000-1 500 m arasındaki platolardan özellikle kristalen serileri üzerinde gelişenlerde koyu renkli toprak ve zengin orman alanları bulunmaktadır. Ormanlık alanlar dışında boz renkli topraklar bitki örtüsü bakımından fakirdir. Ancak Devrekani ve Taşköprü havzalarında bitki örtüsü farklılıklar göstermektedir. Daday havzasının kuzeyindeki platolar 1 300-1 400 m yüksekliktedir ve sık sık orman örtüsü ile kaplı bu platolar aynı zamanda bir asınım yüzeyi oluştururlar. 1 500 m yükseklikleri bulan platolar Araç'a yaklaştıkça alçalırlar (Öz 2007).

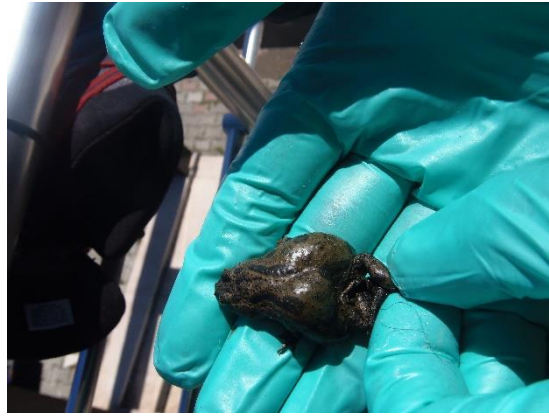
Kastamonu oluşumları II. ve III. jeolojik zaman oluşumlarıdır. Bu bölgede eosen ve mezozoik başkalaşım serileri görülmektedir ve kalkerli oluşumlar azdır. Burada görülen eosen oluşumları filis ve volkanik maddelerdir. Eosen kalkerlerine Araç ilçesinde ve Ilgaz Dağları'nın yüksek kesimlerinde rastlanır. Bu kalkerler genellikle gre, kumlu sistler ve ince grimsi kalker bantlarından meydana gelir ve çok sayıda foraminler içerir. Killi ve kumlu olan bu seriler bol fosil içerir. Kastamonu'nun güneyinde andezit, lav-tüf ve aglomeralar halinde beraberce deforme olmuştur ve tabakaların üst seviyeleri göre, alt seviyeleri marn karakteri göstermektedir. Kastamonu-Daday çöküntü havzasının üst kısımlarında greli kalker ya da kalkerli sarı greler yayılır. Havzanın bu kesiminde lav akıntılarının izi olan volkanik maddeye rastlanır. Kastamonu bölgesinde etkisi görülen tektonik hareketlere göre kuzey yönüne doğru tektonik hatlar takip edilebilir özelliktedir. Daday yöresi Neojen yastadır. Bu yöredeki karasal Neojen tortulları, Kretase-Eosen oluşumlarını metamorfik serilerle örter. Bunun altında kırmızı kumlu ve çakıllı bir katman, üstünde killi marnlı, jipsli ve tuzlu yumuşak katmanlar ve en üstte de beyaz göl kalkerleri yer alır. Devrekani Ovası'nda tarıma elverişli, Holosen yasta, kumlu ve killi alüvyonlar bulunmaktadır. İldeki bazit plutonlar içinde diorit, diabaz ve gabro 15 kütleleri bulunur ki bunlar Küre'deki bakır ve pirit madenini ortaya çıkarmıştır (Öz 2007).



## 2.7 Çalışılan Türler

### 2.7.1 *Bombina bombina* (Kırmızılı Kurbağa)

Kırmızılı kurbağa'nın başının ön kısmı yuvarlak olup boyu 5 cm kadardır. Göz bebekleri yuvarlağımsı veya kalp şeklinde dışa ve yukarıya dönüktür. Türün sırt kısmı yuvarlak veya oval deliksi siğillerle kaplıdır. Erkek bireylerinde bir çift ses kesesi bulunur. Sırt tarafı siyahsı gri veya gri kahverengidir. Bu sırt zemini üzerinde siyah veya çok nadir olsa da yeşil lekeler bulunur. Karın kısmı kırmızı ve küçük beyaz noktalar altında siyah zemin bulunur. Türün ülkemizdeki yayılış alanı Trakya ile Kuzeybatı Anadolu'da Adapazarı civarındır (Baran vd. 2012).



**Resim 2.7** *Bombina bombina* (Kırmızılı Kurbağa) (2014'de Sakarya ilinde yaptığımız arazi çalışmasında Doç.Dr.Uğur Cengiz Erişmiş tarafından fotoğraflandırılmıştır)

### 2.7.2 *Bufo Bufo* (Siğilli Kurbağa)

Gözleri arkasında bulunan çok büyük zehir bezleri ile karakterize olan tür 15 cm kadar boya sahiptir. Göz bebekleri yatay, göz irisi bakır veya altın rengindedir. Derisi fazlaca kabarcıklı, sırtında sık ve bariz siğiller bulunur. Erkek bireylerde ses kesesi bulunmaz. Sırt kısmı kahverengi, kırmızımsı veya grimsi renkte olabilir. Bu tür az bitkili veya ormanlık alanlarda bulunur. Ülkemizde Orta, Batı, Kuzey Anadolu ile Trakya bölgesinde yayılış gösterirler (Baran vd. 2012).



**Resim 2.8** Bufo bufo (Siğilli Kurbağa) (Karabük ilinde 2014 yılında yapılmış olan arazi çalışmasında Doç.Dr.Uğur Cengiz Erişmiş tarafından fotoğraflandırılmıştır)

### **2.7.3 Pelophylax ridibundus (Ova Kurbağası)**

Türün kulak zarı bariz baş yanlarında koyu renkli şeritleri olmaması ve 15 cm ye ulaşan boyları ile tanınır. Sırt yanlarında boyuna uzanan deri kıvrımları bulunur. Erkeklerinde dış ses kesesi bulunur ve derisi pürüklüdür. Sırt kısmı yeşilimsi gri, açık veya koyu kahverengidir. Karın bölgesi genellikle kirli beyaz veya sarımsıdır. Tür bol bitkili havuz, göl ve yavaş akan sularda bulunur. Ülkemizde Karadeniz, İç Anadolu'nun Doğu ve Kuzey bölümleri, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış gösterir (Baran vd. 2012).



**Resim 2.9** Pelophylax ridibundus (Ova Kurbağası) (2014'de Sakarya ilinde yaptığımız arazi çalışmasında Doç.Dr.Uğur Cengiz Erişmiş tarafından fotoğraflandırılmıştır)

### **2.7.4 Rana dalmatina (Çevik Kurbağa)**

Kulak zarı büyük ve baş yanlarında bulunan koyu bant barizdir. Göz bebekleri yatay olup vücut boyu en fazla 9 cm kadardır. Derisi düz ve ince, erkek bireylerde ses kesesi yoktur.

Arka bacakları uzak mesafelere sıçramasını sağlamak için çok uzundur. Sırt tarafı sarımsı pembe ile gri kahverengidir. Ülkemizde Kuzey Anadolu ve Trakya da yayılış gösterir (Baran vd. 2012).



**Resim 2.10** Rana dalmatina (Çevik kurbağa) (Yenigöller yöresinde 2014 yılında yapılmış olan arazi çalışmasında Doç.Dr.Uğur Cengiz Erişmiş tarafından fotoğraflandırılmıştır)

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Real-Time PCR Cihazı (Bioneer Exicycler 96)

Mini Vortex (Bioneer Exispin)

Homojenizatör

Santrifüj Cihazı (Kubota 5500)

Su Banyosu (Lab Companion BW-10H)



**Resim 3.1** Moleküler çalışmalarda kullanılan cihazlar

##### 3.1.2 Moleküler Çalışmada Kullanılan Kitler

DNA izolasyon kiti PrepMan Ultra (Applied Biosystems)

Precision™ MasterMix (PrimerDesign)

*B.dendrobatidis*'e özgü primerler



pamuk uçlu swap (Medical Wire and quipment, MW 100-100; Biomerieux) kullanılarak hayvanlar üzerinden alınmıştır. Bu işlem 10 kez kurbağanın ventral yüzeyinden, 10 kez dorsal yüzeyinden, 10 kez her iki koltuk altı ve kasık bölgesinden, 10 kez kalçanın alt kısmından ve 10 kez ayaklarının alt yüzeyinden sürüntü alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Swaplama tekniği ile yüzey alanından en fazla miktarda örneklem alınabilmesi için ve negatif sonuç çıkma ihtimalini minimuma indirmesi için idael yöntemdir. Alınan swaplar 2.0 ml' lik steril ependorf tüplere alınıp arazi sırasında ısıdan zarar görmemeleri için azot tankları içerisinde muhafaza edilmiştir. Laboratuvar ortamına götürüldükten sonra analizler yapılana kadar -20°C' de saklanmıştır (Kriger *et al.* 2006).

### **3.2.3 *Batrachochytrium dendrobatidis*' in Moleküler Analizler İle Belirlenmesi**

#### **3.2.3.1 *Batrachochytrium dendrobatidis* için DNA ekstraksiyonu**

Çalışılacak örnek sayısı kadar 1,5 mL'lik ependorf tüplere 30-40 mg zirkonyum/silika boncuklar eklenmiştir. Tüplerin içerisine 50µL PrepMan Ultra (Applied Biosystems #4318930) eklenmiştir ve tüplerin içerisine son olarak araziden getirilen swaplar konulmuştur. Vorteks aleti kullanılarak 45 saniye boyunca çalkalanarak mevcut fungus ve zoosporların homojenize olması sağlanmıştır. Vorteksten çıkarılan ependorf tüpler kısa bir süre buz üzerinde soğutulup 13 000 g' de 30 saniye boyunca 2 kez tekrar edilecek şekilde santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra ependorflar tüp tutuculara yerleştirilerek 97 °C' de 10 dakika boyunca su banyosunda bekletildi. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda ısısında 2 dakika soğumaya bırakılmasının ardından 13 000 rpm' de 3 dakika boyunca santrifüj edilerek qPCR işlemi için yeteri kadar süpernatant toplanmıştır. Toplanan süpernatant daha sonra qPCR işleminde kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır (Boyle 2004).

#### **3.2.3.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*' in Real Time PCR İşlemiyle Belirlenmesi**

DNA ekstraksiyonu sonucu izole edilen DNA'lar *B. dendrobatidis* türünün 16S rDNA 'sında bulunan türün belirlenmesinde öneme sahip olan ITS1-3 bölgesine özgü primerler kullanılmıştır. [Chytr 5' – CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TC- 3' ve 5' – AGC CAA GAG ATC CGT TGT CAA A – 3' primerleri ve 5' -6FAM CGA GTC

GAA CAA AAT MGBNFQ- 3' ] (Taqman) . Rt- PCR için reaksiyon tüplerinin hazırlanması Çizelge 3.1 de gösterilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu protokolü Boyle *et al.* (2004) ' a göre yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Hazırlanan örneklerin her biri 0.2 ml strip PCR tüplerine konularak üzerleri şeffaf seal bant ile kapatılarak karışımın homojenize olması ve tüplerin duvarlarında kalmış olabilecek damlaların dibe inmesi amacıyla bütün tüpler vorteks/spin cihazı kullanılarak (Bioneer) 2500 rpm de 5 saniye, "hard" seviyesinde çalkalama ayarında 20 saniye ve 20 tekrar şeklinde işlem yapılmıştır. İşlem sonrası hazır olan tüpler Rt- PCR cihazının (Bioneer exicycler 96) bloğunda bulunan kuyucuklara yerleştirilerek işlem gerçekleştirilmiştir.

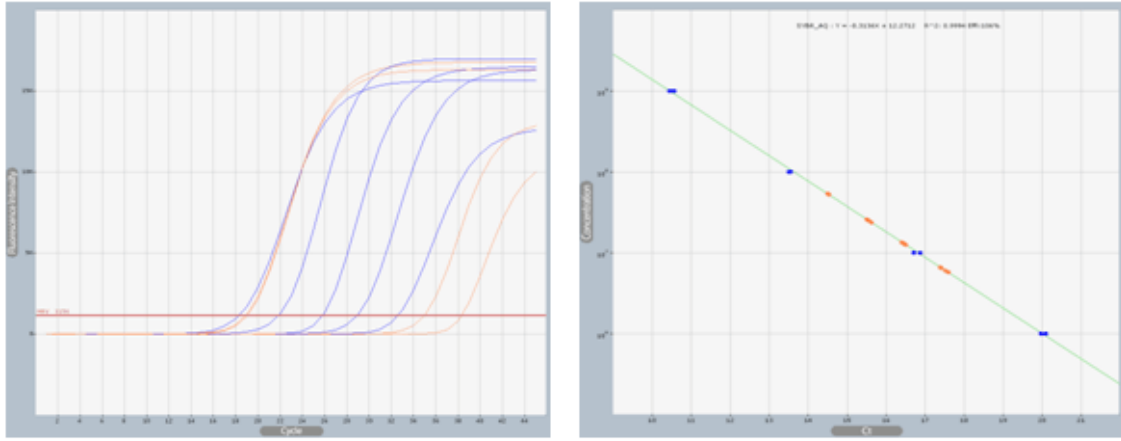
**Çizelge 3.1** Bd tespiti için yapılan Rt- PCR' da kullanılan malzemelerin miktarları

İçerik	Miktar(µL)
2x Precision™ MasterMix ( PrimerDesign, İngiltere)	10
<i>B.dendrobatidis</i> 'e özel Primer/ Probe ( 10 pikomol) mix	1
DNAz ve RNAz içermeyen steril su	4
DNA örneği ( 5 ng / µL)	5
Reaksiyon Son Hacim Toplamı	20

**Çizelge 3.2** Bd tespiti için Rt-PCR amplifikasyon protokolü (Primer Desing, İngiltere).

Döngü Sayısı	İşlem Basamağı	Süre (saat.dakika.saniye)	Sıcaklık
1 Tekrar	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.15	95 °C
45 Tekrar	Bağlanma ve Uzama	00.01.00	60 °C
	Verilerin Okunup	-	-
	Bilgisayara Aktarılması		
1 Tekrar	Melting	1 Saniye	55 °C - 94 °C

Hayvanlardan alınan örnekler qPCR işlemi 3 tekrar şeklinde yapılarak hatalı sonuç verme ihtimali en aza indirilmiştir. Pozitif örnekler üç tekrarın tümünde aynı şekilde pozitif vermiş iseler Bd pozitif olarak kabul edilmiştirler. *B.dendrobatidis* pozitif olup olmadığı qPCR cihazının bilgisayara aktarmış olduğu Ct (cycle treshold) değerlerine bakılarak yapılan değerlendirme ile gerçekleştirilmiştir. qPCR deneylerimiz boyunca her bir çalışma tepsisine standart pozitif örneklerden elde edilen dilüsyonlar kullanılarak Bioneer Exicycler 96 analiz programı tarafından standart eğri oluşturulması sağlanarak zoospor sayıları genomik eküvalent olarak tespit edilmiştir. Bu deneyde kullanılan standart örnekler yoluyla cihaz tarafından hazırlanan standart eğri referans alınarak otomatik genomik eküvalent değerleri hesaplanmıştır (Ağyar 2014).



**Resim 3.2** Bioneer firması tarafından oluşturulmuş standart eğri örneği



#### 4. BULGULAR

2013 ve 2014 yıllarında, ülkemiz Batı Karadeniz Bölgesinde (Sakarya, Zonguldak, Kastamonu, Karabük) 5 lokalitede (Söğütlü Akgöl, Kabaca köyü, Denizköy, Hasanfıki barajı, Devrek) arazi çalışmaları yapılmıştır. Arazi çalışmaları esnasında lokalitenin bulunduğu konum, yükseklik ve hava sıcaklığı ile su sıcaklığı ile pH ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.1' de verilmiştir.

**Çizelge 4.1** Arazi çalışması gerçekleştirilmiş olan bölgeler ve konumları

Lokalite	Enlem	Boylam	Su sıcaklık	Ph	Sıcaklık	Yükseklik
Söğütlü Akgöl	40° 52' 36"	30° 26' 02"	22 °C	7,3	17,6 °C	7 m
Kabaca köyü	41° 17' 53"	31° 54' 31"	18 °C	7,1	20,8 °C	482 m
Denizköy	41° 07' 11"	30° 33' 23"	23 °C	8,6	32,5 °C	0 m
Hasanfıki barajı	40° 55' 12"	30° 31' 23"	28 °C	8,1	38,1 °C	37 m
Devrek	41° 13' 06"	32° 14' 55"	17 °C	7,3	29 °C	114 m

Arazi çalışmalarında oldukça fazla miktarda karşılaşmamız beklenen türlere çok az karşılaşmıştır. Karabük ilimizde ise arazi çalışması yapıldığı dönemde sel felaketi meydana gelmesi nedeni ile çok daha az miktarda örnek bulunabilmiştir. Ancak örnek almak üzere yakalanan hayvanlarda hastalığı destekleyici lezyonlar, doku kayıpları, kırmızılıklar tespit edilmiştir.



**Resim 4.1** Hastalık belirtileri taşıyan ve ölü amfibiler

Soldaki tür *Rana ridibunda* olup Sakarya'da gözlenmiştir. Sağdaki tür ise *Bombina bombina* olup Sakarya ili Akgöl de gözlenmiştir.

Çizelge 4.2'de *Bombina bombina*, *Bufo bufo*, *Pelophylax ridibundus* ve *Rana dalmatina* ya ait çalışılan örnek sayısı verilmiştir.

**Çizelge 4.2** Türlerle ait örnek sayısı

Türler	n
Kırmızılı kurbağa ( <i>Bombina bombina</i> )	3
Siğilli kurbağa ( <i>Bufo bufo</i> )	1
Ova kurbağası ( <i>Pelophylax ridibundus</i> )	15
Çevik kurbağa ( <i>Rana dalmatina</i> )	5
N	25

n: örnek sayısı N. Toplan Örnek Sayısı

Arazi çalışmalarında 25 örnek toplanmış olup bunun 15'inin *Pelophylax ridibundus*, 5'inin *Rana dalmatina* 3'ünün *Bombina bombina* ve 1'inin ise *Bufo bufo* olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.2). *Rana dalmatina* örnekleri Yedigöller/Bolu, *Bufo bufo* örneği Kabaca/Zonguldak ve *Bombina bombina* örnekleri Akgöl/Sakarya bölgelerinden sağlanmıştır. *Pelophylax ridibundus* örnekleri ise 5 lokaliteden (İnebolu/ Kastamonu, Denizköy/ Sakarya, Akgöl/ Sakarya, Hasanfıkı/ Sakarya, Devrek/ Zonguldak) temin edilmiştir(Çizelge 4.3)

**Çizelge 4.3** Çalışılan örneklerde Batrachochytrium dendrobatidis prevalansı ve ortalama genetik ekuivalent

Türler	Lokalite	N (+ve)	Prev. (%)	GEs
<i>Rana dalmatina</i>	Yedigöller/Bolu	5 (1)	0,20	-
<i>Bufo bufo</i>	Kabaca/Zonguldak	1(0)	-	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	İnebolu/Kastamonu	5(0)	-	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Denizköy/ Sakarya	3(0)	-	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Akgöl/ Sakarya	3(2)	0,75	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Hasanfıkı/ Sakarya	3(1)	0,25	-
<i>Pelophylax ridibundus</i>	Devrek/ Zonguldak	1(0)	-	-
<i>Bombina bombina</i>	Akgöl/Sakarya	3(3)	1	-

GEs: ortalama genetik ekuivalent

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; 5 *Rana dalmatina* örneğinin sadece birinde (%20) Bd pozitif olarak belirlenmiş, *Bufo bofo* örneğinde ise Bd negatif olarak saptanmıştır

*Bombina bombina* (Kırmızılı kurbağa) türünden alınan 3 örneğin hepsinde Bd pozitif (%100) bulunmuştur. Akgöl/ Sakarya lokalitesinden alınan 2 *Pelophylax ridibundus* örneğinde (%75) ve Hasanfıkı/ Sakarya bölgesinden bulunan 3 örneğin 1'inde (%25) sonuçlarda Bd pozitif sonuç vermiştir. 2013 yılında sadece Kastamonu ilimizden örnek alımı yapılmış ve bu örneklerin hiç birisinde pozitif sonuca rastlanmamıştır.

Genetik ekuivalent ortalamaları (GEs) en yüksek *Rana dalmatina*'da  $527\pm 16$  olarak tesbit edilmiş olup bunu 436 ile Devrek/ Zonguldak alınan *Pelophylax ridibundus* örnekleri takip etmiştir. Hasanfıkı/ Sakarya lokalitesinden alınan *Pelophylax ridibundus* örneklerinde ve *Bombina bombina*'da GEs 405 olarak tesbit edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çağımızda dünya da olduğu gibi ülkemizde iklim değişikliklerinden oldukça etkilenmektedir. Bu iklim değişiklikleri en çok hayvanlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Oluşan bu olumsuz etkilerde canlı türleri arasında farklılıklar göstermektedir.

İklim değişikliklerinin canlı sağlığı üzerine yapılan çalışmaların sonuçları da gösteriyor ki bazı bulaşıcı hastalıkların vektörlerinin ve dağılımının değişmesidir. Bu sonuçta hastalığın meydana gelme ihtimali olan bölgeleri artırmaktadır. Dünyadaki 6593 amfibi türünün %32'si büyük tehlike altındadır. 122 amfibi türü yok olma tehlikesindedir. Son zamanlarda görülen toplu amfibi ölümlerinin nedenlerinden birinin *B. dendrobatidis* olduğu bilinmektedir.

*B. dendrobatidis*, İngiltere'de Amerikan Bullfroglar ya da Afrikalı Pençeli Kurbağalar ile birlikte ortaya çıktığı kabul edilir. İngiltere'deki enfekte olmuş bullfroglar; *Rana temporaria*, *Lissotriton vulgaris*, *Triturus cristatus* ve *Bufo Bufo* nun ıslahı için kullanılan küçük göletlerde meydana gelmiştir (Cunningham *et al.* 2005). Yaygın olan kara kurbağaları enfeksiyona daha duyarlı olduğundan *B. dendrobatidis*' e bağlı olarak bu türlerde azalmalar meydana gelmiştir (Bosch and Martinez-Solano, 2006). Fransada, *B. dendrobatidis* Amerikan bullfroglarında tespit edilmiştir (Garner *et al.* 2006). İspanya'da ise *Alytes obstetricans*, *Salamandra salamandra* ve *Bufo bufo* türleri chytridiomycosis nedeniyle ölümler yaşamaktadır (Bosch *et al.* 2001, Bosch and Martinez-Solano 2006). 2011 yılında İtalya'da ilk defa *B. dendrobatidis* kaydedilmiştir (Stagni *et al.* 2004). Aynı zamanda chytridiomycosis *Rana latastei* ve kuzeydeki Amerikan bullfrog popülasyonunda tespit edilmiştir (Garner *et al.* 2006). Almanya'da enfekte olan *Rana arvalis*, *R. esculenta* ve *R. esculenta synkleptonu* bulunmuş ve yapılan çalışmalar Almanya'da oldukça yaygın olduğunu ortaya koymuştur.

Pakistan da 8, Çek Cumhuriyetinde 1, İran da 1 ve Rusya da yapılmış olan çalışmalar neticesinde 2 örnekte pozitif sonuç bulunmuştur. Ayrıca Güney Kore de 18, Macaristan da 147 örnekten 22 pozitif, İtalya da 1181 örnekten 46 pozitif, İspanya da 3012 örnekten

787 pozitif, Fransa da 903 örnekten 401 pozitif, Avusturya da 277 örnekten 43 pozitif, Almanya da 489 örnekten 56 pozitif, Hollanda da 901 örnekten 24 pozitif, Belçika da 1830 örnekten 15 pozitif, Amerika da 11593 örnekten 2259 pozitif tespit edildiği bildirilmiştir (İnt. Kay 3) Bu veriler incelendiği zaman en çok çalışmanın Amerika da yapılmış olduğu görülmektedir. Dünya da yapılmış bu çalışma verileri göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde Asya; Avrupa ve Afrikada amfibi ölümlerine neden olan Bd üzerine yeterince çalışma yapılmamıştır.

Ülkemizde de Göçmen 2013 tarafından yapılan çalışmada 12 lokaliteden toplanan 330 *Lyciasalamandra* türü, 2 *Pelophylax bedriagae* ve 1 *Pseudepidalea variabilis* örnekler ile yapılan Bd tespit çalışmasında *Lyciasalamandra* türlerinde ve *Pseudepidalea variabilis* türünden Bd negatif sonuç alınırken *Pelophylax bedriagae*'nin 2 örneğinden 1 tanesi Bd pozitif olarak tespit edilmiştir (Göçmen 2013).

Diğer bir çalışmada Göller Bölgesi ve 26 Ağustos Milli Parkından toplanan 7 türe ait 228 amfibi örneğinde Bd tespiti yapılmıştır. 26 Ağustos milli parkından toplanan örneklerde türlere göre %8 ile % 29 oranlarında pozitif sonuç elde edilmiştir. Göller bölgesi çalışmalarında ise Beyşehir gölü %32 pozitiflik ile en yüksek infeksiyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Erişmiş, 2014).

Eğirdir Gölünde 2012 ve 2013 yılları arasında yapılan başkibir çalışmada ise 6 lokaliteden örnekler alınmış ve 2012 yılında alınan örneklerde %17,02 oranında *B. dendrobatidis*, 2013 yılında alınan örneklerde ise %45,00 oranında *B. dendrobatidis* pozitif sonuçlarına ulaşılmıştır. İki yılın ortalamasına bakıldığında pozitiflik yüzdesinin %25,37 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *B. dendrobatidis* kültür çalışmaları yapılarak mikroskop altında incelenerek sporangia, genç ve olgun sporahif, zoosporangia ve haploid zoospor yapılarına rastlanmıştır (Yumuk 2014).

Bir diğer çalışmada ise Beyşehir gölü ve çevresinde endemik olarak bulunan *Pelophylax caralitanus* (Beyşehir kurbağası) türünden 64 örnek üzerinde yapılan inceleme de 34 örnekte pozitif sonuç verdiği Ağyar ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (Ağyar 2014)

Ülkemizin en büyük ormanlarını barındıran Batı Karadeniz Bölgesi tür çeşitliliği açısından olmasa da türe ait bireylerin çokluğu açısından önem arz eden bir bölgemizdir. Bu tez çalışması bulgularına göre bölgemizde ki amfibi bireylerinde meydana gelen azalmanın Real-time PCR tekniği ile ölümcül hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinen amfibi patojeni *Batrachochytrium dendrobatidis*'in varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda toplam 25 örnekte [*Pelophylax ridibundus* (15), *Rana dalmatina* (5), *Bombina bombina* (3), *Bufo bufo* (1)] Bd bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. *Rana dalmatina* örnekleri Yedigöller/Bolu, *Bufo bufo* örneği Kabaca/Zonguldak ve *Bombina bombina* örnekleri Akgöl/Sakarya bölgelerinden sağlanmıştır. *Pelophylax ridibundus* örnekleri ise 5 lokaliteden (İnebolu/ Kastamonu, Denizköy/ Sakarya, Akgöl/ Sakarya, Hasanfıkı/ Sakarya Devrek/ Zonguldak) temin edilmiştir (Çizelge 4.3)

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; 5 *Rana dalmatina* örneğinin sadece birinde Bd pozitif olarak belirlenmiş, *Bufo bofo* örneğinde ise Bd negatif olarak saptanmıştır *Bombina bombina* (Kırmızılı kurbağa) türünden alınan 3 örneğin hepsinde Bd pozitif bulunmuştur. Akgöl/ Sakarya lokalitesinden alınan 2 *Pelophylax ridibundus* örneğinde (%75) ve Hasanfıkı/ Sakarya bölgesinden bulunan 3 örneğin 1'inde (%25) sonuçlarda Bd pozitif sonuç vermiştir. Akgöl/ Sakarya lokalitesinden alınan hem *Pelophylax ridibundus* hemde *Bombina bombina* Bd pozitif bulunmuştur.

2013 yılında sadece Kastamonu ilimizden örnek alımı yapılmış ve bu örneklerin hiç birisinde pozitif sonuca rastlanmamıştır. Ancak 2014 yılında Batı Karadeniz Bölgesi tüm arazisi yapıldıktan sonra DNA izolasyonu ve qPCR işlemi ardından çalışılan 20 örnekten 7 tanesinde pozitif sonuç çıktığı görülmüştür.(Çizelge 4.3).

Genetik ekuivalent ortalamaları (GEs) en yüksek *Rana dalmatina*'da  $527\pm 16$  olarak tesbit edilmiş olup bunu 436,00 ile Devrek/ Zonguldak alınan *Pelophylax ridibundus* örnekleri takip etmiştir. Hasanfıkı/ Sakarya lokalitesinden alınan *Pelophylax ridibundus* örneklerinde ve *Bombina bombina*'da GEs 405,00 olarak tesbit edilmiştir.

Sonuç olarak; Bu çalışma Batı Kardeniz bölgesindeki amfibi patojeni Bd'nin saptanması

ile ilgili öncül bir çalışmadır. Çalışmasında 25 örneğin 7'sinin Bd pozitif olduğu saptanmıştır. Ancak pozitif sonuç veren örneklerin bir kısmında Bd pozitive ait herhangi bir lezyona veya davranış bozukluğuna rastlanılmamıştır. Doğal ortamlarında sağlıklı görünüme sahip olsalar dahi amfibilerdeki Bd tesbiti için moleküler çalışmalar (özellikle qPCR) sonucunda kesin kanıya varılabileceği belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalar patojenin dağılımını etkileyen faktörlerin saptanması üzerine olmalıdır. Ayrıca elde edilen sonuçlar Türkiye' de ki diğer tür azalışlarında da patojenlerin etkin olup olmadığının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Ağyar P. (2014). Real-Time PCR Kullanılarak Beyşehir Gölü ve Çevresinde İki Amfibi Patojeninin (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirüs) Yaygınlığının İlk Kez Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Alemu I., J. B., Cazabon, M. N. E., Dempewolf, L., Hailey, A., Lehtinen, R. M., Mannette, R. P., Naranjit, K. T., Roach, A. C. J. (2008). Presence of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in populations of the critically endangered frog *Mannophryne olmonae* in Tobago, West Indies. *EcoHealth*, **5**: 34-39.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., Joyle, E. Ve Longcore J.E., (2004). A DNA-Based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, **40(3)**; 420-428.
- Andre SE, Parker J, Briggs CJ (2008). "Effect of temperature on host response to *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*)". *Journal of Wildlife Diseases*, **44 (3)**: 716–720.
- Andreone, F., Carpenter, A.I., Cox, N., du Preez, L., Freeman, K., Furrer, S., Garcia, G., Glaw, F., Glos, J., Knox, D., Kehler, J., Mendelson, J.R. III, Mercurio, V., Mittermeier, R.A., Moore, R.D., Rabibisoa, N.H.C., Randriamahazo, H., Randrianasolo, H., Raminosoa, N.R., Ramilijaona, O.R., Raxworthy, C.J., Vallan, D., Vences, M., Vieites, D.R., Weldon, C. (2008). The challenge of conserving amphibian megadiversity in Madagascar. *PLOS Biology*, **6**: 118.
- Bai, C., T. W. Garner, and Y. Li (2010). "First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American bullfrogs and native amphibians in the Yunnan Province, China". *EcoHealth*, **92**: 241–244.
- Baran, İ., Ilgaz, Ç., Avcı, A., Kumlutaş, Y., Olgun, K. (2012). Türkiye Amfibi ve Sürüngenleri. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, 3. baskı, Ankara, Türkiye
- Barr, D.J.S. (1990). Phylum chytridiomycota. In Handbook of Protoctista (eds L.Margulis, J.O. Corliss, M. Melkman & D. J. Chapman), Boston, 454-466
- Bell, B.D., Carver, S., Mitchell, N.J., Pledger, S. (2004). The recent decline of a New Zealand endemic: how and why did populations of Archey's frog *Leiopelma archeyi* crash over 1996-2001? *Biological Conservation*, **120**: 189-199.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G., Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings Natural Academy Science USA* **95**: 9031-9036.



- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications, and future directions. In Campbell, A. (ed.) *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, Canberra, 23-33.
- Berger, L. Diseases in Australian Frogs[PhD thesis]. Townsville, Australia. James Cook University: Townsville. (2001)
- Berger, L.R. Speare, H., Hines, B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C., Tyler, M.J. (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to Chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, **82(7)**: 434-439.
- Berger L, Hyatt A.D., Speare R, Longcore J.E. (2005) Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* the amphibian chytrid. *Diseases of Aquatic Organisms*, **68**:51-63
- Blackburn, D.C., Evans, B.J., Pessier, A.P., Vredenburg, V.T. (2010): An enigmatic mortality event in the only population of the Critically Endangered Cameroonian frog *Xenopus longipes*. *African Journal of Herpetology*. **59**: 111-122
- Bishop, P. (2000). *Batrachochytrium dendrobatidis* identified from dying frogs in New Zealand. Confirmed by L. Berger. Unpublished data.
- Bosch, J., Martinez-Solano, I., Garcia-Paris, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, **97**: 331-337
- Bosch, J., Martinez-Solano, I., (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Penalara Natural Park, (Central Spain). *Oryx*, **40**: 84-89.
- Bosch, J., Carrascal, L.M., Duran, L., Walker, S., Fisher, M.C. (2007). Climate change and chytridiomycosis in a montane area of Central Spain: Is there a link? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **274**: 253-260.
- Bovero S, Sotgiu G, Angelini C, Doglio S, Gazzaniga E, Cunningham AA, Garner TWJ (2008). "Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered sardinian newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy". *Journal of Wildlife Diseases*, **44 (3)**: 712–715.
- Boyle, N.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, **60**: 141-148.
- Byrne MW, Davie EP, Gibbons JW (2008). "Batrachochytrium dendrobatidis occurrence in *Eurycea cirrigera*". *Southeastern Naturalist*, **7(3)**: 551–555.

- Brodman R, Briggler JT (2008). "Batrachochytrium dendrobatidis in *Ambystoma jeffersonianum* larvae in southern Indiana". *Herpetological Review*, **39** (3): 320–321.
- Budak, A., Göçmen, B. (2008). Herpetoloji ders kitabı. Ege Üniversitesi Yayınları-Fen Fakültesi Yayın No:194 Isbn 975-483-658-2.
- Burrowes, P. A., Joglar, R.I., Green, D.E. (2004). Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica*, **60**: 141-154.
- Burrowes, P.A., Longo, A.V., Joglar, R.L., Cunningham, A.A. (2008). Geographic distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Puerto Rico. *Herpetological Review*, **39**: 321-324.
- Channing, A., Finlow-Bates, K.S., Haarklau, S.E., Hawkes, P.G. (2006). The biology and recent history of the Critically Endangered Kihansi Spray Toad in Tanzania. *Journal of East African Natural History*, **95**: 117-138.
- Cheng, T.L., Rovito, S.M., Wake, D.B., Vredenburg, V.T. (2011). Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 9502–9507.
- Cummer, M.R., Green, D.E., O'Neill, E.M. (2005). Aquatic chytrid pathogen detected in terrestrial plethodontid salamander. *Herpetological Review*, **36**: 248-249.
- Cunningham, A.A., Langton, T.E., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E., Gough, R.E., Macgregor, S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical transactions of the Royal Society London Biology Science*, **351**: 1539-1557.
- Cunningham, A.A., Garner, T.W.J., Agilar-Sanchez, V., Banks, B., Foster, J., Sainsbury, A.W., Perkins, M., Walker, S.F., Hyatt, A.D., Fisher, M.C. (2005). Emergence of amphibian chytridiomycosis in Britain. *Veterinary Record*, **157**: 386-387.
- Crump, M.L., Hensley, F.R., Clark, K. L. (1992). Apparent decline of the Golden Toad: underground or extinct? *Copeia*, **1992**:413-420.
- Crochet, P.-A., Chaline, O., Cheylan, M., Guillaume, C.P. (2004). No evidence of general decline in an amphibian community of Southern France. *Biological Conservation*, **119**:297-304.
- Czechura, G.V., Ingram, G. (1990). *Taudactylus diurnus* and the case of the disappearing frogs. *Memoirs of the Queensland Museum* **29**(2): 361-365.
- Davidson, E. W., Parris, M., Collins, J. P., Longcore, J. E., Pessier, A. P., Brunner, J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders

- (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, **2003**: 601-607.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, **287**: 443-449.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt, A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**: 141-150.
- Demirsoy, A., (1996). Türkiye Omurgalıları. Memeliler. Çevre Bakanlığı, Çevre Koruma Gen. Müd. Proje No: 90-K-1000-90.292 s.
- Díaz, L. M., Cádiz, A., Chong, A., Silva, A. (2007). First report of chytridiomycosis in a dying toad (Anura: Bufonidae) from Cuba: a new conservation challenge for the island. *EcoHealth*, **4**: 172-175.
- Erismis U., Konuk M., Yoldaş T., Agyar P., Yumuk D., Korcan E. (2014). Survey of Turkey's endemic frogs for amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **111(2)**:153-7
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A., Fisher, M.C (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **11(10)**: 1639-1641.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A., Fisher, M.c. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, **2**: 455-459
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T., Hyatt, A.D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, **18(23)**: 4757-74.
- Göçmen, B., Veith, M., Iğci, N., Akman, B., Godmann, O., Wagner, N. (2013). No Detection Of The Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* In Terrestrial Turkish Salamanders (*Lyciasalamandra*) Despite Its Occurrence In Sympatric Frogs (*Pelophylax bedriagae*). *Salamandra*, **49(1)**: 51-55
- Heyer, W.R., Rand, A.S., Gonçalves da Cruz, C.A., Peixoto, O.L. (1988). Decimations, extinctions, and colonizations of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. *Biotropica*, **20**: 230-235.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases Of Aquatic Organisms*, **73**:175-192
- Ingram, G. J., McDonald, K. R. (1993). "An update on the decline of Queensland's frogs."

Herpetology in Australia: A diverse discipline. D. Lunney and D. Ayers, eds., Transactions of the Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney, 297-303.

Karling, J.S. (1977). Chytridiomycetorum Iconographia: An Illustrated and Brief Descriptive Guide to the Chytridiomycetous Genera with a Supplement of the Hyphochytriomycetes (Lubrecht and Cramer, Monticello, NY)

Kruger, K. M., Hero, J.M., Ashton, K.J. (2006). Cost Efficiency in The Detection Of Chytridiomycosis Using PCR Assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, **71**: 149-154.

Kruger, K.M., Hero, J.M. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is nonrandomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions*, **13**: 781-788.

Kruger, K.M and Hero, J.M. (2009). Chytridiomycosis, Amphibian Extinctions, and Lessons for the Prevention of Future Panzootics. *Ecohealth*, **6**(1): 6-10.

Laurance, W.F., McDonald, K.R., Speare, R. (1996). Australian rain forest frogs: support for the epidemic disease hypothesis. *Conservation Biology*, **10**: 406-413.

Laurance, W.F. (2008). Global warming and amphibian extinctions in Eastern Australia. *Austral Ecology*, **33**: 1-9.

Lips, K. R. (1999). Mass mortality and population declines of anurans at an upland Site in Western Panama. *Conservation Biology*, **13**: 117-125.

Lips, K. R., Green, D. E., Papendick, R. (2003a). Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, **37**: 215-218.

Lips, K. R., Reeve, J. D., Witters, L. (2003b). Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology*, **17**: 1078-1088.

Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., R.A., Alford, Voyles, J., Carey, C., Livo, L Pessier, A.P., Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **103**: 3165-3170.

Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J.R., Sears, M.W. (2008). Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology*, **6** (3): 441-454.

Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. Et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**: 219-227.

Mahony, M., Tyler, M.J., Davies, M. (1984). "A new species of the genus *Rheobatrachus* (Anura: Leptodactylidae) from Queensland." *Transactions of the Royal Society of*

*South Australia*, **108(3)**: 155-162.

- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003). Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana* farmed for international trade). *Emerging Infectious Diseases*, **9**: 995-998
- Marantelli, G., Berger, L., Speare, R., Keegan, L. (2004). Changes in distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development leading to high mortality after metamorphosis. *Pacific Conservation Biology*, **10**: 173-179.
- McIntyre, S. (2003). The current status of the mountain chicken *Leptodactylus fallax* on Dominica, eastern Caribbean: an amphibian in decline. MSc. Thesis, University of East Anglia, Norwich, UK.
- Morehouse, E.A., James, T.Y., Ganley, A.R.D., Vilgalys, R., Berger, L., Murphy, P.J., Longcore, J.E. (2003). Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, **12 (2)**: 395-403.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Stice, M.J., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J., Taylor, J.W., (2007). Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104 (34)**: 13845-13850.
- Muths E, Gallant AL, Campbell EHC, Battaglin WA and others (2006) The Amphibian Research and Monitoring Initiative (ARMI): 5-year report. US Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5224.
- Nichols, D.K., Lamirande, E.W., Pessier, A.P., and Longcore, J.E. (2001). Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**: 1-11.
- Norman, R., B. Waldman. (2000). New Zealand Wildlife Health Centre, Massey University, and University of Canterbury, New Zealand. Confirmed by L. Berger.
- Obendorf, D.L. (2005). Developing field & diagnostic methods to survey for chytridiomycosis in Tasmanian frogs. Central North Field Naturalists, Inc. Tasmania, Australia. Report to the Department of Environment and Heritage, Canberra.
- Obendorf, D.L., Dalton, A. (2006). A survey for the presence of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Tasmania. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania* **140**: 25-29.
- OIE. (2006). Epizootic haematopoietic necrosis, in: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. *World Organisation for Animal Health*, 82-103.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B.D., Rodrigue, J., Green, D.M. (2005). Historical

evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology*, **19**; 1431-40

- Öz B. (2007). Batı Karadeniz Bölgesi Akarsularında Bentik Makroinvertebrat Faunası Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özmen, B., 2000, Düzce-Bolu Bölgesi'nin Jeolojisi, Diri Fayları ve Hasar Yapan Depremleri, 12 Kasım 1999 Düzce Depremi Raporu, Ankara, 14s.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E., Fuller, M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**: 194-199.
- Picco, A.M., Karam, A.P., Collins, J.P. (2010). Pathogen host switching in commercial trade with management recommendations. *Ecohealth*, **7**: 252-256.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96**: 9-15.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E., Fuller, M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **11**; 194-199.
- Picco, A.M., Karam, A.P., Collins, J.P. (2010). Pathogen host switching in commercial trade with management recommendations. *Ecohealth*, **7**; 252-256.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96**:9-15.
- Rachowicz, L.J., Vredenburg, V.T. (2004). Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, **61**: 75-83.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., J. Morgan, A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker J.M., Briggs, C.J. (2006). Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, **87**: 1671-1683.
- Rosenblum, E. B., Stajich, J. E., Maddox, N., Eisen, M. B. (2008). Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**: 17034-17039.
- Rovito, S.M., Parra-Olea, G., V-squez-Almaz-n, C.R., Papenfuss, T.J., Wake, D.B. (2009). Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**: 3231-3236.

- Ron, S.R. (2005). Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, **37**: 209-221.
- Seimon, T. A., Seimon, A., Daszak, P., Halloy, S.R.P., Schloegel, L.M., Aguilar, C. A., Sowell, P., Hyatt, A.D., Konecky, B., Simmons, J. E. (2006). Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology*, **12**: 1-12.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B., Kenyon, N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**: 125-134.
- Soto-Azat, C., Clarke, B. T., Poynton, J. C., Cunningham, A. A. (2010). Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. *Diversity and Distributions*, **16**: 126-131.
- Sparrow, F.K. 1960. Aquatic Phycomycetes, 2nd revised edition. University of Michigan Press, Ann Arbor.
- Stagni, G., Scoccianti, C., Fusini, R. (2002). Segnalazione di chytridiomicosi in popolazioni di *Bombina pachypus* (Anura, Bombinatoridae) dell'Appennino toscoemiliano. Abstracts IV; Congresso della Societas Herpetologica Italica; Napoli: *Societas Herpetologica Italica*; 2002.
- Van Sluys, M., Hero, J.-M. (2010). How does chytrid infection vary among habitats? The case of *Litoria wilcoxii* (Anura, Hylidae) in SE Queensland, Australia. *EcoHealth*,
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L.F., Speare, R. (2009). Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, **326**: 582-585.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S., Briggs, C.J. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**: 9689-9694.
- Waldman, B., van de Wolfshaar, K.E., Klena, J.D., Andjic, V., Bishop, P.J. Norman, R. J. de B., (2001). Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance*, **28**: 9-11.
- Walker, S. F., Bosch, J., Gomcz, V., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Schmeller, D.S., Ninyerola, M., Henk, D., Ginestet, C., Arthur, C.P. and Fisher, M.C. (2010). Factors driving pathogenicity vs. prevalence of amphibian panzootic chytridiomycosis in Iberia. *Ecology Letters*, **13**(3): 372-82.
- Weygoldt, P. (1989). Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: frogs as indicators of environmental deteriorations? *Studies of Neotropical Fauna and Environment*, **24**(3): 249-255.

- Winter, J. McDonald, K. (1986). "Eungella, the land of cloud." Australian Natural History, **22(1)**: 39-43.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. (2005). Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology*, **19**: 1449-1459.
- Weinstein, S. (2009). An aquatic disease on a terrestrial salamander: individual and population level effects of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, on *Batrachoseps attenuatus* (Plethodontidae). *Copeia*, **2009 (4)**: 653-660.
- Weldon, C., du Preez, L., Vences, M. (2008). Lack of detection of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in Madagascar. In: A Conservation Strategy for the Amphibians of Madagascar. Monografia XLV, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino.
- Weldon, C., du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, **10**: 2100-2105.
- Yumuk D. (2014). Real-Time PCR Kullanılarak Eğirdir Gölü ve Çevresinde İki Amfibi Patojeninin (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirüs) Yaygınlığının İlk Kez Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- YWalker, S.F., BoschJ., James, T.Y., Litvintseva,A.P., VallsJ.A.O., Pina, S., Garcia,G., Abadie Rosa,G., Cunningham, A.A., Hole, S., Griffiths, R. and Fisher, M.C. (2008). Invasive pathogens threaten species reovery programs. *Current Biology*, 1S(1S): RS53-RS54.



## **İNTERNET KAYNAKLARI**

1. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Karadeniz\\_B%C3%B6lgesi](http://tr.wikipedia.org/wiki/Karadeniz_B%C3%B6lgesi), 12.04.2015
2. [http://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrkiye'de\\_Karadeniz\\_iklimi](http://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrkiye'de_Karadeniz_iklimi), 08.02.2015
3. [http://www.milliparklar.gov.tr/biosempozyum/bioweb/bildiri\\_ozeti.pdf](http://www.milliparklar.gov.tr/biosempozyum/bioweb/bildiri_ozeti.pdf), 05.12.2014
4. <http://amphibiaweb.org/declines/disease.html>, 20.12.2014
5. <http://www.bd-maps.net/maps/>, 12.12.2014
6. <http://www.globalamphibians.org>, 10.05.2015

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fahri PAT  
Doğum Yeri ve Tarihi : KASTAMONU/ 25.12.1988  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) :0544 206 10 88 / fahripat@gmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İnebolu Lisesi(2006)  
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü(2012)  
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Yayımları (SCI ve diğer) :

Elif KORCAN, Taner YOLDAŞ, Pınar AĞYAR, Fahri PAT, Uğur C. ERİŞMİŞ (2014);  
“Amfibilerde Azalma Nedeni iki Patojeni(Batrachochytrium dendrobatidis ve  
Ranavirus)’ nin Durumuyla ilgili Türkiye’ de İlk Kayıtlar”; 22. Ulusal Biyoloji Kongresi,  
Osmangazi Üniversitesi