

**İŞIKLI GÖLDE, REAL – TIME PCR TEKNİĞİ İLE İKİ
AMFİBİ PATOJENİ (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve
Ranavirus (Iridoviridae))’NİN YAYGINLIĞININ İLK KEZ
SAPTANMASI**

YÜKSEK LİSANS

Taner YOLDAŞ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz, 2014

Bu tez çalışması, 13.FEN BİL.03 numaralı proje ile AKÜ BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IŞIKLI GÖLDE, REAL – TIME PCR TEKNİĞİ İLE İKİ AMFİBİ
PATOJENİ (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus*
(*Iridoviridae*))’NİN YAYGINLIĞININ İLK KEZ SAPTANMASI**

Taner YOLDAŞ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Taner YOLDAŞ tarafından hazırlanan “Işıkli Gölde, Real – Time PCR Tekniği İle İki Amfibi Patojeni (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus (Iridoviridae)*)’nin Yaygınlığının İlk Kez Saptanması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 11/07/2014 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

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

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

Üye : Doç. Dr. Emine Hesna Kandır İmza
Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi

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

.....
Prof. Dr. Yılmaz YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

- 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.

04.07.2014

İmza
Taner YOLDAŞ

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

IŞIKLI GÖLDE, REAL – TIME PCR TEKNİĞİ İLE İKİ AMFİBİ PATOJENİ
(*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirus (*Iridoviridae*))’NİN YAYGINLIĞININ
İLK KEZ SAPTANMASI

Taner YOLDAŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

Bu çalışmada, Denizli iline bağlı Çivril ilçesindeki Işıklı Göl’de bulunan, IUCN kriterlerine göre Kırmızı Liste’de (Red List) “Nesli tehlike altında bulunan hayvanlar (Near Threatened, NT)” kategorisinde yer alan ve azalmakta olduğu ifade edilen endemik anur türü *Pelophylax caralitanus* üzerinde Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) tekniği ile iki amfibi patojeni tespit edilmiştir. Ölümcül hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinen amfibi bu patojenleri Chytridiomycosis hastalığına sebep olan *Batrachochytrium dendrobatidis* ve Red-Leg hastalığına sebep olan Ranavirus (Frog virüs, FV-3) türlerine ait primerler kullanılarak bu patojenlerin varlığı ya da yokluğu Işıklı Gölü’nde ilk kez tespit edilmiştir.

Işıklı Göl’de 2013 yılında yapılan arazide 4 farklı lokalite olmak üzere toplanan endemik Anadolu bataklık kurbağası ya da Beyşehir kurbağası (*Pelophylax caralitanus*) üzerinde yapılan çalışmada *Batrachochytrium dendrobatidis* patojen fungusu tespiti için toplamda 67 örnek çalışılmış ve 21 örnekten pozitif sonuç elde edilmiştir. Ranavirus tespiti için yapılan çalışmalarda ise toplam 49 örnek MCP ve IE primerleri ile qPCR çalışmaları yapılmıştır. MCP primerleri ve IE primerleri ile çalışılan örneklerin sırasıyla 8 ve 9 tanesinden pozitif sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak amfibi türlerinin yok olmasından sorumlu kabul edilen bu iki ölümcül patojen; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungusu ve Ranavirus (*Iridoviridae*)’ün ülkemizdeki endemik *Pelophylax caralitanus* türünü tehdit etmektedir.

2014, ix + 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirus

ABSTRACT
M.Sc Thesis Thesis

FIRST DETERMINATION PREVALENCE OF TWO AMPHIBIAN PATHOGEN
(*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirus (*Iridoviridae*)) BY REAL – TIME PCR
TECHNIQUE IN IŞIKLI LAKE

Taner YOLDAŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Associate Professor Uğur Cengiz ERİŞMİŞ

In this research, two amphibian pathogens were identified on endemic *Pelophylax caralitanus* which is located in Işıklı Lake in Çivril, Denizli and listed as Near Threatened (NT) on Red List by IUCN and also known as to be decreasing, using the Real – Time PCR (quantitative PCR, qPCR) technique. That two amphibian pathogens are *Batrachochytrium dendrobatidis* and Ranavirus (Frog virüs, FV-3). *Batrachochytrium dendrobatidis* causes Chytridiomycosis and Ranavirus (Frog virüs, FV-3) causes Red – Leg deadly diseases. In Işıklı Lake, presence or absence of that pathogen organisms was determined for the first time using qPCR technique with specific primers.

For detection *Batrachochytrium dendrobatidis*, 67 samples were collected In field studies of 2013 from 4 localities of lake and 21 samples of that 67 samples were determined as positive. For detection Ranavirus, 49 samples were collected and studied with two different primer pairs that are MCP and IE primers. At the result of this studies using with MCP and IE primers, respectively 8 and 9 positives results have been taken.

Consequently, that two deadly pathogens which responsible extinction of amphibians; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungi and Ranavirus (*Iridoviridae*) are threat to endemic *Pelophylax caralitanus*.

2014, ix + 67 pages

Key Words: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirus

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bölümümüzün tüm hizmetlerini benden esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanlığına, maddi desteklerinden dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve 113Z139 nolu proje destekleri için TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Araştırmalarım, arazi çalışmaları ve laboratuvar çalışmaları sürecinde yardım ve manevi desteklerinden dolayı yüksek lisans öğrencileri Pınar AĞYAR ve Dilay YUMUK' a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Taner YOLDAŞ
AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1. <i>Pelophylax caralitanus</i>	4
2.2 Işıklı Göl.....	7
2.2.1 Işıklı Göl Faunası	9
2.2.2 Işıklı Göl Florası.....	10
2.2.3 Alanda Aktiviteler	10
2.2.4 Başlıca Tehdit ve Sorunlar	10
2.2.5 Gölün Genel Jeomorfolojik Özellikleri.....	11
2.3 Chytridiomycosis ve <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	11
2.3.1 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> 'in Familyası.....	12
2.3.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> 'in Yaşam Döngüsü	13
2.3.2 Kökeni.....	15
2.3.2 Bd'nin Küresel Dağılımı.....	16
2.4 Ranavirus (<i>Iridoviridae</i>).....	18
2.4.1 Ranavirus Genusu	19
2.4.2 Virion Yapısı ve Sitopatolojisi	20
2.4.3 Ranaviruslerin Genomik Özellikleri.....	23
2.4.4 Epidemiyolojisi ve Konak Özgüllüğü	25
2.4.4 Ranaviruslerin Dünü, Bugünü, Geleceği	27
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1 Arazi Çalışmaları ve Örneklem	30
3.2 Laboratuvar Analizleri.....	32

3.2.1 Swaplardan DNA İzolasyonu	32
3.2.2 Ranavirus için DNA İzolasyonu	32
3.2.3 Elektroforez İşlemi	33
3.2.4 Qbit Ölçümleri	33
3.3 Bd Tespiti İçin Real Time PCR (qPCR) İşlemi	33
3.3.1 Standart Örneklerin, Pozitif ve Negatif Kontrollerin Hazırlanması	33
3.2.2. Real Time PCR Uygulaması	34
3.4 Ranavirus (FV-3) Tespiti için Real Time PCR İşlemi	35
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
6. KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ 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
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
°C	Santigrat Derece
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
ml	Militre
Cm ²	Santimetre kare
µl	Mikrilitre
M	Molar
mM	Mili Molar
ng	Nanogram
Km	Kilometre
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

Bd	Batrachochytrium dendrobatidis
rpm	Rotation per minute
ITS1-3	ITS1-3 gen bölgesi
FV-3	<i>Frog virüs 3</i>
MCP	Major Capsid Protein
IE	immediate early
NPH	yeni patojen hipotezi-new pathoge hypothesis
BIV	<i>Bohle iridovirüs</i>
ECV	<i>European catfish virüs</i>
TFV	<i>Tiger frog virus</i>
EHNV	<i>Epizootic haematopoietic necrosis virus</i>
ATV	<i>Ambystoma tigrinum virüs</i>
SCRV	<i>Santee-Cooper ranavirüs</i>
ICTV	uluslar arası virüs taksonomi topluluğu
SGIV	Singapore grouper iridovirus
RNA POL II	Ribonükleik asit polimeraz II enzimi
UV	Ultra Viyole Işık
STIV	Soff-Shelled Turtle Iridovirus
IUCN	International Union for Conservation of Nature
qPCR	Quantative Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> 'in yaşam döngüsüne dair bir figür	14
Şekil 2.2 Zarflı ve zarfsız ranavirüs virionlarının yapısı.....	21
Şekil 2.3 Ranavirüslerin replikasyon döngüsünün özeti	22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 <i>Pelophylax caralitanus</i> 'un taksonomik hiyerarşisi.....	5
Çizelge 2.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> Hiyerarşik Sınıflandırması.....	13
Çizelge 2.3 Ranavirus cinsine ait türler ve izolatlar	20
Çizelge 2.4 Ranavirüslerdeki kodlanan protein örnekleri ve onların tahmin edilen görevleri.....	24
Çizelge 3.1 Işıklı Gölünde yapılan arazi çalışması koordinat bilgileri.....	31
Çizelge 3.2 Standart eğrisinin oluşturulabilmesi ve miktar tayini yapılması için standart pozitif kontrollerin hazırlanması.....	34
Çizelge 3.3 Bd tespiti için yapılan qPCR'da kullanılan malzemelerin miktarları.....	34
Çizelge 3.4 Bd tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü.....	35
Çizelge 3.5 Ranavirus (FV-3) tespitinde kullanılan primer dizileri.....	36
Çizelge 3.6 Ranavirus (FV3) tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü.....	36
Çizelge 4.1 Bd ve Ranavirus qPCR deneyleri sonucu elde edilen pozitif sonuçlar, negatif sonuçlar ve pozitiflik % değerleri.....	38
Çizelge 4.2 Lokalitelere göre genomik eküvalent ortalamaları.....	40

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 Endemik <i>P. Caralitanus</i> 'un yayılım haritası.....	5
Resim 2.2 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> 'e ait Dünya genelindeki yayılım haritası.....	16
Resim 2.3 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> patojenin yıllara bağlı olarak global dağılım haritası.....	17
Resim 2.4 <i>B.dendrobatidis</i> için öngörülen temel ekolojik niş haritası.....	17
Resim 2.5 Küresel Ranavirus dağılım haritası.....	19
Resim 3.1 “kırmızı renkli çizgi: arazi boyunca izlenen rota” ve lokaliteler.....	30
Resim 3.2 Işıklı Gölü ve arazi çalışmalarına ait bazı fotoğraflar.....	31
Resim 4.1 qPCR sonrası Bd zoospor miktar tayininde kullanılan standart eğriye bir örnek.....	39
Resim 4.2 qPCR sonrası Bd zoospor miktar tayininde kullanılan standart eğriye bir örnek.....	39
Resim 4.3 Arazide yakalanan ve bazı bölgelerinde lezyon gözlemlenen örnekler.....	41

1. GİRİŞ

Ülkemiz, konum olarak Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarının kenetlendiği bir noktada bulunması, üzerinde önemli ticaret yollarını barındırması, üç tarafı denizlerle çevrili olması ve dört mevsimin de görülebildiği konumundan dolayı yeryüzünün nadir kara parçalarından biridir. Bu önemli jeomorfolojik konumundan dolayı önemli bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Ülkemiz birçok endemik bitki ve hayvan türüne ev sahipliği yapmakta olduğundan yeryüzündeki gen havuzları arasında da stratejik bir konuma sahiptir. Fakat küresel ısınmaya bağlı iklim değişiklikleri, pestisit kullanımının bilinçsizce yapılması ve ağır metal içerikli kirleticilerin artması, bilinçsiz avlanma, doğal kaynakların aşırı kullanımı, sürdürülebilir olmayan enerji kaynaklarının kullanılmasına devam edilmesi gibi çoğunluğu antropojenik kaynaklı sebeplerden dolayı ülkemiz biyoçeşitliliği zarar görmektedir. Günümüzde bazı canlı türleri yok olmuş ve birçoğu da yok olma tehlikesi ile karşı karşıya iken birçok zararlı organizmalar da ülkemizde yaşam alanı bulmaya başlamıştır (Ozturk, 2002).

1980 yılından beri yapılan çalışmalarda 122 amfibi türünün pek çok nedenden dolayı yok olma tehlikesi altında olduğu ve popülasyonlarının %43 azaldığı bilinmektedir. Ülkemize ekolojik ve ekonomik anlamda önemli katkıları bulunan amfibi türlerindeki azalış sebepleri arasında çevre kirliliği, ticari amaçlı bilinçsiz toplanması, yanlış zirai ilaç kullanımı gibi sebepler olmasına rağmen Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yaban hayat hastalıkları listesinde amfibi türlerinin yok olmasından sorumlu kabul edilen iki önemli patojen; *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungusu ve Ranavirus (*Iridoviridae*) hakkında detaylı hiçbir çalışma bulunmamaktadır.

Amfibi patojeni olarak bilinen *Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycosis olarak adlandırılan enfeksiyona neden olur. Birçok amfibi türünün azalmasına neden olan istilacı bir fungal tür olup ilk kez yerkürenin güney bölgelerinde ortaya çıkmış ve çoğunlukla ticari yollar ile global olarak dağılım göstermiştir. Ayrıca iklim değişikliği etkisiyle yerkürenin kuzey bölgesine dağılım yayılımı hızlanmıştır. Söz konusu patojen dünya üzerinde 200'den fazla amfibi türünün azalmalarına neden olduğu da bilinmektedir. Berger ve ark. (1998) tarafından dünya genelinde amfibilerde kütleli toplu ölümlere neden olduğu bilinen Chytridiomycosis hastalığının sebebi olan

Batrachochytrium dendrobatidis patojen fungusu ilk olarak Panama ve Avustralya'da amfibi türlerindeki ani azalışın sebebi olduğu belirlenmiştir. Aynı araştırmada bu patojenin kökeninin Güney Afrika Cape Town Müzesindeki (SAMZR 18927) 1938 yılı kayıtlı *Xenopus leavis* örneklerin incelenmesiyle anlaşılmıştır (Weldon 2004). Birçok araştırmacı bu patojenin başta iklim değişikliği olmak üzere dünya çapında yapılan kurbağa ticareti yapılması nedeniyle yayıldığını, Afrika, Güney Amerika, Orta Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Yeni Zelanda'da 287 amfibi türünde ve 25 familyasında *B. dendrobatidis* tespit edilmiştir (Lips *et al.* 2008, Bosch *et al.* 2007, Skerratt *et al.* 2007, Laurance 2008, Rohr *et al.* 2008, Krigger 2009).

2008 yılında, Dünya sağlık örgütünün Yaban hayat organizasyonu (World Organisation for Animal Health, 2008) tarafından Yaban Hayat Hastalıkları Listesine yerleştirilen ve yüksek ölümcül salgın hastalıklar sınıfına dahil edilen ranaviral hastalıkları bulaştıran Ranavirus türleri, Iridoviridae familyasına dahildir. Ranavirusler balık ve sürüngenlerde de amfibilerde olduğu gibi sistemik enfeksiyonlarla ölümlere neden olur. Frog virüs (FV-3) yanısıra Bohle virus, (BIV), Epizootic haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) türleri de amfibiler üzerinde viral hastalıklara neden olmaktadır. Yukarıda bahsedilen virüs türlerinin en önemli özelliği genomunda major capsid protein (MCP) genini içermeleridir.

Bu çalışmada ülkemizin endemik amfibi türlerinden ve International Union for Conservation of Nature (IUCN) (İnt. Kyn. 1) ölçütlerine göre Kırmızı Liste'de (Red List) "Nesli tehlike altında bulunan hayvanlar (Near Threatened, NT)" kategorisinde olan *Pelophylax caralitanus* (Beyşehir Kurbağası)'un Anadolu'nun önemli sulak alanlarından biri olan Işıklı Göl (Denizli)'deki popülasyonun Bd ve Ranavirus patojenleri tarafından infekte edilip edilmediği araştırılmıştır.

Yapılan arazi çalışmalarında Işıklı Gölün tüm çevresi dolaşarak, gölün 4 farklı lokalitesindeki hayvanlar uygun koşullarda yakalanarak örnekleme işlemleri yapılmıştır. Alınan örnekler soğuk zincir ile en kısa sürede laboratuvar ortamına taşınmıştır. Mümkün olan durumlarda örneklerin en kısa sürede DNA ekstraksiyon işlemleri ve günümüzdeki en güvenilir tespit ve miktar tayini tekniklerinden biri olan Gerçek Zamanlı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR, Quantification PCR, qPCR) deneysel çalışmaları yapılmıştır. Arazi çalışmasından uzun süre sonra çalışma yapılması planlanan durumlarda ise örnekler -20  C lik soğutma dolabında saklandı. Bd tespiti için yapılan qPCR çalışmalarında kullanılan standart örnekler ile örneklerimize ait miktar tayinleri yapılarak Bd patojen fungusuna nicel veriler elde edilmiştir. Ranavirus alışmaları için ise elimizde standart eğri oluşturmak için miktarını bilinen pozitif DNA rnekleri olmadığı için çalışmada yalnızca FV-3 Ranavirusunun varlığı pozitif ya da negatif olarak değerlendirmeye alındı.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 *Pelophylax caralitanus* (Arıkan 1988)

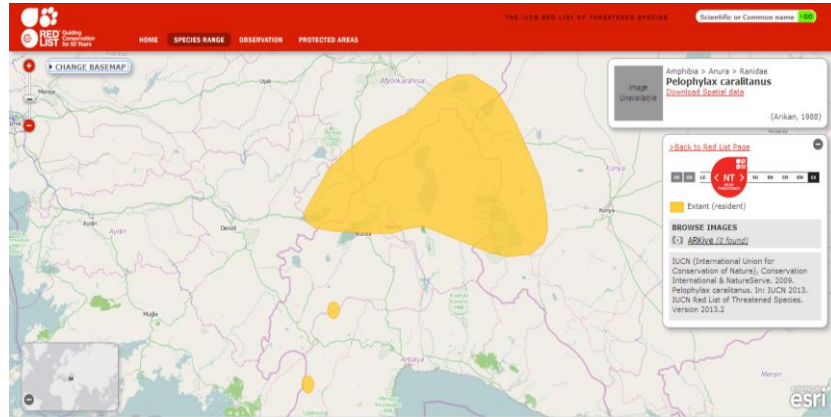
Ranidae (Gerçek Su Kurbağaları) familyasının temel özelliklerine baktığımızda; arka bacaklar uzun, diller ağız tabanına ön bölgeden bağlı, arka ucu serbest ve genellikle çatallıdır. Kulak zarı her zaman bulunur. Dünya genelinde dağılımı kozmopolit olup en çok Afrika ve Güney Asya da bulunurlar. Var olan dişler üst çenelerinde (Maksilla – Premaksilla) bulunur. Devamlı olarak suya bağımlı olan hayvanlardır (Budak ve Göçmen 2008). Bu familyaya ait olan Anadolu bataklık kurbağası (Arıkanın bataklık kurbağası) ya da Beyşehir Kurbağası olarak bilinen *Pelophylax caralitanus* güneybatı Anadolu daki göller bölgesine endemiktir. *P. Ridibundus* ve *P. Bedriagae* ile şakak bölgelerinde koyu kahve şerit olmamasından dolayı benzerlik gösterse de karın ve boyun bölgelerinde turuncu, sarı ve kırmızıya çalan desenlerin varlığı ile onlardan farklıdır. *P.caralitanus* ayrıca da *P. ridibundus* ve *P. Bedriagae*'dan daha iri bir vücut yapısına sahiptir. olarak karın kısmı ve boyunda turuncu, kırmızıya çalan ve bazen sarımsı renklenme gösteren lekeler bulunur ve diğerlerine göre nispeten daha iri boyutlara ulaşır. Sistematigi ile ilgili detaylar çizelge 2.1 de verilmiştir. Konya Ovasından Denizli'ye kadar olan bölgede yayılış gösterir. Beyşehir Gölü, Eğridir Gölü, Suğla Gölü, Çarşamba Deresi(Konya), Gölcük Gölü (Isparta), Hotamış Gölü, İvriz Gölü (Ereğli/Konya), Çardak ve Çivrilde(Denizli) Işıklı Gölünde kayıtları bulunmaktadır (İnt. Kyn. 1). *P.caralitanus*'a ait yayılım bilgileri batı 29,73 – doğu 31,95; kuzey 38,71 – güney 36,71 enlem ve boylamları arasında olduğu belirtilmiştir (İnt. Kyn. 1). Resim 2.1 da *P.caralitanus*'un ülkemizdeki yayılımını görsel olarak ifade etmektedir. *P.caralitanus*'un temel besin kaynağı böcekler [Insecta (Orthoptera, Coleoptera, hemiptera, Diptera)] ve Gastropoda 'lardır (Atatür *et al.* 1993).

Çizelge 2.1 *Pelophylax caralitanus* 'un taksonomik hiyerarşisi

Bilimsel Sınıflandırma

Kingdom (Alem)	Animalia	Hayvanlar
Phylum (Şube)	Chordata	Kordalılar
Subphylum (Alt Şube)	Vertebrata	Vertebralılar
Class (Sınıf)	Amphibia	Amfibiler
Order (Takım)	Anura	Kuyuksuz Kurbağalar
Family (Aile)	Ranidae	Su Kurbağaları
Genus (Cins)	Pelophylax	
Species (Tür)	<i>Pelophylax caralitanus</i> (Arıkan 1988)	Beyşehir Kurbağası

Kuruyan sulak alanlara bağlı olarak sucul habitatların yok olması türün azalış sebeplerinden en büyüğü olarak gösterilmektedir. İçme suyu ve tarımsal sulama faaliyetleri için kurulan barajlar doğal sulak alan habitatlarını bozduğu için türlerin beslenme barınma ve üreme alanlarını kısıtlayarak olumsuz olarak etkilemektedir. Bunun dışında *P. Caralitanus* Türkiye'de ki en büyük yenilebilir kurbağa türüdür, bu sebepten dolayı aşırı toplanarak Fransa, İtalya ve İsviçre gibi ülkelere ticareti yapılmaktadır. Bu ticari hareketlilik hem hayvan sayısında azalışa sebebiyet vermekte hem de ülkemizde daha önceden var olmayan hastalık yapıcı mikroorganizmaların ülkemize de yayılmasında büyük bir etken oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalardan *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) fungusu ve Ranavirusler (*Iridoviridae*) amfibiler üzerinde ölümcül hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler de tür azalış sebepleri arasında bu iki hastalık yapıcı mikroorganizmanın yer alması gerektiğini ortaya koymaktadır.



Resim 2.1 Endemik *P. Caralitanus* 'un yayılım haritası (İnt. Kyn. 1).

Pelophylax caralitanus ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda, ülkemizin tüm coğrafi bölümlerini kapsayan 31 popülasyondan alınan *P. Ridibundus* ve Isparta (Eğirdir) Gölünden alınan *P. Caralitanus* un kas protein bantları sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak karşılaştırılmıştır. *P. Ridibundus* grubunda 27 homolog protein bandı, diğer grup olan *P. Caralitanus* da ise 28 homolog protein bandı tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda *P. Caralitanus* grubunun *P. Ridibundus* grubundan farklı ve kendine özgü bir bantlaşmaya sahip olduğu görülmüştür. Çalışma sonucu olarak, Türkiye de ki *P. Ridibundus* ve *P. Caralitanus* türleri toplam iskelet kası protein bantlarına göre farklıdırlar (Bülbül ve Kutrup 2011).

Bir diğer çalışmada ise Türkiyede ki 6 familyadan 17 anura (Amphibia) türünün 12 tür monogenean, digenean, cestode, nematode, acanthocephalan parazitleri içeren helminthlerle infekte edildiği rapor edilmiştir. Bu 17 tür şunlardır, Bufonidae familyasından *Bufo bufo* (Linnaeus 1758), *Bufo verrucosissimus* (Pallas 1814), *Bufo (Pseudepidalea) viridis* (Laurenti 1768); Discoglossidae familyasından *Bombina bombina* (Linnaeus 1761); Hylidae familyasından *Hyla arborea* (Linnaeus 1758), *Hyla savignyi* Audoin, 1827; Pelobatidae familyasından *Pelobates fuscus* (Laurenti 1768), *Pelobates syriacus* (Boettger 1889); Pelodytidae familyasından *Pelodytes caucasicus* Boulenger (1896) ve Ranidae familyasından *Pelophylax bedriagae* (Camerano 1882), *Pelophylax ridibundus* (Pallas 1771) (önceden *Rana ridibunda*), *Pelophylax caralitanus* (Arikan, 1988), *Rana camerani* (Boulanger 1886), *Rana dalmatina* (Bonaparte 1838), *Rana holtzi* (Werner 1898), *Rana macrocnemis* (Boulanger 1885), *Rana tavasensis* (Baran ve Atatür 1986). Helminthler *P. caralitanus*, *P. bedriagae*, *P. fuscus*, *H. savignyi* ve *B.verrucosissimus* türlerinde tespit edilmemiştir. En ağır şekilde infekte olan konak *P.ridibundus* olarak tespit edilmiştir. *P.ridibundus* konağı saldırgan bir beslenicidir ayrıca değişik habitat ve beslenme şekillerine yüksek adaptivite sağlayabilen bir tür olarak bilinmesi bu parazit türler ile karşılaşma olasılığını arttırmaktadır. Kısıtlı dağılım ve limitli yiyecek seçeneklerine sahip olan konak türler çok az infeksiyon belirtisi göstermiştir (Omar 2012).

Erismiş ve Chinsamy (2010) çalışmalarında *P. caralitanus* metamorfoz safhasından on

yaşına kadar olan örneklerinde birey gelişim sürecindeki üçüncü phalanx epifizyal kırıldaklarındaki histolojik değişimi incelemiştir. *P. caralitanus*'un uzun yaşam süresi ile bu taksondaki epifizyal kırıldaktaki gelişim arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu ilişkinin zamana bağlı olarak epifizisin kondrosit farklılaşması ve olgunlaşması ile ilişkili olduğunu belirtilmiştir.

Akın (2011) doğu akdeniz su kurbağalarının filocoğrafik modelini belirlemek ve farklı jeolojik senaryolar kullanarak farklılaşma zamanlarını tahmin etmek için yaptıkları çalışmada farklılaşma zamanlarını, geçmiş jeolojik olaylar ve doğu akdeniz su kurbağalarının sistematüğini ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmayı yaparken genetik çeşitlilik ve uzaklığı hesaplamak için iki protein kodlayan mitokondrial (mt) genin (ND2 (1038 bp, 119 sequences) ve ND3 (340 bp, 612 sequences)) sekanslarını kullanmışlardır. Farklılaşma zamanları, doğu akdeniz için alternatif mümkün olabilecek 4 jeolojik temsili senaryo sunularak bir Bayesian sistemi ile tahmin edilmiş ve daha sonra da Bayesian faktörlerini ve eklenebilir jeolojik verileri kullanarak farklı senaryoları karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak farklılaşma tarihi tahminleri ana kara popülasyonlarından (Peloponnese, Anatolia) gelen Girit popülasyonları çoğunlukla Messiniyen tuzluluk krizinin (MSC) ilk zamanlarına benzediğini belirtirken, jeolojik delillere ve genetik farklılık tahminlerine bağlı olarak şu hipotezi ortaya çıkmıştır; Kıbrıs su kurbağaları MSC nin son zamanlarından beri Anadolu anakarasından izole olmuştur. Gözlemlenen farklılaşma en büyük Anadolu haplogruplarının (*P. ridibundus* grupları) bir zaman penceresi olduğu anlamına gelir. mtDNA sonuçlarına göre Anadolu su kurbağaları ve Kıbrıstakiler bazı tanımlanmamış türleri temsil ettiğini göstermiştir.

2.2 Işıklı Göl

Sulak alanlar sahip olduğu biyolojik çeşitlilikten dolayı doğal zenginlik müzeleri olarak kabul edilirler. Sulak alanların kullanım değerlerine bakıldığında içme suyu eldesi, tarımsal sulama, sazlık ve kerestecilik alanlarında, tuz üretimi, su ürünleri, otlatma alanları, ulaşım ve turizm olanakları sağlarlar. Bunların dışında yeraltı sularını besleyerek yada boşaltarak su dengesini düzenleme, fırtına ve sellerin etkisiyle oluşabilecek doğal afetlerin etkisini azaltma, iklim koşullarını düzenlerler, bazı zehirli

maddeleri tutarak suyun kalitesini iyileştirme, sediment ve besin depolama, biyolojik çeşitliliği barındırma gibi dolaylı yollardan ekonomiye büyük katkılarda bulunurlar. Sulak alanlar aslında kültürel mirasın bir parçası olması itibariyle de özel niteliklere sahiptir. Birçok yerde önemli yerel geleneklerin temelini oluştururlar. Sosyal aktivitelere olanak sağlarlar. Yaban hayatı, güzel manzarası ve peyzaj değerleriyle estetik esinlerin kaynağını oluştururlar (İnt. Kyn. 2).

Birçok ekolojik ve ticari değeri yüksek çeşitli bitki ve hayvan türüne ev sahipliği yapan sulak alanlar ayrıca nadir ve tehdit altındaki birçok bitki ve hayvan türü için de yaşam alanı sağlamaktadır. Avrupa Birliği Habitat Direktifinde yer alan korunması gereken türlerin %80'i Akdeniz'e aittir ve bunların büyük bir kısmı sulak alanlara bağımlı ve ilişkili türlerdir. Tüm Akdeniz'de yaşayan 50 amfibi türünden 27'si endemiktir. Yani sadece Akdeniz'e özgüdür. Sulak alanlarda çok fazla memeli görülmemesine karşın, sıcak ve kurak yaz aylarında sulak alanlar memeli hayvanlar için ideal sığınak yerleridir. Sulak alanlarda en fazla görülen bitki türleri sazlar, kamışlar, kofa otları, kındıralar, düğün çiçekleri, su naneleri, süsenler, su ayrıkları, ılgınlar, nilüferler, su fındıkları, şemsiye otları ve arpacancılardır. Sulak alanların en görkemli canlısı muhakkak ki kuşlardır. Değişik türlerden milyonlarca kuş üreme kışlama ya da göç esnasında Türkiye'deki sulak alanları kullanırlar. Batı Palearktık Bölge'deki dört önemli kuş göç yolundan ikisinin Türkiye üzerinden geçmesi, Türkiye'deki sulak alanları herhangi bir ülkedekinden daha önemli kılmaktadır. Birçok kuş, memeli, sürüngen ve amfibi türünün varlığını sürdürebilmesi Türkiye'deki sulak alanların korunmasına bağlıdır. Sulak alanların korunması balık, kabuklular, amfibiler ve diğer su ürünleri gibi ekonomik açıdan önemli canlılardan elde edilen verimin sürekliliği açısından da hayati önem taşır. Bu durum insanlığın geleceği için önemli olup, sulak alan ekosistemine ilişkin bilimsel, kültürel ya da eğlence-dinlendirme değerlerinden apayrı bir önem arz eder (İnt. Kyn. 2).

Işıklı Gölü, Denizli'nin Çivril ilçesi sınırları içerisinde bulunan, Akdağ'ın güneyinde yer alan bir göldür. Adını da Çivril ilçesine bağlı Işıklı bucağından alır. Çevresindeki bataklıklar ile birlikte 64.53 km² olan göl alanı kurak mevsimlerde oldukça azalır, gölün en fazla derinliği 7 m.'dir. 821 m rakıma sahiptir. Gölü Akçay, Işıklı kaynakları, göl tabanındaki yeraltı suları, Gökgöl ve Büyük Menderes Nehri'nin yukarı havzasındaki

iki büyük kolu ile beslemektedir. Işıklı Göl, önceden doğal bir göl iken 1968 yılında baraj gölü haline getirilmiştir. Işıklı Gölü'nün 3 km. batısında ve Büyük Menderes Nehri üzerinde yer alan yaklaşık 300 hektarlık bir göl ile çevresindeki sazlık ve bataklıklar ile birlikte yaklaşık 700 hektarlık olan Gököl Bataklığı da özel koruma alanı sınırları içerisine dahil edilmiştir. Işıklı Gölü'nün geçmişte Gököl ile bütünleşik bir sulak alan olduğu düşünülmekteydi. 1996'da Orman Bakanlığı buranın 'Yaban Hayatı Koruma Sahası' ilan edilmesi için girişimde bulunmuştur (Yağcı 2009, Gököl ve Işıklı Gölleri Yönetim Planı 2009).

2.2.1 Işıklı Göl Faunası

Işıklı Gölü, özellikle kış aylarında pek çok sayıda su kuşunu barındırır. Alanda üreyen gülen sumru, alacabalıkçıl ve bıyıklı sumru popülasyonlarıyla özel koruma alanı statüsü kazanmıştır. Göl, kış aylarında orada bulunan küçük karabatak, sakarca, Macar ördeği, elmabaş patka, pasbaş patka ve sakarmeke gibi su kuşları için çok önemlidir. Kış aylarında yapılan sayımlarda göl üzerinde bir seferde 190 binin üzerinde sakarmeke gözlenmiştir. Gölde üreyen diğer türler arasında bahri, kara boyunlu batağan, erguvani balıkçıl, çeltikçi ve karabaş martı sayılabilir. Işıklı Gölü'nde yaşayan akkuyluklu kartal göl yakınındaki Akdağ'da üremektedir. Işıklı Gölü, iç su balıkları için de önemlidir. Nesli küresel ölçekte tehlikede olan Türkiye endemiği balıklardan *Aphanius anatoliae* (Yosun Balığı) ve *Chondrostoma meandrense* (Karaburun Balığı) Işıklı Gölü'nde ürer. Bunların dışında sazan ve turna balığı oldukça yaygın olarak gölde mevcuttur. Cyprinidae familyasından olan *Phoxinellus zeregi meandri* (Ot balığı), (Ladiges 1960) nın da ilk görüldüğü göl Işıklı Gölü'dür. *Hemigrammocapoeta kemali* (Cüce Siraz balığı) (Hanko, 1924), *Orthrias angorae angorae* (Türkçe: Yok) (Steindachner, 1897) türleri de ışıklı Gölü'nde yer alan balık türleri arasındadır (Gököl ve Işıklı Gölleri Yönetim Planı 2009). Endemik Beyşehir Kurbağası olarak bilinen *Pelophylax caralitanus* da ışıklı gölünde bulunan ekonomik ve ekolojik değeri yüksek bir amfibi türüdür. Kerevit (*Astacus leptodactylus*) de ışıklı gölde bolca bulunan ve halkın önemli geçim kaynaklarından olan bir canlı iken bir mantar enfeksiyonu ile göldeki popülasyonu ortadan kalkmış durumdadır.

2.2.2 Işıklı Göl Florası

Işıklı Gölü'ndeki yüksek su seviyesinden dolayı, bataklık bitki örtüsü sadece Kufi Çayı'nın alüvyon depoladığı kuzey doğuda bulunur. Gölün ortasında birkaç saz adacığı vardır. Işıklı'nın doğu ve batı kıyılarında geniş kavaklıklar ve tarım alanları, güneyinde ise hububat ekiminin yapıldığı geniş bir ova yer alır. Bataklık bitki örtüsü, Gököl ve çevresinde daha yaygındır.

2.2.3 Alanda aktiviteler

Gölün güney kıyısında kalan arazilerde tarım ve kavakçılık yapılmaktadır. Göl çevresinde turizm amaçlı oteller bulunmaktadır. Balıkçılık, Işıklı bucağı ve çevre köylerdeki halk için önemli bir geçim kaynağı oluşturmaktadır. Gölde balıkçılar yılda 70 ton civarında balık tutmaktadır. Kerevit (*Astacus leptodactylus*) bir zamanlar göldeki en yaygın ve en çok gelir getiren türken, 1980'lerde, Türkiye'de ilk kez bu gölde ortaya çıkmış olan mantar hastalığı nedeniyle tümüyle yok olmuştur.

2.2.4 Başlıca tehdit ve sorunlar

Işıklı Gölü, geçmişte alanı 10.000 km²'ye yakındı. 1930 yıllarında çevredeki tarım alanlarının sulanmasına başlanmış, 1960'larda ise 2.000 km²'ye yakın bataklık tarım arazisi elde edilmesi amaçlı kurutulmuştur. Gölün bir baraj gölüne çevrilmesi işlemi 1949'da başlamış, 1968'de günümüzdeki regülatör ve seddeleme sistemi tamamlanmıştır. Bugün, göl Devlet Su İşleri tarafından Işıklı Barajı olarak adlandırılmaktadır. Büyük Menderes'in kuzeyden geçen kolu göle yönlendirilmiştir. Kufi adı verilen bu kol bugün göle giren suyun % 60'ını karşılamaktadır. Kış ve ilkbahar aylarında dolan göl toplam 72.300 km² tarım arazisinin sulanmasında kullanılmaktadır. Su seviyesi, Haziran ayına kadar çok yüksek kalmakta, bu tarihten sonra sulama amaçlı kanal kapakları açıldığı için su seviyesi azalmaya başlamaktadır. Su seviyesinin bahar ayları boyunca bu kadar yüksek kalması, kuşlar için uygun üreme ortamları oluşturan sazlık ve bataklıkların oluşmasını engellemektedir. Sular, Ağustos

ve Eylül aylarında iyice çekilmekte ve ancak bu dönemde alanın % 70 kadarı sucul bitki örtüsü ile kaplanmaktadır. Işıklı Göl'de balıkçılık etkinlikleri büyük ölçüde kontrolsüz yapılmaktadır. Gölde kış boyunca çok sayıda avcı gece ya da gündüz izinsiz olarak avlanmaktadır (İnt. Kyn. 2).

2.2.5 Gölün Genel Jeomorfolojik Özellikler

Çivril ovası ve çevresinde yer alan yüksek dağların nisbi yüksekliklerinin fazlalığından dolayı dağlar ile Işıklı gölüne birleşen akarsu vadileri arasında oluşan eğim farkından dolayı dağların yamaçlarında döküntü malzemesinin birikintileri koniler biçiminde oluşmuştur. Konik biçimli bu birikintiler Bulkaz ve Akdağ'ın batı yamaçlarında yaygın bir şekilde gözlenmektedir. Bu oluşumlar IV. zamana ait olup, eğimleri oldukça fazladır (20 ° - 30°). Akdağ'ın batı ve güneybatı yamaçlarına kurulmuş olan yerleşim yerleri (köyler), bu birikinti konilerinin ön bölümünde kurulmuştur. Yuvaköy ve çevresinde taşkın yataklarının yoğunluğu göze çarpar. Akdağ'ın batı yamaçlarından kaynağını alan derelerin Yuvaköy çevresinde mevsimsel olarak taşkınlara neden olduğu anlaşılmaktadır. Bu alanlar çevresinde büyük boylu meşe ağaçlarının Neojen formasyonlar üzerinde birlik oluşturduğu görülmektedir (Gökgöl Ve Işıklı Gölleri Yönetim Planı 2009).

2.3. Chytridiomycosis ve *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore, Pessier ve Nichols 1999)

Chytridiomycosis, hızla yayılmakta olan bulaşıcı bir amfibi hastalığıdır (Daszak et al . 2000), küresel olarak amfibilerde kitlesel ölümlere ve azalışa neden olmaktadır (Berger et al. 1998, Bosch et al. 2001, Rachowicz et al. 2006). Chytridiomycosis hastalığına sebep olan ise konak spesifitesi düşük, non-hifal zoosporik patojen bir fungus olan *Batrachochytrium dendrobatidis* türüdür (Daszak et al. 2003). Amfibilerin azalış kalıbı ve genetik çalışmalar chytrid fungusun orta Amerika ve Avustralya'da doğal popülasyonlara bulaştığını desteklemiştir (Daszak et al. 1999, Daszak et al. 2003; Morehouse et al. 2003). Goka et al. (2009) çalışmasında “yeni patojen hipotezi” ve “endemik patojen hipotezi”nin bir kombinasyonu olarak hastalığın mevcut yaygınlığını

açıklamıştır.

Chytridiomycosis, cildin sürekli olarak *B. Dendrobatidis* (Bd) tarafından infekte edilmesine dayalı bir hastalıktır. Chytridiomycosis'in yeniden oluşmasıyla, var olan Bd'lerin yaşam sikluslarını devam ettirmeleriyle, su ile taşınan zoosporlar vasıtasıyla, anura larvalarının ağız parçalarının parazite olmasıyla ve amfibilerin post metamorfik safhada enfeksiyona maruz kalmasıyla oluşur. Larvalarda enfeksiyon sadece ağız kısımdaki keratinleşmiş dokularda tespit edilir ancak bazı durumlarda larvaların kuyruk kısımlarında da oluştuğu bildirilmiştir (Brodman ve Briggler 2008, Kriger ve Hero 2007, Berger *et al.* 1998, Longcore *et al.* 1999, Marantelli *et al.* 2004). Bd enfeksiyonları patofizyolojik değişimlere sebep olur ve bu değişimler ya hastalık durumuna öncülük eder ya da potansiyel olarak ölümlü sonuçlanır. Chytridiomycosis oluştuğunda, amfibi epidermisi içerisinde elektrolit taşınımı %50 ye kadar engellenir, sodyum ve potasyumun hücre sitoplazmasındaki konsantrasyonu düşer ve asistolik kalp durması ölüme sebep olabilir. Çünkü sağlam deri amfibi iç dengesinin korunmasında önemli bir faktördür, deri fonksiyonunu bozan madde ya da maddelerin, doğrudan Bd'nin salgı ürünlerinin mekanizması olduğu düşünülmektedir (Voyles *et al.* 2007).

Bd sulak alanlarda, nemli topraklarda ve kuş tüyleri üzerinde hayatta kalabilir ve büyüme gösterebilir. Bu bilgiler de bir diğer yayılım sebebinin göçmen kuşlar ve toprak taşınımı vasıtasıyla olabileceğini göstermiştir (Jhonson ve Speare 2005).

2.3.1 *Batrachochytrium dendrobatidis*'in Familyası (Aile)

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) Chytridiomycota filumuna (şube), Chytridiomycetes clasisine (sınıf), Chytridiales ordosuna (takım) aittir (Hyatt *et al.* 2007). Bilimsel sınıflandırması ayrıca çizelge 2.2 da gösterilmiştir. Chytridiomycota filumunun üyeleri kozmopolit olarak yayılış gösteren heterotrofik funguslardır (Sparrow 1960, Karling 1977). Doğada başlıca bulunma alanları toprak ve sulardır, organizmalar üzerinde genellikle dış yüzeyleri kullanarak (kitin, keratin ve bitki tortuları) saprofit olarak davranırlar. Bazı cinsler fakültatif ya da obligat anaeroblardır ve birçoğu mantarların, alglerin, tohumlu bitkilerin, rotiferlerin, nematodların ya da böceklerin

obligat parazitleridir. Burada bildirilen *Batrachochytrium dendrobatidis* Chytridiomycota filumunun omurgalılarda parazit olarak kabul edilen ilk üyesidir (Barr 1990). Sonzamanlarda tanımlanan ikinci tür ise *B. Salamandrivorans* dır. Bu tür semenderlerde Chytridiomycosis hastalığına sebep olarak ölümlere yol açmaktadır (Martel *et al.* 2013).

B. dendrobatidis Sucul Hayvan Sağlığı Standartları Komisyonu (OIE) tarafından amfibi hastalıkları grubundaki özel öneme sahip 2 patojenden biri olarak kabul edilmiştir (Diğeri ise *Iridoviridae* familyasının Ranavirus cinsidir) (OIE, 2006).

Çizelge 2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* Hiyerarşik Sınıflandırması

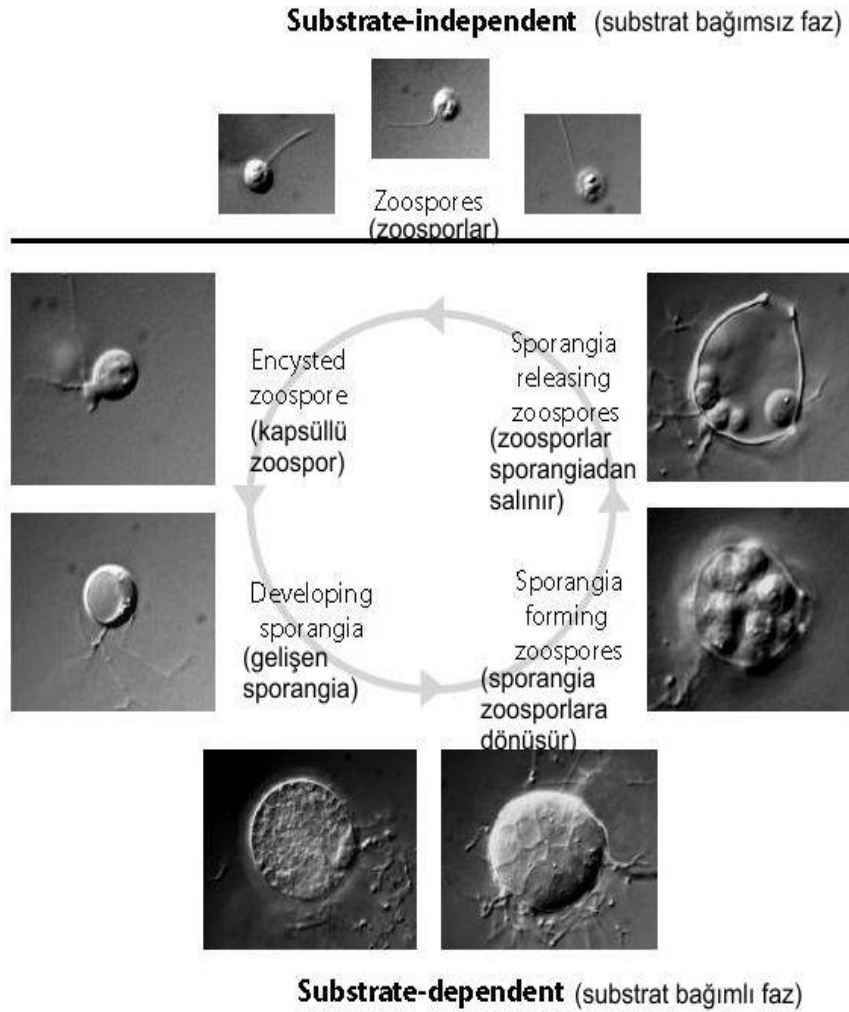
BİLİMSEL SINIFLANDIRMA	
Kingdom (Alem)	Fungi
Filum (Şube)	Chytridiomycota
Class (Sınıf)	Chytridiomycetes
Order (Takım)	Chytridiales, Rhizophydiales
Genus (Cins)	<i>Batrachochytrium</i>
Species (Tür)	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>

2.3.2 *Batrachochytrium dendrobatidis*'in Yaşam Döngüsü

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)'in yaşam döngüsü 2 ana evreden oluşur, ilki hareketli safha olarak adlandırılır bu safhada zoospor su ile taşınabilir ve yeni konaklara ulaşabilir zoospor bu evrede oldukça kısa ömürlüdür, diğer safha ise zoosporangium (sporangium olarak da bilinir) içinde çoğalıp gelişebildiği durağan evredir. Bu evrede monosentrik olan tallus eşeysiz çoğalma için bir zoosporangium içinde bulunur. Bd konakta katlanmış deri epiteline gömülerek uyum sağlar ve talli epidermis hücresi içinde yaşar, ilk olarak parazitlik etkisi birkaç tabaka derinliktedir ve gelişme hızı hücrenin gelişim hızı ile çakışır ve konak canlı için büyük risk oluşturmaz. Bd ilk olarak canlı hücreler içinde gelişir ama talli zoosporangia olarak Bd lerin gelişimini ölü, yüzeysel ve keratinize olmuş hücrelerde tamamlar. Zoosporangia yüzeyinde ve vücudun distal kısmında açılan bir boşaltım kapağı ile zoosporlar çevreye yayılırlar. Yetişkin ve iribaş formdaki amfibilerde sporangia dağılımı, Bd'nin parazitlik faaliyetlerine başladığında tabakalanmış ve keratinize epidermise ihtiyaç duymakta olduğunu göstermiştir (Berger *et al.* 1998). Ancak genç sporangialar daha derinlerdeki prekeratin

içeren hücreler içinde gelişebilirler. Kültür ortamında ve derideki yaşam siklusu aynı evreleri gösterir, in vitro ortamdaki yaşam siklusu 22 °C de 4 ile 5 gün sürmektedir. Dirençli dinlenme fazında olan sporlar bulunmamıştır yani Bd 'in sporlarının dinlenme (uyku) fazı yoktur (Berger *et al.* 2005b).

25 °C üzerinde epidermal devir oranı artarken Bd büyüme hızı yavaşlar (Piotrowski *et al.* 2004), böylelikle sıcaklık artışında enfeksiyon kaybolur (Berger *et al.* 2004, McDonald *et al.* 2005). Bd çeşitli sıcaklık ve yağış rejimi gibi geniş aralıktaki çevre koşullarında yaşayabildiği gösterilmiştir (Ron, 2003). Bd'nin laboratuvar ortamında ki optimum gelişme sıcaklığı 17-25 °C dir, 28 °C de organizma gelişimi durur ve 29 °C de bir hafta içinde ölür (Longcore *et al.* 1999, Piotrowski *et al.* 2004).



Şekil 2.1 *Batrachochytrium dendrobatidis*'in yaşam döngüsüne dair bir figür. Bd nin yaşam

döngüsünün substrat bağımsız safhasında, fagellalı zoosporlar hareketli ve serbest halde yaşarlar. Substrat bağımlı safhada ise zoosporlar kapsüllüdür ve sporangia içinde gelişirler (Rosenblum 2008).

2.3.3 Kökeni

B. dendrobatidis, yeni ve gelişmekte olan bir patojen (yeni patojen hipotezine (NPH) göre ya da yayılım gösteren patojen hipotezine göre) midir yoksa amfibilerin endemik ortakçıları mıdır? Bu, patojen konak dinamiğinde çevresel değişikliklerin etkisi ile daha da öldürücü olmuştur (endemic pathogen hypothesis –EPH-; Fisher *et al.* 2009).

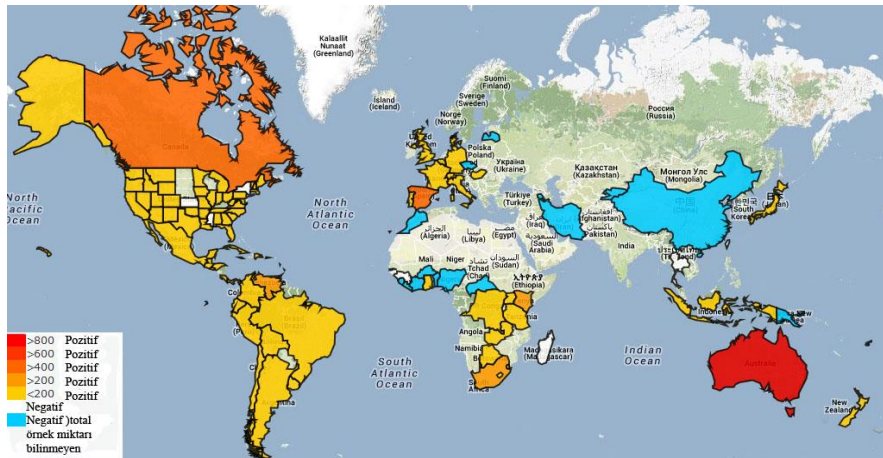
NPH *B. Dendrobatidis*'in parçalı dağılımlar üzerindeki gözlemler ile desteklenmiştir. Bu salgının giriş yönleri (cepheleri) Avustralya, Orta ve Güney Amerika'da tanımlanmıştır (Laurance *et al.* 1996, Berger *et al.* 1998, Lips *et al.* 2006, 2008) ve bu enfekte olmuş vektör amfibilerin doğal çevresinde olduğu kadar amfibi ticaretinde de tespit edilmiştir (Fisher ve Garner 2007, Cunningham *et al.* 2005, Garner *et al.* 2006, Walker *et al.* 2008). EPH, *B. Dendrobatidis*'in küresel amfibi popülasyonları içinde onyıllar öncesinde azalışın başlangıcını gösteren kanıtlarla desteklenmiştir (Ouellet *et al.* 2005, Weldon *et al.* 2004). *B. Dendrobatidis*'in sebep olduğu chytridiomycosis'in oluşması ile çevresel farklılıklar ve küresel ısınma arasında ölçülebilir bağların olduğu belirtilmiştir (Bosch *et al.* 2007, Pounds *et al.* 2006, Reading 2007).

Yayılmanın 2 atasal merkezi olduğu önerilmiştir: Afrika dışına *Xenopus* cinsinin ticareti (Weldon *et al.* 2004) ve Amerika dışında Kuzey Amerikan Bullfrog (*Lithobates catesbeianus* / *Rana catesbeiana*) ticareti yapılması (Fisher ve Garner 2007, Garner *et al.* 2006, Weldon *et al.* 2004). Bu fungusun en eskiye dayanan varlığının tespiti Afrika'daki 697 *Xenopus* türünün incelenmesiyle *Xenopus laevis*'te yapılmıştır. Böylelikle de *B. Dendrobatidis*'in Afrika orjinli olduğu hipotezini de destekleyen epidemiyolojik kanıtlar bulunmuş oldu. Ayrıca bu çalışma ile birlikte Afrika dışında tespit edilen ilk hastalık bulgusundan 23 yıl önce *B. Dendrobatidis*'nin Afrika da var olduğu da ortaya konulmuştur (Weldon *et al.* 2004). Tüm kanıtlar incelendiğinde, durum şunu göstermekteydi *B. Dendrobatidis*'in güncel dağılımı bilinen ve bilinmeyen hareketi nedeniyledir, 20. yüzyılın ilk yarısında vektörlerin popülasyon kaynağı henüz tanımlanamamıştır (Fisher *et al.* 2009).

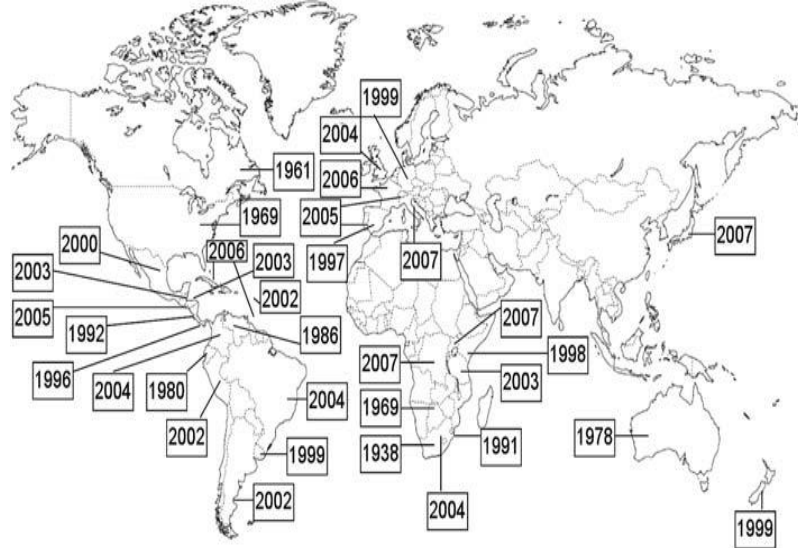
Morgan ve ark. (2007) de Sierra, Nevada'da amfibi azalıkları üzerine yaptıkları bir araştırmada NPH tezini destekler sonuçlar buldular, bu sonuçlar; düşük çeşitlilik, amfibi konak özgülüğü olmaması, fungal genotip ve coğrafya ile düşük korelasyon, tek bir fungal genotip ile yerli kurbağanın yok olması ve insan destekli fungus göçünün kanıtları. Ayrıca endemizm desteğinde (EPH), onlar yerel ölçekte popülasyonların yeniden birleşmesinde bazı farklılıklar bulundu. Bu nedenle ne hastalık salgınının ne de endemizmin amfibi azalıklarını tek başına açıklayamayacağını belirtildi. Gokka *et al.* (2009) da şunu belirttiler, Walker *et al.* (2010) tarafından desteklenen “yeni patojen hipotezi” ve “endemik patojen hipotezi” arasındaki bir kombinasyon mevcut salgın durumunu açıklar. NPH *B. Dendrobatidis*'in İberya'da ortaya çıkmasıyla tutarlıdır. Bununla birlikte hastalık grişinin popülasyon düzeyindeki sonuçları EPH benzeri süreçler ile açıklanmıştır. Bulgular göstermektedir ki NPH benzeri süreçlerin ifade olması (*B. Dendrobatidis*'in İberya biyomlarına girişi) onun EPH benzeri çevresel şartlarına bağlıdır (Chytridiomycosisin oluşması). Öyleyse *B. dendrobatidis*, görülmesi çevresel şartlara bağlı olan yeni bir patojendir.

2.3.4 Bd'nin Küresel Dağılımı

Dünya genelindeki yayılım haritası ve yıllara bağlı yapılan çalışmalarda tespit edilen ülkeleri gösteren haritalar resim 2.2 ve resim 2.3 de gösterilmektedir.

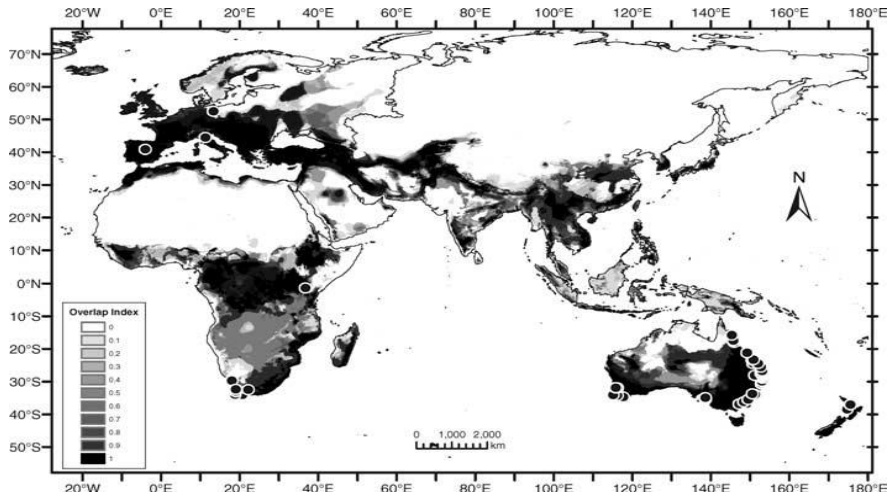


Resim 2.2 *Batrachochytrium dendrobatidis* 'e ait Dünya genelindeki yayılım haritası (İnt. Kyn. 3).



Resim 2.3 *Batrachochytrium dendrobatidis* patojenin yıllara bağlı olarak global dağılım haritası (Kriger 2009).

Haritalarda pozitif sonuç bulunan ülkelerin enlemleri, boylamları ve iklimsel özellikleri dikkate dikkate alındığında ülkemizin de risk altında olduğu görülmektedir. Bd ile yapılan çalışmalarda iklim değişikliğinin (sıcaklık, rüzgarlar, nem ve yağış oranları gibi) etkisi ile hızla yayıldığı tespit edilmiş olup, muhtemel risk taşıyan bölgeler, ekolojik nişleri haritalandırılmıştır (Resim 2.4).



Resim 2.4 *B.dendrobatidis* için öngörülen temel ekolojik niş haritası. Koyu bölgeler *B.dendrobatidis* ekolojik niş alanı için uygun olan bölgeler (Santiago R. Ron 2005; Kriger 2009).

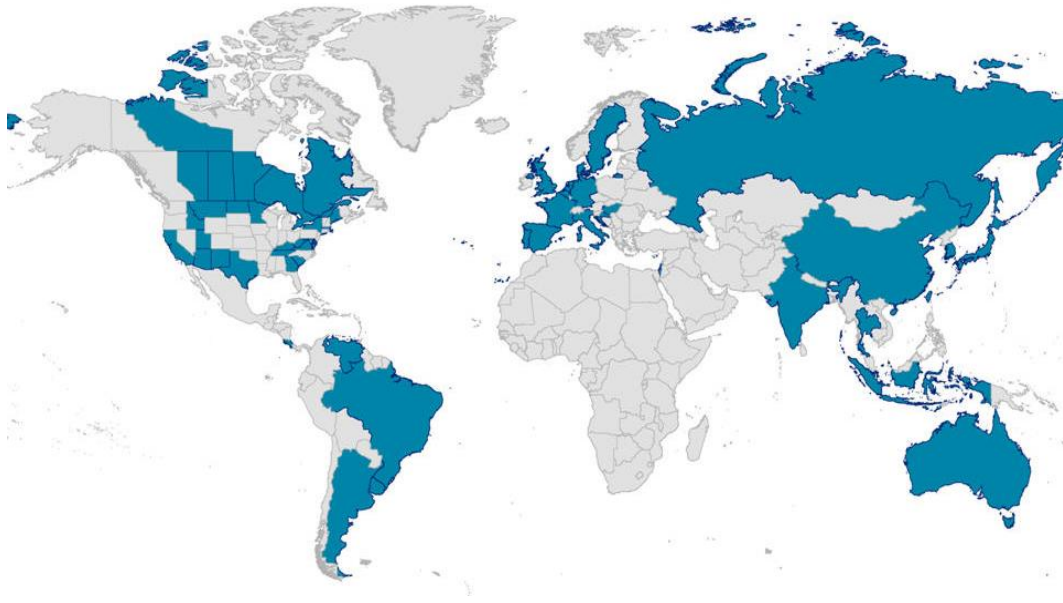
2.4 Ranavirus (*Iridoviridae*)

Ranavirüs Iridoviridae familyasındaki 5 genustan biridir (Jancovich *et al.* 2011). Ranavirüsler geniş ikozohedral yapılu virüslerdir ve soğukkanlı hayvanları infekte ederler (Williams *et al.* 2005). Ranavirüsler balık, amfibi ve sürüngenlerin doğal ve kültürel popülasyonlarını infekte eden patojenler olup ekonomik ve ekolojik olarak önem taşırlar (Chinchar 2002, Chinchar *et al.* 2009). Bilinen verilere göre farklı ranavirüs izolatları Amerika, Avustralya, Avrupa ve Asya'da ki konak türlerden izole edilmiştirler (Williams *et al.* 2005). Ek olarak küresel amfibi popülasyonlarının azalışından sorumlu olarak ve balık ölümlerine sebep olan bir patojen olarak geniş ölçüde rapor edilmiştir ve kırmızı bacak 'red-leg' hastalığından sorumlu patojenlerdir. (Chinchar 2002). Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu (OIE), ranavirüslerden biri olan Epizootic Hematopoietik Nekrozis Virüsü (EHNV) bir balık patojeni olarak tanımlanmış ve kurbağalar için de tüm ranavirüs enfeksiyonlarını listelemiştir (OIE 2011). Ranavirüsler balık ve amfibilerin geniş varyetelerinde hücre ölümlerine sebep olur, tüm hayvanlarda patojenite viral izolata, konağın yaşına ve coğrafik durumuna bağlıdır (Chinchar *et al.* 2005). Ranavirüslerin bazıları konağa özgü olsa bile bazı izolatlar hem balıklarda hemde amfibilerde görülebilir (Moody ve Owens 1994, Mao *et al.* 1999a). Ranavirüsler konak hayvanda sistematik nekrotizan enfeksiyona sebep olur ama subklinik ve kalıcı enfeksiyonlar belirli koşullar altında görülebilir (Whittington ve Reddacliff 1995, Whittington *et al.* 2010). Kurbağlarda ranavirüse karşılık bazı immün cevapların var olduğu yayınlanmıştır. Balıklardaki immün cevap ise tam olarak bilinmemektedir (Gantress *et al.* 2003, Maniero *et al.* 2006, Morales ve Robert 2007, Morales *et al.* 2010).

Ranavirüslerin genomu tek ve doğrusal olup çift iplikli DNA (dsDNA) yapısındadır, bu molekül yüksek derecede metillenmiştir ve terminal UA (urasil,adenin) fazlılıkları içerir (Chinchar 2002, Jancovich *et al.* 2011). Günümüzde 7 farklı ranavirüs türünün tüm genom sekansı tanımlanmıştır (He *et al.* 2002, Jancovich *et al.* 2003, Song *et al.* 2004, Tan *et al.* 2004, Tsai *et al.* 2005, Huang *et al.* 2009, Jancovich *et al.* 2010). En çok çalışılan ranavirüs geni major capsid protein (MCP) genidir ve benzer ranavirüs izolatlarının gen sekansları genel kullanıma açıktır. MCP sekansları PCR yöntemi ile

ranavirüslerin filogenisi, evrimi (gelişimi) ve bu virüs gruplarının tespitinde kullanılır (Mao *et al.* 1996, Mao *et al.* 1997, Tidona *et al.* 1998, Hyatt *et al.* 2000, Marsh *et al.* 2002).

Dünyanın birçok bölgesinde dağılışı gösteren ranavirüslere ait küresel dağılım haritası resim 2.5 de verilmiştir. (*Pelophylax sp.* (Hırvatistan), *Rana temporaria* ve *Bufo Bufo* (İngiltere), *Alytesobstetricans Ichthyosaura alpestris* (İspanya), *Lithobates catesbeianus* (Fransa –İtalya- Almanya- Yunanistan- Belçika))



Resim 2.5 Küresel Ranavirus dağılım haritası. (İnt. Kyn. 4).

2.4.1 Ranavirüs Genusu:

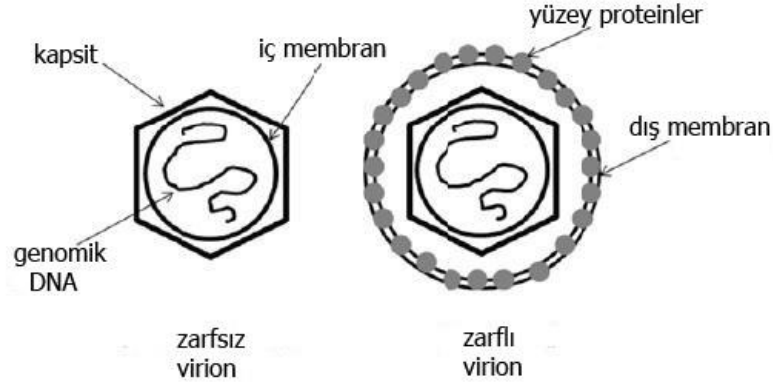
Iridoviridae familyası Ranavirüsler ile birlikte şu 4 genusu da barındırır: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* ve *Megalocytivirus* (Jancovich *et al.* 2001). Ranavirüsün 6 resmi türü vardır; *Ambystoma tigrinum virüs* (ATV) , *Bohle iridovirüs* (BIV), *Epizootic haematopoietic necrosis virüs* (EHNV), *European catfish virüs* (ECV), *Frog virüs 3* (FV-3) ve *Santee-Cooper ranavirüs* (SCRV) uluslar arası virüs taksonomi topluluğu (ICTV) tarafından türler içinde de izolatlar tanımlanmıştır (Çizelge2.3). Ek olarak geçici türler henüz ICTV tarafından ranavirüs taksonomisine kabul edilmemiştir (Jancovich *et al.* 2011).

Çizelge 2.3 Ranavirus cinsine ait türler ve izolatlar (Jancovich *et al.* 2011).

Türler	İzolatlar
<i>Ambystoma tigrinum virus</i>	Ambystoma tigrinum virus (ATV) Regina ranavirus
<i>Bohle iridovirus</i>	Bohle iridovirus (BIV)
<i>Epizootic haematopoietic necrosis virus</i>	Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)
<i>European catfish virus</i>	European catfish virus (ECV) European sheatfish virus (ESV)
<i>Frog virus 3</i>	Frog virus 3 (FV3) Tiger frog virus (TFV)
<i>Santee-Cooper ranavirus</i>	Santee-Cooper ranavirus (SCRV) Largemouth bass virus (LMBV)
Durumu Belirsiz (geçici) Türler	
Rana esculenta iridovirus (REIR)	
Singapore grouper iridovirus (SGIV)	
Grouper iridovirus (GIV)	
Testudo iridovirus (ThIV)	
Rana catesbeiana virus-Z (RCV-Z)	

2.4.2 Virion yapısı ve sitopatolojisi:

Iridoviridae familyasının üyeleri büyük çift iplikli DNA virüsleridir. Virionlar genellikle 120-200 nm çapındadır ve ikozohedral simetri gösterirler (Chinchar 2002). Virionun çekirdeği, tanımlayıcı kapsomerin bir kapsid bileşiği ve transmembran proteinler içeren lipit bir zar tarafından sarılan nükleoprotein filament içerir (Jancovich *et al.* 2011) (Şekil 2.2). Virionlar konak hücre membranını kullanarak (tomurcuklandırarak) bir zara sahip olabilirler ve zarflı virionlar yüksek seviyede spesifik enfeksiyona sahip olmasına rağmen hem zarflı hemde zarfsız virionların her ikisinde enfeksiyoneldir (Braunwald 1979).



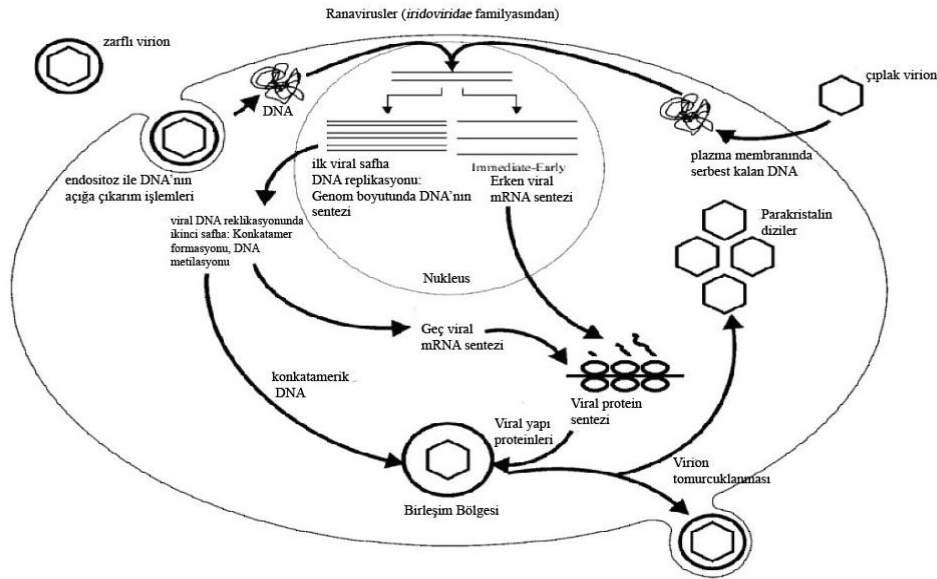
Şekil 2.2 Zarflı ve zarfsız ranavirüs virionlarının yapısı (Holopainen 2012).

Sürüngenler, balıklar ve amfibilere ek olarak ranavirüsler *in vitro* ortamda balık, kurbağa ve memeli hücrelerini içeren omurgalı hücrelerinde geniş bir varyete de infeksiyon yeteneği gösterebilir (Jancovich *et al.* 2011). Virüs bilinmeyen reseptörleri vasıtasıyla hücre ortamına iki rotadan biriyle girer. Virüs ya endositosiz ile konak hücreye girer ya da sadece genomunu hücre içerisine aktararak girer (Şekil 2.3) (Chinchar 2002). Zarfsız girişten sonra DNA nükleusa aktarılır ve burada immediate early (IE) ve delayed early (DE) viral transkripler hücresel RNA pol II tarafından sentezlenir (Goorha *et al.* 1978, Goorha 1981). Viral DNA polimeraz viral DNA sentezini çekirdek içerisinde katalizler (Goorha 1982, Chinchar 2002). Viral DNA replikasyonun 2.fazı sitoplazmada gerçekleşir. Yeni sentezlenen DNA sitoplazmaya taşınır ve on genomdan daha büyük boyutta konkatamerik eşit parçalı yapılara rekombine edilir yani tekrar birleştirilir (Goorha 1982). Geç viral mRNA transkripsiyonu ya sitoplazmada olur ya da viral toplanma bölgelerinde olur ve diğer DNA virüsleri ile birlikte tüm geç gen ekspresyonu viral DNA sentezine ihtiyaç duyar (Chinchar 2002). Translayon sonrası üretimi ne geniş ölçüde glikozilasyon ne de sülfatilizasyon ya da tespit edilen ranavirüs öncül proteinlerinden ayrılma gerektirir (Chinchar *et al.* 2005).

Ranavirüs DNA'sında ki CpG gen adacıklarında yüksek seviyede metillenmiş "C" belirlendi (Willis ve Granoff 1980, Eaton *et al.*1991). Viral DNA sitoplazmada virüs tarafından kodlanan sitozin DNA metil transferaz enzimi ile metilenir (Willis *et al.* 1984). Bu metilasyonun, viral DNA 'yı virüs tarafından kodlanan endonükleazlardan

koruduğu iddia edilmektedir (Goorha *et al.* 1984). Diğer bir yandan ranavirüslerinden biri olan *Singapore grouper iridovis* (SGIV) DNA metil transferaz enzimidenden yoksundur (Song *et al.* 2004) ve bu durum viral DNA metilasyonunun başka bir rolü olduğunu göstermiştir. Metillenmemiş CpG adaları içeren bakteriyal DNA, doğuştan gelen bağışıklık akabinde reseptör 9 (TLR9) aracı gibi çalıştığı görülmüştür (Bauer *et al.* 2001). Buda şunu göstermektedir ki ranavirüsler kendi genomlarına konak immun sistemini indirmek için metilleyebilirler (Williams *et al.* 2005).

Diğer yolda ise virionun hücreye girişi viral proteinlerin giriş bölgelerine bağlanmasıyla olur ve konkatamerik viral DNA bazı mekanizmalar ile virionlar içinde paketlenir. Böylelikle halkasal permute jenerasyonlar ve terminal yedek genom oluşur (Chinchar 2002). Virionlar hücreden doğrudan plazma membranından geçerler ve zarf parçalarıyla ya da sitoplazma içinde geniş parakristalin dizileri şeklinde depolanarak tomurcuklanma şeklinde çıkarlar (Chinchar 2002). Ranavirüslerin replikasyon döngüsü aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 2.3 ranavirüslerin replikasyon döngüsünün özeti (Chinchar 2002).

FV-3 12 ile 32°C arasında replike olur ve 55°C'den daha yüksek sıcaklıklarda 30 dak. Kaldığında ya da UV İridasyonuna maruz kaldığında inaktive olur (Chinchar 2002, Jancovich *et al.* 2011). Ranavirüsler 1 yıl boyunca +4°C ya da -70°C'de saklandıklarında infektivitelerini korumuşlardır (Bailey 2007). Bazı ranavirüsler

kurumaya hassas iken BIV 42°C’de 6 haftalık kurutma işleminden sonra infektivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Jancovich *et al.* 2011). Hücre kültüründe ranavirüslerin replikasyonu hızlıdır. Viral makromoleküller sentezleri ve sitopatik etkileri (CPE) infeksiyondan sonraki birkaç saat içinde tespit edilebilir (Goorha ve Granoff 1974). Konak hücrelerinde ise ranavirüs infeksiyonu konak hücrelerinin DNA, RNA ve protein sentezini hızlı bir şekilde inhibe eder, hücre yapısının tekrar düzenlenmesine neden olur (Murti *et al.* 1985, Willis *et al.* 1985, Chinchar 2002). Ranavirüsler konak hücrelerinde apoptozisin karakteristik septomlarına da neden olduğu gösterilmiştir. Örneğin kromatik yoğunlaşma ve DNA parçalanması ile apoptoze sebep olmaktadır (Zhang *et al.* 2001, Essbaver- Ahne 2002, Chinchar *et al.* 2003). Viral gen ekspresyonu apoptozis tetiklenmesinde gerekli değildir ama bunun programlanmış hücre ölümünde virion proteinleri tarafından doğrudan ya da dolaylı ilişkisi olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (Chinchar 2003).

Konak içerisinde ranavirüsler hematopoetik dokuları ve diğer organları infekte eder. Örneğin; böbrek, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem gibi kanamaların yanı sıra bölgesel ya da genel nekrozise sebep olur (Reddacliff ve Whittington 1996, Williams *et al.* 2005). Ek septomlar olarak kanamalar, deride kararmalar, düzensiz yüzmeye, iştahsızlık, ilgisizlik ve ataksi gibi rahatsızlıklar görülebilir (Langdon 1989, Ogawa *et al.* 1990, Williams *et al.* 2005). Balık infeksiyonunda viral parçacıklar iç organların endotelial, epitelial ve beyaz kan hücrelerinin sitoplazmasında tespit edilebilir (Ahne *et al.* 1997).

2.4.3 Ranavirüslerin genomik özellikleri

Ranavirüs genomu tek, doğrusal, çift zincirli bir DNA molekülüdür. Tüm geneom sekansı 7 ranavirüs izolatıyla neredeyse tamamlanmıştır. Bu izolatlar FV-3 (Tan *et al.* 2004), EHNV (Jancovich *et al.* 2010), ATV (Jancovich *et al.* 2003), Tiger Frog Virüs TFV (He *et al.* 2002), Soff-Shelled Turtle Iridovirus STIV (Huang *et al.* 2009), Grouper Iridovirus GIV (Tsai *et al.* 2005) ve Singapore grouper Iridovirus SGIV (Song *et al.* 2004), EHNV, SGIV ve GIV orijinal olarak balıktan izole edilmiştir. FV3, ATV ve TFV amfibilerden, STIV ise reptille orjinlidir.

Bu izolatların genom uzunluğu 105-140 kbp arasında değişim göstermektedir. GC içeriği %48-55 ve potansiyel açık okuma uçlarının sayısı (ORF) 92-139 arasındadır. İzolatların ORF'leri 32 den 1300 aminoasit uzunluğuna kadar değişmektedir ve DNA replikasyonunda, tamirinde, transkripsiyonunda nükleotit metabolizmasında, virion yapısında, virüs konak etkileşimlerinde görev alan proteinleri kodlarlar. Ranavirüs protein örnekleri ve tahmin edilen fonksiyonları çizelge 2.4 de gösterilmektedir. Genomların tümü tekrarlayan sekanslar içerir. Bu sekansların gen regülasyonunda, transkripsiyonunda ve virüslerin protein fonksiyonlarında rol aldığı düşünülmektedir (Kashi ve King 2006). Ek olarak kodlanmayan RNA'lar örneğin mikro RNA'lar (miRNAs) STIV genomunda tanımlanmıştır (Huang *et al.* 2009). Memeli virüslerinde miRNA'lar konak immüyon sistemi cevabı, apoptozis viral yaşam döngüsünü ve gen ekspresyonu düzenlenmesi tarafından oluşturulan infeksiyonda rol oynar (Nair ve Zaulan 2006, Cullen 2007).

Çizelge 2.4. Ranavirüslerdeki kodlanan protein örnekleri ve onların tahmin edilen görevleri (He *et al.* 2002, Tsai *et al.* 2005, Huang *et al.* 2009 ve Jancovich *et al.* 2010)

Protein	Fonksiyon
DNA polymerase Thymidine kinase NTPase/helicase	DNA replikasyonu ve tamiri
RNA polymerase II Transcription elongation factor IIS Ribonuclease III (RNase III)	DNA transkripsiyonu
Ribonucleotide reductase ve subunit (RNR and) Thymidylate synthase (TS) Deoxyuridine trisphosphate nucleotido-hydrolase (dUTPase)	Nükleotid metabolizması
Major capsid protein (MCP)	Protein yapısı
3-Beta-hydroxy-delta 5-C27 steroid oxidoreductase-like protein, Bcl-2-like protein, LPS-induced tumor necrosis factor-alpha Eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2) like protein	Virus – konak etkileşimi

Ranavirüs vironun temel yapısal bileşimi MCP dir. MCP nin boyutu tipik olarak 50 kDa ve total virion proteinlerinin %40-45 oluşturur (Williams 1996). MCP geni familya içinde yüksek seviyede korunmuştur ve bu aminoasit sekans kimliğini diğer viral familyayla paylaşırlar. Örneğin Asfarviridae, Ascoviridae ve Phycodnaviridae (Tidona *et al.* 1998, Chinchar 2005). MCP iridoviruslerin en çok çalışılan genlerinden biridir ve bu gen viral gelişimi belirlenmesinde en uygun hedef gen olarak kabul edilir (Tidona *et al.* 1998). Tüm genom sekanslarının filogenetik analizlerine bağlı olarak EHNV, ATV, FV3, STIV ve TFV birbirleriyle yakın ilişkilidirler ve iridoviruslerden GIV ve SGIV'den ayrı grupturlar (Eaton *et al.* 2007, Huang *et al.* 2009, Jancovich *et al.* 2010).

2.4.4 Epidemiyolojisi ve Konak Özgüllüğü

Ranavirüse bağlı ölümler ve hastalıklar dünyanın çeşitli ülkelerinde ki hem doğal hem de çiftlik balık populasyonlarında rapor edilmiştir. Balıkları infekte eden virüslerden EHNV, Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu tarafından (OIE 2011) tehlikeli bir tür olarak kabul edilmiştir. Ranavirusler Su kültürlerinde ve doğal sucul hayvanlarda zararlı etki gösterdikleri için Avrupa Birliği (AB) epizootic kanamalı nekrozis (EHN) listesine alınmıştır. (Anonymous 2006). EHNV ilk kez kırmızı yüzgeçli levrek (*Perca fulviatalis*) izole edilmiştir. Avustralya'da hastalığın salgını sırasında gökkuşağı alabalığına da bulaşmıştır (Langdon *et al.* 1986, Langdon *et al.* 1988). Daha sonra bir diğer yakın ilişkili ranavirüs izolatı olan ESV Almanya'da ki yavru yayın balığı (*Silurus glanis*) yetiştirme çiftliğinden izole edilmiştir (Ahne *et al.* 1989). Fransa ve İtalyada Avrupa Kedibalığı virüsü (ECV) hastalıklı bodur yayın (*Ictalurus Melas*) balığından izole edildi (Pozet *et al.* 1992, Bovo *et al.* 1993). Bir diğer ranavirüs olan geniş ağızlı levrek iridovirüsü (LBMV) Güney Carolina, USA daki doğal geniş ağızlı levreklerin (*Micropterus Salmoides*) kütleli ölümünü takiben izole edildi (Plumb *et al.* 1996). Güney Doğu Asya'da iki ranavirüs izolatı GIV ve SGIV izolatları sarı arfoz (*Epinephelus awoara*) balığından izole edildi (Lai *et al.* 2000) ve kahverengi benekli orfozda da (*Epinephelus tawina*) (Chua *et al.* 1994) izole edilmiştir. Ranavirüsler süs balıklarından da izole edilmiştir (Hedrick ve Mc Dawell 1995, Paperna *et al.* 2001, Gibson ve Kueh 2003). Ek olarak ranavirüsler görünüşte sağlıklı konaklar olan *Sander lucioperca* ve *Stizostedion lucioperca*'dan (Tapiovaara *et al.* 1998) ve kısa kanatlı yılan

balığından da (*Aguilla australis*) izole edilmiştir (Bang Jensen *et al.* 2009).

Dünya genelinde, amfibiler arasında ranavirüs infeksiyonuna bağlı birçok hastalık ortaya çıktı ve OIE kaydına göre tüm ranavirüsler, amfibiler için patojen olarak bildirilmiştir (OIE 2011). Patojenik deri fungusu *B.dendrobatidise* ek olarak ranavirüsler dünya genelinde amfibi hastalıklarına sebep olan ajanlar olarak kabul edilmiştir (Chinchar 2002). İzole edilen ilk ranavirüs FV-3 olup tümör taşıyan bir kuzey kurbağası (*Lithobates pipiens* eski adıyla *Rana pipiens*)'nın böbreğinden izole edilmiştir (Granoff *et al.* 1966). 1992'de, BIV Avustralya'da süslü kazıcı kurbağa (*Limnodynastes ornatus*)'dan izole edilmiştir. İrodovirüs gibi ajanlar can çekişen yeşil kurbağa (*Rana esculenta*)'dan izole edilmiştir (Fijan 1991) ve 1990'lar da Avrupada ki çayır kurbağası (*Rana temporaria*)'nın sıradışı ölümlerinde de ranavirüslere rastlanmıştır (Drury *et al.* 1995, Cunningliam *et al.* 1996). ATV Kanada'da ki hastalıklı kaplan semenderlerden (*Ambystoma tigrinum diaboli*) izole edilmiştir (Bollinger *et al.* 1999). FV3 benzeri bir ranavirüs hastalıklı domuz kurbağalarından (*Rana grylio*), ağaç kurbağalarından (*Rana sylvatica*) ve kuzey leopar kurbağalarından izole edilmiştir (Greer *et al.* 2005).

Güney Amerika'da, tespit edilen bir ranavirüs izolatının FV3 ve ATV ile yakından ilişkili olduğu ve kurbağalarda ölümlü hastalıkların sebebi olduğu belirtilmiştir (Fox *et al.* 2006). Venezüella'da 7 farklı ranavirüs izolatı kara kurbağalarından (*Bufo marinus*) ve kurbağalardan (*Leptodactylus*) bulundu (Zupanovic *et al.* 1998). Son zamanlarda Belçika ve Hollanda'da ki kırmızı kuyruklu pürtüklü semenderde (*Tylotatritan kweichowensis*) ranavirüs infeksiyonunun salgın olduğunu belirten raporlar yayınlandı (Pasmans *et al.* 2008), ortak bir şekilde İspanyada ki ebe kurbağalar (*Alytes obstetricans*) ve alp semenderlerinde (*Mesotritan alpestris*) (Balseiro *et al.* 2009a, Balseiro *et al.* 2009b) ve Danimarka'da ki yenilebilir kurbağalarda da (*Peolophylax kl. (klepton) Esculentus*) bulundu (Ariel *et al.* 2009a).

Reptillerde ranavirüsler, birçok türden izole edilmiştir. Örneğin hastalıklı yeşil pitonlarda (*Chondapython viridis*) (Hyatt *et al.* 2002), yaprak kuyruklu kertenkeleler (*Uroplatus fimbriatus*) (Marchang *et al.* 2005) ve çok çeşitli kaplumbağalarda izole edilmiştir (Chen *et al.* 1999, Marchang *et al.* 1999, De Voe *et al.* 2004, Allender *et al.*

2006, Johnson *et al.* 2007, Johnson *et al.* 2008).

Ranavirüsler balıkları kurbağaları ve sürüngenleri infekte edebilir. Ama izolatlar tür, yaş ve coğrafik orjinine göre konak hayvana belirlenmiş özgüllük gösterirler (Chinchar 2002, Chinchar *et al.* 2005). Ek olarak bulaşma yolu, viral dozaj ve çevresel faktörler hastalığın başlangıcında rol oynarlar (Brunner *et al.* 2005, Brunner *et al.* 2007). Şimdiye kadar EHNV sadece Avustralya'da izole edilmiştir ve Avustralya'da gökkuşağı alabalığı, tatlisu levreği ve diğer doğal kemikli balık topluluklarının ölüm sebebi olmuştur (Langdon *et al.* 1988, Langdon 1989, Whittington *et al.* 1994, Whittington and Reddacliff 1995). Bununla birlikte Avrupa'da ki tatlisu balıklarının ve gökkuşağı alabalığı türlerindeki ranavirus kaynaklı önemli ölümler ranavirusun ticaret yoluyla bulaşması sonucu olabilir (Ariel ve Bang Jensen 2009). Bu olay çayır kurbağasında (*Rana temporaria*) da görüldü, ranavirüs ile infekte olan doğal hayvanlardan ortak su kaynaklarıyla taşınmış olabilir (Bailey ve Feist 2011). Ayrıca bazı deneysel koşullarda EHNV turna balığında (*Esox lucius*), sudak balığı ve siyah yayın balığında patojenik olarak görüldü (Bang Jensen *et al.* 2009, Gobbo *et al.* 2010, Bang Jensen *et al.* 2011a). ECV ve ESV'nin her ikisinde genç ve yetişkin balıklarda ölüme sebep olur (Ahne *et al.* 1990, Pozet *et al.* 1992, Bovo *et al.* 1993, Gobbo *et al.* 2010).

2.4.5 Ranaviruslerin Dünü, Bugünü, Geleceği

Virüslerin doğal yaşam üzerinde ki etkisi uzun bir tarihe sahiptir ve Ranaviruslerde de fark yoktur. Son 20 yılda Ranaviruslerle ilgili oldukça yoğun çalışmalar yapılmıştır.

Ranavirusler ilk kez 1965'de kuzey leopar kurbağasından (*Lithobates pipens*) Allan Gronof tarafından izole edildi. Juke-Herpes virüslerinin kültür ortamında büyümesi incelerken izole ettiği birkaç virüs sitopatik etki gösterdi. Onlardan birisi (tümör taşıyan bir kurbağadan elde edilen) Frog Virus 3 (FV-3) olarak adlandırıldı ve Ranavirüsün bir türü olarak kaydedildi. A.Granof'un öncül çalışması ve bunun üzerine yapılan diğer çalışmalar, virüs replikasyonunun gücünün açıklanmasında model olarak ranavirüslerin kullanılmasını göstermesine rağmen hastalık ajanı olarak ranavirüslere pek önem verilmemiştir. 1980'lerin sonunda iridoviruslerin bir serisinin çalışılmasıyla

birlikte ekolojik ve ekonomik açıdan önemli olan balık, kurbağalar ve sürüngenlerin ölümlerinde ranaviruslerin ajan olmalarıyla ilgili görüş değişmiştir. Ranavirusler günümüzde Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa, Asya ve Avustralya da ki su kültürlerinde, hayvan ve vahşi popülasyonlarda tespit edilmiştir (Lesbarreres *et al.* 2012).

Ranavirusler dünya genelindeki ektodermiler için ölüm olaylarına sebebiyet veren ajanlar olarak tanımlanmışlardır. FV-3 tayin edilmesi neredeyse sadece MCP geni temeline dayanarak yapılmıştır. Bununla birlikte ranavirüslerin çoğu onların MCP'leri içinde % 90'dan fazla benzerlik gösterir. Bir örnekte ki Ranavirüslerin tanımlanmasında ki tanı testleri MCP genine bağlı olmasına rağmen yalnız MCP genlerinin bir kısmı sekansların Ranavirüsler arasında ki farklılığın tespiti için yetersizdir. Bu nedenle tanımlamada FV-3 benzerliği sıklıkla kullanılır ve dikkatle yorumlanmalıdır (Jancovich 2003).

Tam karakterize olan izolatlar üzerinde ki çalışmalar FV-3, benzeri suşların USA'da ki *Scaphirhynchus albus*, Avustralya, Avrupa ve Amerikada ki Chelion (kaplumbağa) türleri, Kanadada ki *Lithobates sylvaticus* ve İngilterede ki *Rana temporaria* da genetik çeşitlilik ve coğrafik dağılıma bağlı olarak konaklarda ölüm olaylarının sebebi olduğunu gösterir (Lesbarreres *et al.* 2012). Ranavirüslerin bir diğer farklı tipi ATV şimdiye kadar sadece Kaplan semenderinde (*Ambystoma mavortium*) tespit edilmiştir. Filogenetik kanıtlar göstermiştir ki kaplumbağalarda ki ranavirüsler ile kurbağalarda ki ranavirüsler yakın ilişkilidir. Balık konağını infekte eden atasal ranavirüsler kurbağa ve sürüngen konaklara atlayabilir (Jancovich 2003). Ranavirüslerin karakterizasyonu, doğada ki coğrafik dağılımı ve onların konak aralıkları ne kadar acil bir şekilde tanımlanırsa uluslararası omurgalı konakları anlaşılabilir. Deneysel çalışmalar Ranavirüslerin sınıf içinde hızlıca yayıldığını göstermiştir. Her bir sınıf içinde, konaklar infeksiyon, lezyonlar ve davranış değişikliği göstermeden de ani ölümlerle karşı karşıya kalabilir (Chinchar 2002).

Ranavirusler soğukkanlı omurgalıları infekte ettiği için çevredeki ranavirus - konak ilişkilerinin değişken olması gerekir diye düşünen Lesbarreres *et al.* (2012) potansiyel

biyotik ve abiyotik mekanizmaların bu konuda ki rolünü tanımlamışlardır. Örneğin sıcaklık, larval gelişim safhaları, yoğunluk ve besin rekabetini ve virüsün yaygınlığının potansiyel rolü. Ek olarak doğal stres faktörleri (örneğin yırtıcıya maruz kalmak) antropojenik stres faktörleriyle birlikte (örneğin pestisitler) ranavirüsün duyarlılığını arttırabilir. Böylelikle salgın hastalık beklentileri ve ranaviral hastalıkların epidemiyolojisi daha iyi anlaşılacaktır (Lesbarreres *et al.* 2012).

3. MATERYAL METOD

3.1 Arazi Çalışmaları ve Örnekleme

Denizli Çivril ilçesine bağlı bulunan Işıklı bucağından ismini alan Işıklı Gölü'ne yapılan arazi çalışmasında gölün tüm çevresi dolaşmış ve hayvan yakalamak için uygun olan bölgelerden örnekleme işlemleri yapılmıştır. Gölün doğu, kuzey, batı ve güney bölümlerinden yapılan örnekleme işlemleri sırasıyla lokalite I, lokalite II, lokalite III ve lokalite IV olarak gruplandırılmıştır (Çizelge 3.1). Arazi çalışması yapılan bölgede izlenen rota ve gruplandırılan lokaliteler resim 3.1 de belirtilmiştir. 4 lokaliteden toplam 67 hayvan yakalanmıştır. Yakalanan kurbağalar tek kullanımlık ve daha önce kullanılmamış steril plastik kaplara alındı. Kurbağa örneklerinin doğal nem dengelerini kaybetmemeleri için kaplara bir miktar doğal ortamlarının suyundan eklendi. Örnekleme işlemleri tamamlandıktan sonra hayvanlar alındığı doğal ortamlarına geri salıverildi.

Chytridiomycosis tanısı için örnekleme pamuk uçlu swaplar (Medical Wire & equipment, MW 100-100; Biomerieux) ile 10 kez kurbağanın dorsal yüzeyine, 10 kez her bir kurbağanın kasıktan koltuk altına doğru, 10 kez ventral yüzeyine, 10 kez her bir kalçanın alt yüzeyine ve 5 kez ayaklarının alt yüzeyine sürülerek yapıldı. Bu teknik yüzey alanından en fazla miktarda örneklem yapılabilmesi için seçilmiştir ve yanlış negatif sonuç çıkma riskini en aza indirmektedir. Alınan swaplar 2,0 ml'lik steril ependorf tüplere alındı ve 10 saat içinde -20 °C'ye taşınarak laboratuvar analizleri yapıncaya kadar burada saklandı (Kriger *et al.* 2006b).



Resim 3.1 “kırmızı renkli çizgi: arazi boyunca izlenen rota” ve lokaliteler. (haritalar Google Earth programından alınarak üzerinde düzenleme yapılmıştır.)

Çizelge 3.1 Işıklı Gölünde yapılan arazi çalışması koordinat bilgileri.

Lokalite I		Lokalite II		Lokalite III		Lokalite IV	
Kuzey	Doğu	Kuzey	Doğu	Kuzey	Doğu	Kuzey	Doğu
38°12'28.93"	29°56'59.72"	38°15'46.36"	29°55'34.48"	38°14'22.60"	29°51'51.77"	38°12'17.43"	29°50'35.21"
38°13'17.63"	29°56'51.76"	38°15'58.96"	29°54'34.48"	38°14'8.45"	29°51'6.44"	38°12'3.84"	29°51'45.85"
38°14'13.14"	29°56'55.79"	38°15'43.24"	29°53'19.78"	38°13'42.77"	29°50'27.13"	38°11'58.63"	29°53'21.13"
38°15'16.48"	29°56'17.76"	38°15'1.87"	29°52'29.12"	38°12'57.72"	29°49'46.53"	38°12'4.37"	29°54'31.76"



Resim 3.2 Işıklı Gölü ve arazi çalışmalarına ait bazı fotoğraflar.

Ranavirus tanısı için örneklerin konulduğu kapların içerisinde bulunan epitel deri döküntüleri alınarak 2,0 ml'lik ependorf tüplere konuldu ayrıca arazide bulunan ölü örneklerinde 0.5 cm² lik deri ve kas parçaları da alınarak 2,0 ml'lik ependorflara alındı. Her iki tip örneklerin üzerlerine %70'lik etanol eklendi ve laboratuvar analiz işlemlerine kadar -20 °C de saklandı (Galli *et al.* 2006).

3.2 Laboratuvar Analizleri

Laboratuvar çalışmalarında örneklerden DNA izolasyonu, DNA ların izolasyon kontrolü için elektroforez ve Qbit cihaz ölçümleri, qPCR işlemleri ve sonuçların değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.1 Swaplardan DNA İzolasyonu

Öncelikle çalışılacak örnek sayısı kadar 2,0 ml'lik vidalı kapaklı tüpler hazırlandı ve etiketlendi. Tüplerin içerisine 30-40 mg 0,5 mm çapındaki zirkonyum/silika boncuklar konuldu daha sonra 50 µl PrepMan Ultra (Applied Biosystems #4318930) eklenir ve son olarak swaplar sapları kesilerek tüplere eklendi. Tüplerdeki örnekler BeadBug (Benchmark) cihazı ile 45-60 sn boyunca 4000 rpm de homojenize edilerek mevcut zoosporların parçalanması sağlandı, kısa bir süre buz küvetinde bekletilip 13,000 x g de 30 sn santrifüj yapıldıktan sonra homojenizasyon ve santrifüj işlemleri tekrarlandı. Tüplerin kapakları 22 yada 23 numara steril iğneler kullanılarak delindi ve tüpler 10 boyunca kaynayan su banyosunda bekletildiler. Su banyosundan alınan örnekler 2 dk. oda sıcaklığında soğumaya bırakılmasının ardından en yüksek hızda (~ 13,000 g.) 3 dk. +4 °C de santrifüj edildi ve oluşan süpernatant toplanarak qPCR işlemlerinde kullanılmak üzere 1/10 oranında sulandırılmıştır (~ 5 ng/µl), qPCR çalışması DNA izolasyonu işleminden daha ileri bir tarihte yapıldığı durumlarda DNA örnekleri etiketlenmiş steril 0,5 ml'lik tüplerde -20 °C de saklandı (Kriger *et al.* 2006).

3.2.2 Ranavirus için DNA İzolasyonu

Lezyonlu deri parçası % 95 ethanol bulunan eppendorf tüp içerisinde fikse edilir. 50mg

deri parçası alınır ve 400 µl lizis buffer (NaCl 0,1 M, Sükroz 0,5 M, Tris 0,1 M, EDTA 50 mM, SDS %0,5) içine aktararak mikrotüp içersine konur ve mikrotüp homojenizatör yardımıyla 60-70 sn boyunca 4000 rpm'de homojenize edilir. Oluşan homejanat 30 dk, 65°C de inkübe edilir. Daha sonra 57 µl 8M potasyum asetat eklenir ve 30 dk buz banyosunda inkübe edilir. Bu işlemden sonra 10,000 g de 15 dk santrifüj yapıp süpernatant yeni bir tüpe alınır. Üzerine 1ml buz soğukluğunda %100 etanol eklenir, 10,000 g de 15dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür ve 50µl TNE (Tris 6mM, NaCl 6mM, EDTA 0.2mM) tamponu içerisinde çözdürülerek +4 °C ve -20 °C'de saklanır (Galli *et al.* 2006).

3.2.3 Elektroforez İşlemi

Bd ve Ranavirus tespiti amacıyla yapılan DNA izolasyon işlemleri sonrasında izolasyon işleminin başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol amacıyla elde edilen örneklerden bir kısmı % 1'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra UV ışık altında görüntülenmesi yapıldı.

3.2.4 Qbit Ölçümleri

DNA izolasyon işlemlerinden sonra elde edilen DNA miktarını ölçmek için Qbit 2.0 flourometer (invitrogen) ile yüksek hassasiyetli DNA ölçüm kiti kullanılarak (kit protokolü uygulanmıştır) ölçümler yapılmıştır.

3.3 Bd Tespiti İçin Real Time PCR (qPCR) İşlemi

3.3.1 Standart Örneklerin, Pozitif ve Negatif Kontrollerin Hazırlanması

Real time PCR işlemi sırasında çalışılan örneklerdeki DNA yoğunluğunu belirlemek amacıyla oluşturulacak standart eğri için (PrimerDesign, Genesig, İngiltere) firmasından temin edilen Bd DNA örneği 10 ar kat sulandırılarak kullanıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Standart eğrisinin oluşturulabilmesi ve miktar tayini yapılması için standart pozitif kontrollerin hazırlanması

Dilüsyon Tüpleri	DNA Kopya Yoğunluğu
Tüp 1	$2 \times 10^5 / \mu\text{l}$
Tüp 2	$2 \times 10^4 / \mu\text{l}$
Tüp 3	$2 \times 10^3 / \mu\text{l}$
Tüp 4	$2 \times 10^2 / \mu\text{l}$
Tüp 5	$20 / \mu\text{l}$
Tüp 6	$2 / \mu\text{l}$

Pozitif kontrol olarak da en yüksek yoğunluğa sahip Tüp 1 örneği her rt-PCR uygulamasında kullanıldı. Negatif kontrol olarak her rt-PCR deneyinde DNA örneği yerine DNaz - RNaz içermeyen steril su kullanıldı.

3.3.2 Real Time PCR Uygulaması

Bd varlığının tespiti için izole edilen DNA örnekleri Bd ye özgü ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') ve 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3') primerleri ve ChytrMGB2 (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3') TaqMan MGB (minör groove binding) probu kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulamasına tabi tutuldu (Boyle *et al.* 2004). Real time PCR işleminde reaksiyonların son hacimleri 20 μl (15 μl rt-PCR + 5 15 μl DNA örneği) olarak ayarlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Bd tespiti için yapılan qPCR'da kullanılan malzemelerin miktarları.

Kullanılan Malzeme	Kullanılan Miktar
2 x Precision™ MasterMix (PrimerDesign, Genesig, İngiltere)	10 μl x örnek sayısı
B.dendrobatidis'e özel Primer/Probe (10 pikomol) mix	1 μl x örnek sayısı
DNaz ve RNaz içermeyen steril su	4 μl x örnek sayısı
Toplam	15 μl x örnek sayısı
DNA örneği (5 ng / μl)	5 μl
Reaksiyon Toplamı Son Hacmi	20 μl

Real PCR için hazırlanan örnekler 8'li 0,2' ml strip PCR tüplerine konularak üzerleri şeffaf seal bandı ile kapatılarak karışımın homojenize olması ve tüplerin duvarında

kalmış olabilecek damlaların dibe inmesi amacıyla bütün tüpler vorteks – spin cihazı (Bioneer, Kore) ile 2500 rpm de 5 s., “hard” seviyede çalkalama ayarında 20 s. ve 20 tekrar şeklinde vorteks – spin edildi. Daha sonra hazır olan tüpler real time PCR cihazının (Bioneer Exicycler96, Kore) termal bloğu üzerindeki kuyucuklara yerleştirildikten sonra aşağıdaki protokole göre (Çizelge 3.4) cihaz çalıştırıldı.

Çizelge 3.4 Bd tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü

Döngü Sayısı	İşlem Basamağı	Süre (saat.dakika.saniye)	Sıcaklık
1 Tekrar	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.10	95 °C
50 Tekrar	Bağlanma - Uzama	00.01.00	60 °C
	Verilerin Okunup Bilgisayara aktarılması	-	-
1 Tekrar	Melting	-	55 °C – 94 °C

Tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri en aza indirilmiştir PCR işleminin ardından Ct (cycle treshold) değeri alınan örnekler %1,5 lik agaroz jel elektroforezinde DNA marker kullanılarak yürütülerek hedeflenen DNA örneği boyutunun görüntülenmesiyle sonuçların doğruluğu kontrol edildi (Annis, 2004).

3.4 Ranavirus (FV-3) Tespiti için Real Time PCR İşlemi

Ranavirus'ün varlığının tespiti için real time, quantification PCR (qPCR) uygulama işlemi, Çizelge 3.5 de verilen MCP (Major Capsid Protein) ve IE (immediately early) primerleri kullanılarak Çizelge 3.4.2 de belirtilen protokol koşulları altında reaksiyon son hacmi 25 µl (10 µl Applied master mix, 10 pikomol 1 µl ileri primer, 10 pikomol 1 µl geri primer, 8 µl DNAz – RNAz içermeyen steril su ve 5 µl (25 ng) DNA) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri en aza indirilmiştir. qPCR işleminin ardından Ct (cycle treshold) değeri alınan örnekler %1,5 lik agaroz jel elektroforezinde DNA marker kullanılarak yürütülerek hedeflenen DNA örneği boyutunun görüntülenmesiyle sonuçların doğruluğu kontrol edildi (Galli *et al.* 2006).

Çizelge 3.5 Ranavirus (FV-3) tespitinde kullanılan pimer dizileri (Galli *et al.* 2006).

Primer Adı	Genom Yeri	Üzerindeki Nucleotide sequence
MCP ileri	61–81 ^a	5' - TAC TTT GTC AAG GAG CAT TAC - 3'
MCP geri	398–418a	5' - TCA TGT TAT AGT AGC CTA TGC - 3'
IE ileri	104–22b	5' - ATG ATC CAA GCC TACCTG TGC - 3'
IE geri	563–583b	5' - AAA TGT CCT AAT CTA TAC ACC - 3'

Çizelge 3.4.2 Ranavirus (FV3) tespiti için qPCR amplifikasyon protokolü.

Döngü Sayısı	İşlem Basamağı	Süre (saat.dakika.saniye)	Sıcaklık
1 Tekrar	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.15	95 °C
50 Tekrar	Bağlanma ve Uzama	00.00.60	60 °C
	Verilerin Okunup Bilgisayara aktarılması	-	-
1 Tekrar	Melting	-	55 °C – 94 °C

4. BULGULAR

Işıkli Gölü'ne yapılan arazi çalışmalarında Chytridiomycosis hastalığına sebep olan patojen *Batrachochytrium dendrobatidis* fungusun tespit çalışmaları için, 4 lokaliteden toplamda 67 *Pelophylax caralitanus*'dan sürüntü yöntemiye swap örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden uygun metot ile DNA izolasyonu yapılmış ve *Batrachochytrium dendrobatidis*'e özgü primer dizileri kullanılarak qPCR çalışmaları yapılmıştır. Tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri en aza indirilmiştir. Bu 3 tekrarlı çalışmaların üçünde de pozitif sonuç veren örnekler Bd pozitif olarak tanımlanmıştır. qPCR cihazının bilgisayara aktarmış olduğu Ct (cycle treshold) değerlerine bakılarak pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca qPCR deneylerinde her bir çalışmada kullanılan standart pozitif örnekler ile de Bioneer Exicycler 96 analiz programında oluşturulan standart eğri yardımıyla da zoospor sayıları genomik eküvalent olarak tespit edilmiştir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda *Batrachochytrium dendrobatidis* fungusunun tespit çalışmalarında kullanılan 67 örnekten 21 tanesi pozitif, 46 tanesi de negatif sonuç vermiştir. Yüzdesel olarak hesaplandığında 67 örneğin % 31,34 ü Bd pozitif olarak belirlenmiştir.

Bd tespiti için yakalanan hayvanların tutuldukları kaplarda bıraktıkları epitel deri döküntüleri Ranavirus tespit çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmalar için toplamda 49 örnek toplanarak içerisinde alkol bulunan 2,0 ml lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Laboratuvar analizleri sırasında Ranavirus deneylerinde iki farklı gen bölgesine ait primerler kullanılacağı için bu 49 örnekten izole edilen DNA örnekleri gerekli miktarlarda ikiye bölünerek qPCR deneylerinde kullanılmıştır. Bu durumda MCP ve IE primerlerinin kullanıldığı Ranavirus çalışmalarında toplam 98 örnek çalışılmıştır. Tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri en aza indirilmiştir. Bu 3 tekrarlı çalışmaların üçünde de pozitif sonuç veren örnekler Ranavirus pozitif olarak tanımlanmıştır. qPCR cihazının bilgisayara aktarmış olduğu Ct (cycle treshold) değerlerine bakılarak örneklerin pozitif ya da negatif oldukları tespit edilmiştir. Ranavirus çalışmalarımızda mevcut miktarı bilinen

pozitif örnekler olmadığı için miktar tayini çalışmaları yapılamamıştır.

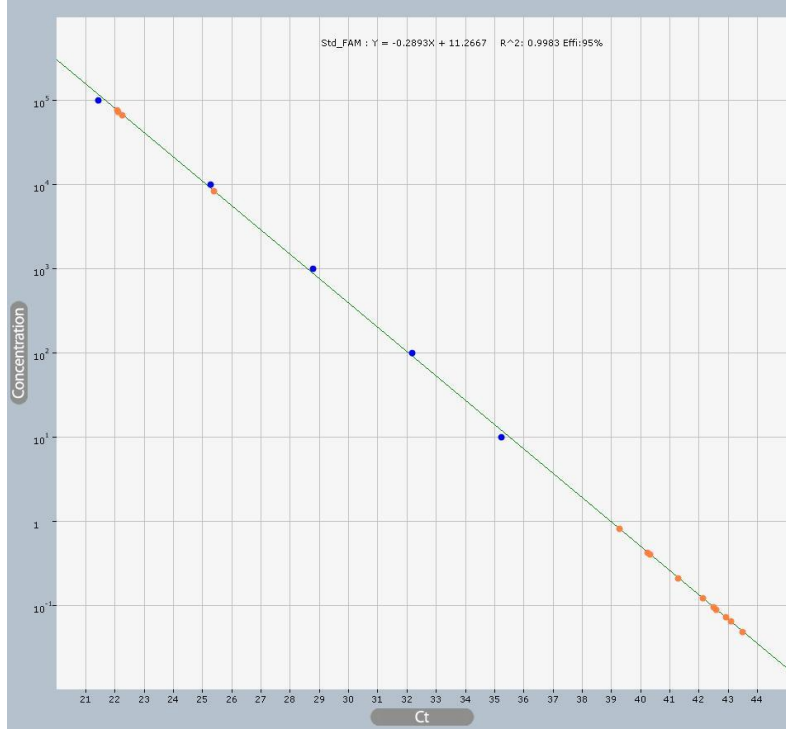
Yapılan değerlendirmeler sonucunda MCP primeri ile qPCR çalışmaları yapılan 49 örnekten 8 tanesi Ranavirus pozitif, 41 tanesi de Ranavirus negatif olarak belirlenmiştir. Buda MCP primerleri ile çalışılan 49 örneğin % 16,32 sinin pozitif sonuç verdiğini göstermektedir. IE primerleri ile yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde ise 49 örnekten 9 tanesi Ranavirus pozitif 40 tanesi de Ranavirus negatif sonuç ortaya çıkmıştır. Buda 49 örnekten % 18,36 sının pozitif olduğunu göstermiştir.

MCP ve IE primerleri ile yapılan çalışmalarda ki pozitif sonuç alınan örnek incelendiğinde ise MCP primeri ile pozitif sonuç alınan 8 örneğinde IE primerleri ile yapılan çalışmada da pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Bu da sonuçların doğruluğunu destekler niteliktedir.

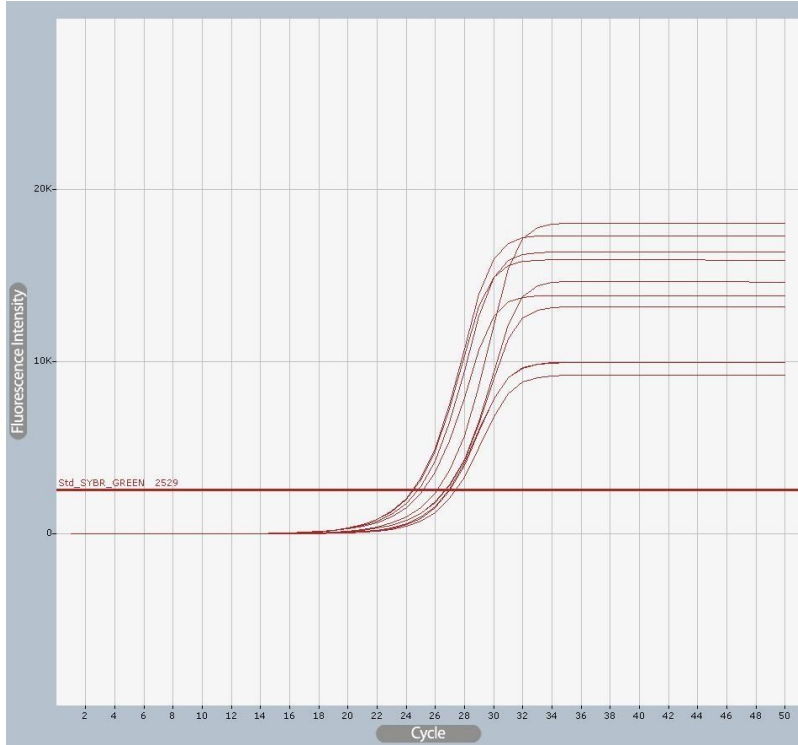
Hem MCP hem de IE primerleri ile yapılan toplam çalışma göz önünde bulundurulduğunda her iki primerle de çalışılan 98 örnekten 17 tanesi Ranavirus pozitif olarak değerlendirilmiş, kalan 81 tanesi de Ranavirus negatif olarak değerlendirilmiştir. Her iki primer sonuçlarının toplam değerleri ele alındığında % 17,34 oranında pozitif sonuç ortaya çıkmıştır. Tüm değerler çizelge 4.1 da gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Bd ve Ranavirus qPCR deneyleri sonucu elde edilen pozitif sonuçlar, negatif sonuçlar ve pozitiflik % değerleri.

Bd, Çalışılan Örnek Sayısı	Bd, Pozitif Örnek Sayısı	Bd, Negatif Örnek Sayısı	Bd, Pozitiflik % Değeri
67	21	46	31,34
Ranavirus MCP Primeri, Çalışılan Örnek Sayısı	Ranavirus MCP Primeri, Pozitif Örnek Sayısı	Ranavirus MCP Primeri, Negatif Örnek Sayısı	Ranavirus MCP Primeri, Pozitiflik % Değeri
49	8	41	16,32
Ranavirus IE Primeri Çalışılan Örnek Sayısı	Ranavirus IE Primeri Pozitif Örnek Sayısı	Ranavirus IE Primeri Negatif Örnek Sayısı	Ranavirus IE Primeri Pozitiflik % Değeri
49	9	40	18,36
Ranavirus MCP ve IE Primerleri, Çalışılan Örnek Sayısı	Ranavirus MCP ve IE Primerleri, Pozitif Örnek Sayısı	Ranavirus MCP ve IE Primerleri, Negatif Örnek Sayısı	Ranavirus MCP ve IE Primerleri, Pozitiflik % Değeri
98	17	81	17,34



Resim 4.1. qPCR sonrası Bd zoospor miktar tayininde kullanılan standart eğriye bir örnek.



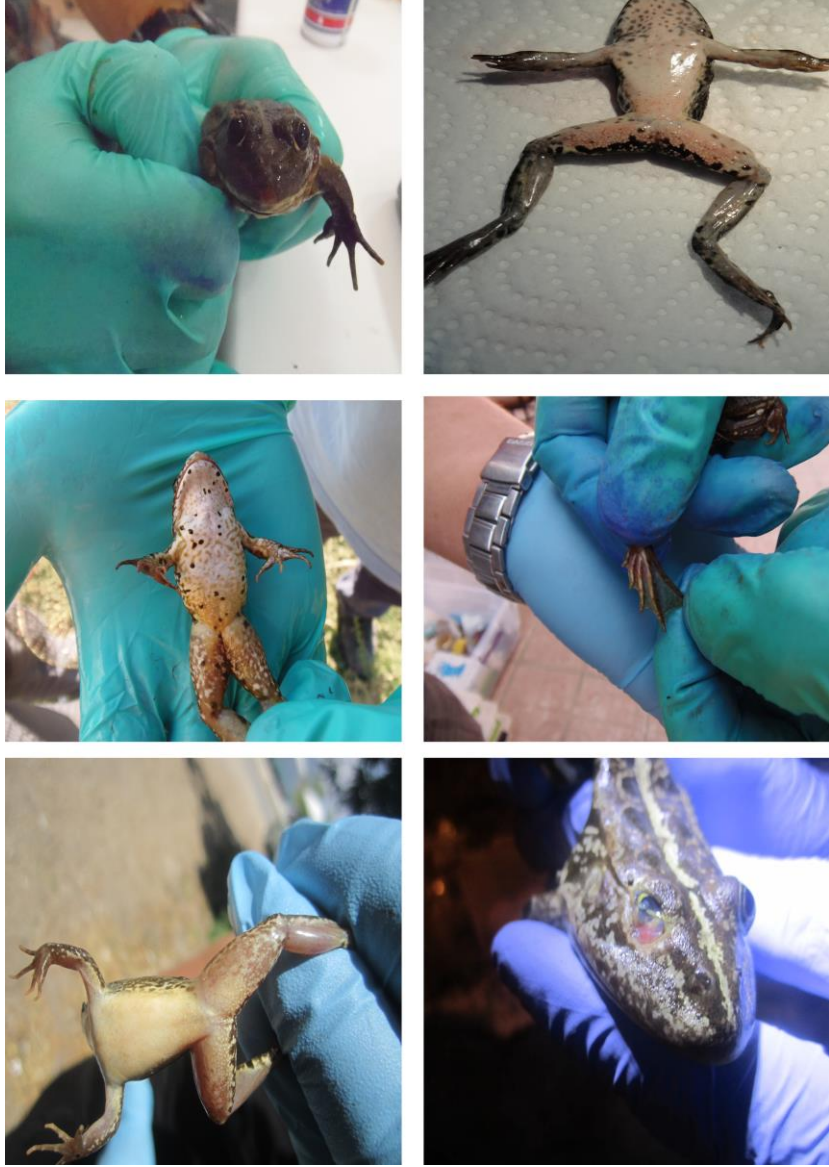
Resim 4.2 qPCR işlemi sırasında anlık olarak bilgisayar monitörüne yansayan görüntü örneği.

qPCR cihazında yapılan Bd çalışmalarında her deneyde kullanılan standart örnekler vasıtası ile cihaz tarafından hazırlanan standart eğri ile otomatik olarak hesaplanan genomik eküvalent (zoospor sayılarına ait sayısal bilgiler) miktarlarının ortalama değerleri çizelge 4.2 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2 Lokalitelere göre genomik eküvalent ortalamaları.

Lokalite I	Lokalite II	Lokalite III	Lokalite IV
91,7562	94,8489	1132,1647	91,4961

Yapılan arazi çalışmaları sırasında bölgedeki yöre halkının sivrisineklerin artmasıyla ilgili şikayetleri olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum bölgedeki amfibi popülasyonunda azalma olduğunu göstermektedir. Arazide örneklem yapılırken yakalanan bazı hayvanların dış görünüşünde lezyonlar, kasık bölgeleri ağırlıklı olarak arka bacaklar boyunca kızarıklık, hareketlerinde yavaşlık, ışığa ve harekete verilen reflekslerde gözle görülür yavaşlık olduğu tespit edilmiştir (Resim4.3).



Resim 4.3 Arazide yakalanan ve bazı bölgelerinde lezyon gözlemlenen örnekler.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İklimlerdeki değişiklikler ne yazık ki dünyamız ve atmosfer üzerinde yaşayan tüm canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, bu değişim tüm dünyada eşit şiddette olmadığı gibi her bireyde de farklı tepkiler vermektedir. İklim değişikliği çağımızın en önemli çevresel ve ekonomik sorunları arasında ön sıralarda yer alan, özellikle bulunduğumuz coğrafyada sağlıktan tarıma yaşamın her alanında olumsuz etkiler oluşturan son derece önemli bir sorundur.

İklim değişikliğinin canlıların sağlığına etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan bulgulardan biride bazı bulaşıcı hastalıkların vektörlerinin ve dağılımının değişmesidir. Bu durum hastalığın oluşma olasılığı olan bölgelerin artmasına, yayılma hızının değişmesine, göçlerin artmasına ve hastalıkların görülme sıklığının artmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla doğal ve antropojenik etkiler iklimsel değişmelere neden olmakta bunun sonucunda ekosistemler değişmektedir.

Patojen türlerin infeksiyon hızı ve etkileri gün geçtikçe artmaktadır. Bunun nedeni çevresel, biyotik ve abiyotik etkiler sonucunda konak organizmanın immün sisteminin zayıflaması, patojenin direnç kazanarak patojenitesinin artması ve geniş alanlara yayılımıdır.

1980 yılından beri yaklaşık 122 amfibi türü yok olma tehlikesindedir. Ülkemizde de 30 kurbağa (14 Urodel, 16 Anur) ve 127 (10 kaplumbağa, 62 kertenkele ve 55 yılan) sürüngen türü yaşamaktadır. Kurbağa türlerinin ve sürüngen türlerinin birçoğu Dünya Tabiatı Koruma Birliği (IUCN) kırmızı listesinde yer almaktadır. Kırmızı listeye göre, ülkemizdeki kurbağaların % 43' ü düşük öncelikli, %17 'si tehlike altına girmeye aday, %17 'si tehlike altında, % 13' ü hassas ve % 7' si kritik olarak tehlike altında kategorisinde yer almaktadır. %3' ü hakkında ise yeterli bilgi bulunmamaktadır. Tüm Dünya da amfibilerdeki azalışın en önemli nedenleri olarak Chytridiomycosis hastalığının etkeni *B. dendrobatidis* ve Ranavirusler gösterilmektedir.

Berger ve ark.(1998) tarafından dünya genelinde amfibilerde kütleli toplu ölümlere neden olduğu bilinen Chytridiomycosis hastalığının sebebi olan patojen fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*' i ilk olarak Panama ve Avustralya' da amfibi türlerindeki ani azalışın sebebi olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırma kapsamında Güney Afrika Müzesi, Cape Town (SAMZR 18927) kayıtlı *Xenopus leavis* örneklerinde yapılan geçmişe yönelik incelemeler sonucunda patojenle ilgili en eski kanıtlar bu örnek üzerinde bulunmuştur. Birçok araştırmacı bu patojenin başta iklim değişikliği olmak üzere dünya çapında yapılan kurbağa ticaretinin etkisiyle yayıldığını düşünmektedir. Yapılan araştırmalarda Afrika, Güney Amerika, Orta Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Yeni Zelanda' da 287 amfibi türünde ve 25 familyasında *B. dendrobatidis* türü tespit edilmiştir. (Lips et al. 2008, Bosch et al. 2007, Skerratt et al. 2007, Laurance 2008, Rohr et al. 2008, Krigger 2009). Bazı ülkelerde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Rusya da çalışılan 2 örnekten 0 pozitif, Çin de 446 örnekten 42 pozitif, İran da 1 örnekten 0 pozitif, Pakistan da 8 örnekten 0 pozitif, Güney Kore de 18 örnekten 5 pozitif, Japonya da 1722 örnekten 243 pozitif, 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 örnekte 43 pozitif, Çek Cumhuriyetinde 1 örnekten 0 pozitif, Almanya da 489 örnekten 56 pozitif, Hollanda da 901 örnekten 24 pozitif, Belçika da 1830 15 pozitif, Amerika da 11593 örnekten 2259 pozitif örnek tespit edildiği ortaya çıkmıştır (İnt. Kay 3). Yüzdeleri göz önüne alındığında %44,4 oran ile Fransa en yüksek enfeksiyon oranına sahiptir, 11593 örnek çalışması ile de Amerika en fazla çalışma yapılan ülke olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ki sonuçlar ele alındığında ise yaklaşık % 31 lik pozitif sonuç oranı ülkemiz kurbağalarının büyük bir tehlike altında olduğunu göstermektedir, enfeksiyon yaygınlığının tam anlamıyla belirlenebilmesi için ülke genelinde bulunan 30 anur türünün yayılış gösterdikleri lokalitelere göre detaylı araştırılması gerekmektedir.

B.dendrobatidis zoosporları suyoluyla bir hayvandan diğerine bulaşarak amfibilerin derisini infekte eder ve bu zoosporlar sadece epitelyumun keratinleşmiş bölümünde büyüme gösterirler (Berger et al. 1998, Longcore et al. 1999, Pessier et al. 1999, Nichols et al. 2001). Bu zoosporlar etrafa saçıldıktan sonra 24 saat içinde hareketli forma dönüşürler (Berger 2001). Zoosporlar hem yetişkin hem de iribaş safhasında olan

(bu safhada sadece ağız parçalarında tespit edilmiştir) kurbağaları infekte eder (Berger et al. 1999; Nichols et al. 2001). Enfeksiyondan sonra ölüm genellikle 18-45 gün içinde gerçekleşir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada 12 lokaliteden toplanan 330 *Lyciasalamandra* türü, 2 *Pelophylax bedriagae* ve 1 *Pseudepidalea variabilis* 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). Bunun yapılan bir diğer çalışmada göller bölgesi ve 26 Ağustos Milli Parkından toplanan 7 türe ait 228 amfibi örneğinde Bd tespit çalışmaları yapılmıştır. 26 Ağustos milli parkından toplanan örneklerde türlere göre %8 ile % 29 oranlarında pozitif sonuç elde edilmiştir. Göllere bölgesi çalışmalarında ise Beyşehir gölü %32 positiflik ile en yüksek enfeksiyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Erişmiş, 2014).

Bizim çalışmamızda ise 67 swap örneğinin 21'i Bd pozitif olarak belirlenmiştir. Bd pozitif olarak saptana örneklerin bir kısmında deride lekelenmeler, deri kayıpları ve kızarıklıklar saptanmışken, diğer kısmında ise hiçbir fizyolojik bulguya rastlanmamıştır. Bu nedenle hastalığın belirli bir fizyolojik bulgusu olmasa da sonuç pozitif olabilmektedir dolayısıyla morfolojik olarak hastalığın tespiti sağlıklı sonuçlar vermeyecektir. Günümüzde Bd'nin belirlenmesinde en etkin teknik qPCR yöntemi olarak kabul edilmiştir.

Çalışılan dört lokaliteden elde edilen Bd genomik eküvalent sonuçlarının ortalama değerlerine baktığımızda ise Lokalite I 91,75, Lokalite II 94,84, Lokalite III 1132,16 ve Lokalite IV 91,49 genomik eküvalent değerlerine sahiptir. Bu değerlerden en yükseğine sahip olan Lokalite III tür ve bu sonuç bu bölgede patojenitenin daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bunun birçok sebebi olabileceği gibi Lokalite III tarımsal faaliyetlerin yüksek olduğu bölge olduğu için bilinçsiz kullanılan zirai ilaçların hayvanların immün sistemini zayıflatmış olmasından dolayı enfeksiyona daha duyarlı olduğu düşünülebilir.

2008 yılında, Dünya sağlık örgütünün Yaban hayat organizasyonu (World Organisation for Animal Health, 2008) tarafından Yaban hayat Hastalıklar Listesi yerleştirilen ve yüksek ölümcül salgın hastalıklar sınıfına dahil edilen ranaviral hastalıkların sebebi olan Ranavirus türleri, Iridoviridae familyasına dahildir. Ranavirüs türleri amfibiler de olduğu gibi poikilotherm hayvanlarada da sistemik enfeksiyonla ölümlere neden olur. Ranaviruslerden Frog virüs 3 olarak adlandırılan ve amfibilerde sıkça rastlanan FV-3'ün en önemli özelliği genomunda major capsid protein (MCP) genini içermesidir.

1990 lar dan ranavirus ve chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* yeni patojenler olarak bildirilmiş ve dünya sağlık örgütü tarafından dikkat edilmesi gereken hastalıklar listesine alınmıştır (Wiliam ve ark.2010).

FV3 tepiti için yaptığımız çalışmamızda, 49 örnek hem MCP primer çiftiyle hem de IE primer çiftiyle qPCR işlemine kullanılmıştır. MCP primerleriyle yapılan çalışmalar sonucu 8 pozitif örneğe bağlı olarak %16,32 oranında FV-3 pozitif sonuç alınmıştır. IE primerleri ile yapılan çalışmalar sonucunda da MCP primerleri ile yapılan çalışmadaki 8 örnek tekrar pozitif sonuç vermiş ve bu 8 örneğin dışında da 1 örnekten daha pozitif sonuç alınmıştır. Yüzdesel oranı hesaplandığında %18,36 sonucu elde edilmiştir. Bu iki primer ile çalışılan örneklerden 8 örneğin de aynı sonucu vermesi yapılan çalışmadaki pozitif sonuçların doğruluğunu destekler niteliktedir.

Konya ile Denizli illeri arasında yayılış gösteren ülkemize endemik *P.caralitanus* Ekonomik ve ekolojik öneminin yanı sıra ülkemizin gen havuzunu zenginleştiren önemli bir türdür. Arazi çalışmaları sürecinde de türün azalışı belirgin şekilde gözlemlenmiştir. İlegal yollar ile ticari amaçlı toplanması, küresel iklim değişiklikleri, sucul habitatların kuruması, zirai ilaçların bilinçsiz şekilde kullanılması sayılarındaki azalışın başlıca nedeni olarak sayılmaktadır. Ancak bu türe ait daha önce Bd ve FV-3 ile yapılmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak çalışmamızda patojen hastalıkların yayılması (Bd ve FV3) bu türün azalışının nedenleri arasında olduğu görülmektedir.

Bundan sonraki çalışmalar patojenlerin dağılımını etkileyen faktörlerin saptanması ve hastalıkların çözüm yollarının tespiti püzerine olmalıdır. Ayrıca elde edilen sonuçlar Türkiye’ de ki diğer tür azalışlarında da patojenlerin etkin olup olmadığının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Ahne, W., Bearzotti, M., Bremont, M. and Essbauer, S. (1998). Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virüs and frog virus 3. *Zentralbl Veterinarmed B*, **45**: 373-383.
- Ahne, W., Bremont, M., Hedrick, R.P., Hyatt, A.D. and Whittington, R.J. (1997). Special topic review: Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHNV) in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*, **13**: 367-373.
- Ahne, W., Ogawa, M. and Schlotfeldt, H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish (*Silurus glanis*). *Zentralbl Veterinarmed B*, **37**: 187-190.
- Akin, Ç., Bilgin, C.C., Beerli, P., Westaway, R., Ohst, T., Litvinchuk, S.N., Uzzell, T., Bilgin, M., Hotz, H., Guex, G.D. and Plötner, J. (2011). Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal Biogeogr* **37(11)**: 2111–2124.
- Allender, M.C., Fry, M.M., Irizarry, A.R., Craig, L., Johnson, A.J., Jones, M. (2006). Intracytoplasmic inclusions in circulating leukocytes from an eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*) with iridoviral infection. *Journal Wildl Disease*, **42**: 677-684.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., and Joyce E. Longcore J.E., (2004). A Dna-Based Assay Identifies *Batrachochytrium Dendrobatidis* In Amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, **40(3)**: 420–428
- Anonymous. (2006) Council directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. *Official journal of*

the European Union L, 328, p 14-56.

Ariel, E., Bang Jensen, B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *Journal Fish Disease*, **32**:1017-1025.

Arıkan, H. (1988). On a new form *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) from Turkey. *İstanbul Universitesi Fen Fakültesi Mec.*, **53**: 81-87.

Atatür, M.K., Arıkan, H., Mermer, A. (1993). A Preliminary study on the feeding biology of a *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) population from Beyşehir Lake. *Turkish Journal Zoology* **17**:127-131.(in Turkish with English abstract).

Bailey, A.E. (2007). Stability of infectivity of systemic iridoviruses during storage at +4°C and -70°C. In the abstracts of the 7th International symposium on viruses of lower vertebrates. 22-25th April 2007, Oslo.

Bailey, A., Feist, S. (2011). Transmission of ranavirus in the common frog *Rana temporaria* by indirect cohabitation In abstracts of the 15th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 12-16th September 2011, Split, p 349.

Balseiro, A., Dalton, K.P., del Cerro, A., Marquez, I., Cunningham, A.A., Parra, F., Prieto, J.M., Casais, R (2009a). Pathology, isolation and molecular characterisation of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. *Disease of Aquatic Organisms*, **84**: 95-104.

Balseiro, A., Dalton, K.P., del Cerro, A., Marquez, I., Parra, F., Prieto, J.M., Casais, R. (2009b). Outbreak of common midwife toad virus in alpine newts (*Mesotriton alpestris cyreni*) and common midwife toads (*Alytes obstetricans*) in northern Spain: a comparative pathological study of an emerging ranavirus. *Veterinary Journal*, **186**: 256-258.

- Bang Jensen, B., Ersboll, A.K., Ariel, E. (2009). Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of Ranavirus isolates. *Disease of Aquatic Organisms*, **83**: 169-179.
- Bang Jensen, B., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Ariel, E. (2011a). Susceptibility of pike-perch *Sander lucioperca* to a panel of ranavirus isolates. *Aquaculture*, **313**: 24-30.
- Barr, D.J.S. (1990). Phylum chytridiomycota. In Handbook of Protoctista (eds L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkman & D. J. Chapman), pp. 454–466. Boston, MA: Jones & Bartlett.
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings National Academy of Science USA*, **98**: 9237-9242.
- 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.D. (1999). Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A (ed) *Declines and disappearances of Australian frogs*. Environment Australia, Canberra, p 23–33.
- 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. 2005b. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **68**: 51–63.
- Bollinger, T.K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R.M., Chinchar, V.G. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildl Disease*, **35**: 413-429.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, 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., Carrascal, L.M., Durán, L., Walker, S. and Fisher, M.C. (2007). Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain, *Proceedings of the Royal Society*, **274**: 253 – 260.
- Boyle, D.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.
- Bovo, G., Comuzi, M., DeMas, S., Ceschia, G., Giorgetti, G., Giacometti, P., Cappellozza, E. (1993). Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictalurus melas*) d'allevamento. *Boll Soc Ital Patol Ittica* **11**: 3-10.
- Braunwald, J., Tripiier, F., Kim, A. (1979). Comparison of the properties of enveloped and naked frog virus 3 (FV3) particles. *Journal of Genetic Virology*, **45**: 673-82.

- Brodman, R., Briggler, T. J. (2008). Batrachochytrium dendrobatidis in Ambystoma jeffersonianum larvae in southern Indiana. *Herpetological Review* **39** (3): 320–321.
- Brunner, J.L., Richards, K., Collins, J.P. (2005). Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia*, **144**: 399-406.
- Brunner, J.L., Schock, D.M., Collins, J.P. (2007). Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **77**: 87-95.
- Budak, A., Göçmen, B. (2008). Herpetoloji ders kitabı Ege üniversitesi yayınları-fen fakültesi yayın no:194 Isbn 975-483-658-2.
- Bülbül U., Kutrup B. (2011). A comparison of skeletal muscle protein bands in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) and *Pelophylax caralitanus* (Arıkan, 1988) populations in Turkey using SDS-PAGE. *Turkish Journal of Zoology*, **35**(5): 769-775
- Chen, Z.X., Zheng, J.C., Jiang, Y.L. (1999). A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Research*, **63**: 147-151.
- Chinchar, V.G. (2002). Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Arch Virol*, **147**: 447-470.
- Chinchar, V.G., Bryan, L., Wang, J., Long, S., Chinchar, G.D. (2003). Induction of apoptosis in frog virus 3-infected cells. *Virology*, **306**: 303-312.
- Chinchar, V.G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A.D., Miyaki, T., Seligy, V., Williams, T. (2005). Family Iridoviridae. In: Fauguet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) Virus taxonomy. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*, p145-162.

- Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. (2009). Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. *Curr Top Microbiol Immunol*, **328**: 123-170.
- Chua, F.H.C., Ng, M.L., Ng, K.L., Loo, J.J., Wee, J.Y. (1994). Investigation of outbreaks of a novel disease, 'sleepy grouper disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *J Fish Dis*, **17**: 417-437.
- Cullen, B.R. (2007). Immunology. Outwitted by viral RNAs. *Science*, **317**: 329-330.
- Cullen, B.R., Owens, L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Diseases of Aquatic Organisms*, **49**: 83-92.
- Cunningham, A.A., Garner, T.W.J., Aguilar-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.
- 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 the common frog (*Rana temporaria*). *Philos Trans R Soc Lond B Biology Science*, **351**:1539-1557.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, G.E., Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population decline. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 735-748.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt, A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**: 141-150.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, **287**: 443-449.

- De Voe, R., Geissler, K., Elmore, S., Rotstein, D., Lewbart, G., Guy, J. (2004).
Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box
turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal Zoo Wildlife Medicine*, **35**: 534-
543.
- Drury, S.E., Gough, R.E., Cunningham, A.A. (1995). Isolation of an iridovirus-like
agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Veterinary Record*, **137**:72-73.
- Eaton, B.T, Hyatt, A.D., Hengstberger, S. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis
virus: Purification and classification. *Journal Fish Disease*, **14**: 157-169.
- Eaton, H.E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., Brunetti, C.R. (2007).
Comparative genomic analysis of the family *Iridoviridae*: re-annotating and
defining the core set of iridovirus genes. *Virology Journal*, **4**: 11.
- ERİSMİS U., KONUK M., YOLDAS T., AGYAR P., YUMUK D., KORCAN E. (2014): Survey of
Turkey's endemic frogs for amphibian chytrid fungus *Barrachochytrium*
dendrobatidis. *Diseases of Aquatic Organisms*, in press - doi: 10.3354/dao02742
- ERİSMİS U.C. And CHINSAMY A. (2010). Ontogenetic Changes in the Epiphyseal
Cartilage of *Rana (Pelophylax) caralitana* (Anura: Ranidae). *The Anatomical*
Record, **293**: 1825–1837
- Essbauer, S., Ahne, W. (2002). The epizootic haematopoietic necrosis virus
(*Iridoviridae*) induces apoptosis in vitro. *Journal Veterinary Medicine B*
Infection Disease Veterinary Public Health, **49**: 25-30.
- Fijan, N., Matašin, Z., Petrincec, Z., Valpotic, I., Zwillenberg, L.O. (1991). Isolation of
an iridovirus-like agent from green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*,
61: 151-158.

- Fisher M.C., Garner, T.W.J. (2007). The relationship between the introduction of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, **21**: 2–9.
- Fisher, M.C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D.A., Walker, J., Selway, L., Brown, A.J.P., Walker, L.A., Gow, N.A.R., Stajich, J.E., Garner, T.W.J. (2009). Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology*, **18**: 415-429.
- Fox, S.F., Greer, A.L., Torres-Cervantes, R., Collins, J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72**: 87-92.
- Galli, L., Pereira, A., Márquez, A., Mazzoni, R. (2006). Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture*, **257**: 78–82.
- Gantress, J., Maniero, G.D., Cohen, N., Robert, J. (2003). Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. *Virology*, **311**:254-262.
- 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.
- Gibson-Kueh, S., Netto, P., Ngoh-Lim, G.H., Chang, S.F., Ho, L.L., Qin, Q.W., Chua, F.H., Ng, M.L., Ferguson, H.W. (2003). The pathology of systemic iridoviral disease in fish. *Journal of Comparative Pathology*, **129**: 111-119.
- Gobbo, F., Cappellozza, E., Pastore, M.R., Bovo, G. (2010). Susceptibility of black

bullhead *Ameiurus melas* to a panel of ranavirus isolates. *Diseases of Aquatic Organisms*, **90**: 167-174.

Göçmen B., Veith M., Iğci N., Akman B., Godmann O., Wagner N. (2013). No Detection Of The Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* İn Terrestrial Turkish Salamanders (*Lyciasalamandra*) Despite İts Occurrence İn Syntopic Frogs (*Pelophylax bedriagae*). *Salamandra*, **49(1)**: 51-55

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*.

Goorha, R. (1981). Frog virus 3 requires RNA polymerase II for its replication. *Journal of Virology*, **37**:496-499.

Goorha, R. (1982). Frog virus 3 DNA replication occurs in two stages. *J Virol*, **43**: 519-528.

Goorha, R., Granoff, A. (1974). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. I. Virus-specific protein synthesis and its regulation. *Virology*, **60**: 237-250.

Goorha, R., Murti, G., Granoff, A., Tirey, R. (1978). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VIII. The nucleus is the site of frog virus 3 DNA and RNA synthesis. *Virology*, **84**: 32-50.

Goorha, R., Granoff, A., Willis, D.B., Murti, K.G. (1984). The role of DNA methylation in virüs replication: inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine. *Virology*, **138**: 94-102.

Gökgöl Ve Işıklı Gölleri Yönetim Planı Alt Projesi I. Gelişme Raporu (2009). T.C. Çevre Ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma Ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü

Sulak Alanların Yönetim Planlarının Hazırlanması Projesi.

- Granoff, A., Came, P.E., Breeze, D.C. (1966). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue. *Virology*, **29**: 133-148.
- Greer, A.L, Berrill, M., Wilson, P.J. (2005). Five amphibian mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, **67**: 9-14.
- He, J.G., Lu, L., Deng, M., He, H.H., Weng, S.P., Wang, X.H., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M. (2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, **292**:185-197.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S. (1995). Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Veterinary Research*, **26**: 423-427.
- Huang, Y., Huang, X., Liu, H., Gong, J., Ouyang, Z., Cui, H., Cao, J., Zhao, Y., Wang, X., Jiang, Y., Qin, Q. (2009). Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. *BMC Genomics*, **10**: 224.
- Hyatt, A.D., Gould, A.R., Zupanovic, Z, Cunningham, A.A., Hengstberger, S., Whittington, R.J., Kattenbelt, J., Coupar, B.E. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology*, **145**: 301-331.
- Hyatt, A.D., Williamson, M., Coupar, B.E., Middleton, D., Hengstberger, S.G., Gould, A.R., Selleck, P., Wise, T.G., Kattenbelt, J., Cunningham, A.A., Lee, J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *Journal of Wildlife Disease*, **38**: 239-252.
- 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
- Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W., Jacobs, B.L. (2010). Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family *Iridoviridae*) *Journal of Virology*, **84**: 2636-2647.
- Jancovich, J.K., Bremont, M., Touchman, J.W., Jacobs, B.L. (2010). Evidence for multiple recent host species shifts among the Ranaviruses (family *Iridoviridae*). *Journal of Virology*, **84**: 2636-2647.
- Jancovich, J.K., Mao, J., Chinchar, V.G., Wyatt, C., Case, S.T., Kumar, S., Valente, G., Subramanian, S., Davidson, E.W., Collins, J.P., Jacobs, B.L. (2003). Genomic sequence of a ranavirus (family *Iridoviridae*) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, **316**: 90-103.
- Jancovich, J.K., Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Zhang, Q.Y. (2011). Family *Iridoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, p193-210.
- Johnson, A.J., Pessier, A.P., Jacobson, E.R. (2007). Experimental transmission and induction of ranaviral disease in Western Ornate box turtles (*Terrapene ornata ornata*) and reared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Pathology*, **44**: 285-297.
- Johnson, A.J., Pessier, A.P., Wellehan, J.F., Childress, A., Norton, T.M., Stedman, N.L., Bloom, D.C., Belzer, W., Titus, V.R., Wagner, R., Brooks, J.W., Spratt, J., Jacobson, E.R. (2008). Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoises in the United States. *Journal of Wildlife Disease*, **44**:851-863.

- Karling, J.S. (1977). Chytridiomycetarum Iconographia: An Illustrated and Brief Descriptive Guide to the Chytridomycetous Genera with a Supplement of the *Hyphochytriomycetes* (Lubrecht and Cramer, Monticello, NY).
- Kruger, K.M., Hero, J.M. (2006). Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth*, **3**: 171 – 177.
- Kruger, K.M., Hero, J.M., Ashton K.J. (2006). Cost Efficiency In The Detection Of Chytridiomycosis Using PCR Assay. *Disease 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*, DOI: 10.1007/s10393-009-0228-y
- Lai, Y.S., Murali, S., Ju, H.Y., Wu, M.F., Guo, I.C., Chen, C., Fang, K., Chang, C.Y. (2000). Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper iridovirus. *Journal of Fish Disease*, **23**: 379-388.
- Langdon, J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic hematopoietic necrosis (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* and other 11 species of teleosts. *Journal of Fish Disease*, **12**:295-310.
- Langdon, J.S., Humphrey, J.D., Williams, L.M., Hyatt, A.D., Westbury, H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: An iridovirus-like pathogen from redbfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Disease*, **9**: 263-268.

- Langdon, J.S, Humphrey, J.D., Williams, L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Disease*, **11**: 93-96.
- Laurance, W.F., McDonald, K.R., Speare, R. (1996). Australian rain forest frogs: support for the epidemic disease hypothesis. *Conservation Biology*, **10**: 406–413.
- Lesbarre`res, D., Balseiro, A., Brunner, J., Chinchar, V. G., Duffus, A., Kerby, J., Miller, D. L., Robert, J., Schock, D. M., Waltzek, T. and Gray, M. J. (2011). Ranavirus: Past, Present And Future. *Biology Letters*, doi:10.1098/rsbl.2011.0951
- 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.
- Maniero, G.D., Morales, H., Gantress, J., Robert, J. (2006). Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. *Development Comparative Immunology*, **30**:649-657.
- Mao, J., Tham, T.N., Gentry, G.A., Aubertin, A., Chinchar, V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**:431-436.
- Mao, J., Hedrick, R.P., Chinchar, V.G. (1997). Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**:212-220. Mao, J., Green, D.E., Fellers, G., Chinchar, V.G. (1999a). Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians

and fish. *Virus Research*, **63**: 45-52.

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.

Marschang, R.E., Becher, P., Posthaus, H., Wild, P., Thiel, H.J., Muller-Doblies, U., Kalet, E.F., Bacciarini, L.N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Archieve of Virology*, **144**: 1909-1922.

Marschang, R.E., Braun, S., Becher, P. (2005). Isolation of a ranavirus from a gecko (*Uroplatus fimbriatus*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, **36**: 295-300.

Marsh, I.B., Whittington, R.J., O'Rourke, B., Hyatt, A.D., Chisholm, O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molecular Cell Probes*, **16**: 137-151.

Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Bert, W., Ducatelle, R., Fischer, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. And Pasmans, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. Causes lethal Chytridiomycosis in amphibians. *PNAS*, **110(38)**: 15325-15329

Moody, N.J.G., Owens, L. (1994). Experimental demonstration of pathogenicity of a frog virus, bohle iridovirus, for fish species, barramundi *Lates calcifer*. *Disase of Aquatic Organisms*, **18**: 95-102.

Morales, H.D., Robert, J. (2007). Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, **81**: 2240-2248.

- Morales, H.D., Abramowitz, L., Gertz, J., Sowa, J., Vogel, A., Robert, J. (2010). Innate immune responses and permissiveness to ranavirus infection of peritoneal leukocytes in the frog *Xenopus laevis*. *Journal of Virology*, **84**: 4912-4922.
- 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*. *PNAS*, **104** (34): 13845–13850.
- Murti, K.G., Chen, M., Goorha, R. (1985). Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. III. Role of microfilaments in virus release. *Virology*, **142**:317-325.
- Nair, V., Zavolan, M. (2006). Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiol*, **14**: 169-175.
- Nichols, D.K., Lamirande, E.W. (2001). Successful treatment of chytridiomycosis. Froglog 46. <http://www.open.ac.uk/daptf/Froglog/46/FROGLOG-46.html>
- Ogawa, M., Ahne, W., Fischer-Scherl, T., Hoffmann, R.W., Schlotfeldt, H.J. (1990). Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent. *Disease of Aquatic Organisms*, **9**: 187-191.
- OIE. (2006). Epizootic haematopoietic necrosis. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. *World Organisation for Animal Health*, p 82-103.
- OIE. (2011). Diseases listed by the OIE. In: Aquatic Animal Health Code, Chapter 1.3. *World Organisation for Animal Health*

- Omar M.A., Serdar D., Mehmet C.O. (2012). Review of the helminth parasites of Turkish anurans (Amphibia). *Scientific Parasitol*, **13(1)**: 1-16
- 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.
- Öztürk, K. (2002). Küresel İklim Değişikliği ve Türkiye'ye Olası Etkileri. *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **22(1)**: 47-65
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P. (2001). Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Disease of Aquatic Organisms*, **48**: 17-25.
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N., Zwart, P. (2008). Ranavirus-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylototriton kweichowensis*): a case report. *Journal of Veterinary*, **176**: 257-259.
- 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*). *J Veterinart Diagnostic Investigation* **11**: 194–199.
- Picco AM, Karam AP, Collins JP (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.
- Pounds, J.A., M.R. Bustamante, L.A. Coloma, J.A. Consuegra, M.P.L. Fogden, P.N. Foster, E. La Marca, K.L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S.R. Ron, G.A. Sánchez- Azofeifa, C.J. Still, B.E. Young. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, **439**:161–

67.

Pozet, F., Morand, M., Moussa, A., Torhy, C., de Kinkelin, P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish *Ictalurus melas*. *Disease of Aquatic Organisms*, **14**: 35-42.

Plumb, J.A., Grizzle, J.M., Young, H.E., Noyes, A.D., Lamprecht, S. (1996). An iridovirus isolated from wild largemouth bass. *Journal of Aquatic Animal Health*, **8**: 265-270.

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.

Reading, C.J. (2007). Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*, **151**:125–31.

Reddacliff, L.A., Whittington, R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redbfin perch (*Perca fluviatilis* L). *Journal of Comparative Pathology*, **115**: 103-115.

Rohr, J.R., Raffel, T.R., Romansic, J.M., McCallum, H., Hudson, P.J. (2008). Evaluating the links between climate, disease spread, and amphibian declines. *Proceedings National Academy of Science USA*, **105**: 17436–17441.

Ron, S.R., Duellman, W.E., Coloma, L.A. Bustamante, M.R. (2003). Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* **37**(1): 116–126.

Ron, S.R., (2005) Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica* **37**(2): 209–221

- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., Mc 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.
- Song, W.J., Qin, Q.W., Qiu, J., Huang, C.H., Wang, F., Hew, C.L. (2004). Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of Virology* **78**: 12576-12590.
- Sparrow, F.K. (1960). *Aquatic Phycomycetes* (The Univ. of Michigan Press, Ann Arbor, MI), pp. 16–18.
- Tan, W.G., Barkman, T.J., Gregory, C.V., Essani, K. (2004). Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus Ranavirus (family *Iridoviridae*). *Virology* **323**: 70-84.
- Tapiovaara, H., Olesen, N.J., Linden, J., Rimaila Parnanen, E., von Bonsdorff CH (1998). Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Disease of Aquatic Organisms*, **32**: 185-193.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R., Darai, G. (1996). Identification of the gene encoding the DNA (cytosine-5) methyltransferase of lymphocystis disease virus. *Virus Genes*, **12**: 219-229.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R., Darai, G (1998). Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution. *Virus Genes*, **16**: 59-66.
- Tsai, C.T., Ting, J.W., Wu, M.H., Wu, M.F., Guo, I.C., Chang, C.Y. (2005). Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *Journal of Virology*. **79**: 2010-2023.

- Walker, S.F., Bosch,J., James, T.Y., Litvintseva,A.P., Valls,J.A.O., Piña, S., García,G., Abadie Rosa,G., Cunningham, A.A., Hole, S., Griffiths, R. and Fisher, M.C. (2008). Invasive pathogens threaten species recovery programs. *Current Biology* **18(18)**: R853 – R854.
- Walker, S. F., Bosch,J., Gomez,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*. in press.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R., Speare, R. (2004). Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* **10 (12)**: 2100–2105.
- Whittington, R.J., Becker, J.A., Dennis, M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish critical review with emphasis on ranaviruses. *Journal of Fish Disease* **33**: 95-122.
- Whittington, R.J., Reddacliff, G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary*, **72**: 421-424.
- Whittington, R.J., Philbey, A., Reddacliff, G.L., Macgown, A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *Journal of Fish Disease* **17**: 205-218.
- Williams, T.(1996). The iridoviruses. *Advanced Virus Research* **46**: 345-412.
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., Chinchar, V.G. (2005). A decade of advances in iridovirus research. *Advanced Virus Research* **65**: 173-248.

- Willis, D.B., Granoff, A. (1980). Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CpG sequences. *Virology* **107**: 250-257.
- Willis, D.B., Goorha, R., Granoff, A. (1984). DNA methyltransferase induced by frog virus 3. *Journal of Virology*, **49**: 86-91.
- Willis, D.B., Goorha, R., Chinchar, V.G. (1985). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. *Curren Topics in Microbiology and Immunology*, **116**: 77-106.
- Voyles, J., Berger,L., Young,S., Speare,R., Webb,R., Warner,J., Rudd, D., Campbell, R., Skerratt, L.F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with Chytridiomycosis. *Diseases Of Aquatic Organisms*, **77**: 113–118
- Zhang, Q.Y., Xiao, F., Li, Z.Q., Gui, J.F., Mao, J., Chinchar, V.G. (2001). Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Disase of Aquatic Organisms*, **48**: 27-36.
- Zupanovic, Z., Musso, C., Lopez, G., Louriero, C.L., Hyatt, A.D., Hengstberger, S., Robinson, A.J. (1998). Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Disase of Aquatic Organisms*, **33**: 1-9.

İnternet kaynakları

1. <http://www.iucnredlist.org/>
2. <http://www.turkiyesulakalanlari.com>
3. <http://www.bd-maps.net/maps/>
4. <http://www.gordonstate.edu/>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Taner YOLDAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi : BALIKESİR / 24.07.1988
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0506 672 7139 / taner.yoldas@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Savaştepe Anadolu Öğretmen Lisesi (2006)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2011)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2014)

Yayınları (SCI ve diğer) :

- 1- Erişmiş U., Konuk M., Yoldas T., Agyar P., Yumuk D., Korcan E. (2014): **Survey of Turkey's endemic frogs for amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms**, in press - doi: 10.3354/dao02742
- 2-Uğur C. Erişmiş, **Taner Yoldas**, Pınar Ağyar, Serdar Mayda, Muhsin Konuk, Tanju Kaya, Anusuya Chinsamy Turan (2012): “**Antik Mitokondrial DNA Analizi**”: 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, SI – 023, Ege Üniversitesi
- 3-Uğur C. ERİŞMİŞ, Anusuya CHINSAMY, Semra MALKOÇ, Taner YOLDAŞ, Pınar AĞYAR (2014): “**Kemik Paleohistolojisi**”: 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Osmangazi Üniversitesi
- 4-Elif KORCAN, **Taner YOLDAŞ**, Pınar AĞYAR, Fatri PAT, Uğur C. ERİŞMİŞ (2014); “**Amfibilerde Azalma Nedeni İki Patojeni (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus*)' nin Durumuyla İlgili Türkiye' de İlk Kayıtlar**”; 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Osmangazi Üniversitesi

Projeler

1. 110Y154 nolu TÜBİTAK (EVRENA), **Orta ve Batı Anadolu Neojen faunası Equidae (Mammalia) formlarının Histomorfolojik, Moleküler ve Diyajenetik Özelliklerinin İlk İncelenmesi** (Bursiyer Araştırmacı)
2. 113Z139 nolu TÜBİTAK (1001), **İki Amfibi Patojeni *Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus (Iridoviridae)*' nin Quantative Real Time PCR Tekniği ile Türkiyede İlk Tespiti** (Bursiyer Araştırmacı)
3. **Işık Gölde, Real – Time PCR Tekniği ile İki Amfibi Patojeni (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus (Iridoviridae)*)' nin yaygınlığının İlk Kez Saptanması.** (Tez Çalışmam, Araştırmacı) (BAP, 13.FEN.BİL.03)
4. **Taramalı Elektron Mikroskop ile Fosil Asya Fil (*Elephas maximus*)' nin Altçene ve Patella Kemiklerin Histomorfolojik Yapılarının İlk Kez İncelenmesi** (Araştırmacı, BAP, 13.HIZ.DES.05)
5. **Göller Bölgesi Endemik Anadolu Kurbağası (*Pelophylax caralitanus*) Populasyonlarında Chytrid Mantarı *Batrachochytrium dendrobatidis*' in İlk İncelenmesi** (Araştırmacı, BAP, 12.FENED.06)