

**REAL-TİME PCR KULLANILARAK
EĞİRDİR GÖLÜ VE ÇEVRESİNDEKİ
AMFİBİYEN PATOJENLERİNİN
(*Batrachochytrium dendrobatidis*
ve *Ranavirus*) YAYGINLIĞININ
İLK KEZ SAPTANMASI**

Dilay YUMUK

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

Kasım, 2014

Bu tez al, mas, 13 FENED 05 numaral, proje ile BAP taraf,ndan desteklenmi tir.

AFYON KOCATEPE ÜN VERS TES
FEN B L MLER ENST TÜSÜ

YÜKSEK L SANS TEZ

REAL-T ME PCR KULLANILARAK E RD R GÖLÜ VE
ÇEVRES NDE K AMF B PATOJEN N N
(BATRACHOCYTR UM DENDROBAT D S VE RANAV RUS)
YAYGINLI ININ LK KEZ SAPTANMASI

Dilay YUMUK

DANI MAN

Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

MOLEKÜLER B YOLOJ VE GENET K ANAB L M DALI

Kas,m, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Dilay YUMUK tarafından hazırlanan "Real-Time PCR Kullanılarak E irdir Gölü ve Çevresinde ki Amfibi Patojeninin (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Ranavirus*) Yaygınlık, İlk Kez Saptanması, Önlemler, Tez Çalınması, Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin İlgili Maddeleri Uyarınca 10/11/2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından Oynanması ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

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

Üye : Doç. Dr. Uğur Cengiz ERGİN
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

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

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

B L MSEL ET K B LD R M SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yaz,m kurallar,na uygun olarak haz,rlad, ,m
bu tez çal, mas,nda;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde etti imi,
- Görsel, i itsel ve yaz,l, tüm bilgi ve sonuçlar, bilimsel ahlak kurallar,na uygun olarak sundu umu,
- Ba kalar,n,n eserlerinden yararlan,lmas, durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak at,fta bulundu umu,
- At,fta bulundu um eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdi imi,
- Kullan,lan verilerde herhangi bir tahrifat yapmad, ,m,,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya ba ka bir üniversitede ba ka bir tez çal, mas, olarak sunmad, ,m,

beyan ederim.

13.11.2014

mza

Dilay YUMUK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REAL-TIME PCR KULLANILARAK E İRDİR GÖLÜ VE ÇEVRESİNDE K
AMFİBİ PATOJENLERİNİN (BATRACHOCHYTRUM DENDROBATIDIS VE
RANAVİRUS) YAYGINLIĞININ İLK KEZ SAPTANMASI

Dilay YUMUK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı,

Dan, man: Doç. Dr. Safiye Elif KORCAN

Bu ara tirmada, Türkiyenin önemli tatlı su göllerinden biri olan E irdir Gölü ve çevresinde IUCN kriterlerine göre Kırmızı Listede (Red List) nesli tehlike altında bulunan hayvanlarö kategorilerinde yer alan ve azalmakta olduğu ifade edilen *Pelophylax caralitanus* türü üzerinde Real- Time PCR tekni i kullanılarak ölümcül hastalıklara neden oldukları, bilinen iki amfibi patojeni *Batrachochytrium dendrobatidis* ile Ranavirüs genom equivalentlerine ait primeler kullanılarak ilk tespitinin yapılması ve *B. dendrobatidis*in laboratuvar ortamında ilk kez kültüre alınması amaçlanmıştır.

Arazi çalışmaları, 2012 ve 2013 yılları olmak üzere 6 lokalite üzerinde iki tekrar halinde yapılmıştır. 2012 yılında yapılan çalışma sonuçlarında %17,02 oranında *B. dendrobatidis*, %0 Ranavirüs pozitif sonuçlar elde edilirken, 2013 yılında yapılan çalışmada %45,00 oranında *B. dendrobatidis* ve %5,00 oranında Ranavirüs pozitif sonuçları ulaşılmıştır. Ayrıca *B. dendrobatidis* kültür çalışmaları yapılarak mikroskop altında incelenerek sporangia, genç ve olgun sporangif, zoosporangia ve haploid zoospor yapıları rastlanmıştır.

Sonuç olarak, tüm dünyada amfibiler için ölümcül hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinen ve popülasyon azalmalarına neden olan *B. dendrobatidis*in gerek moleküler gerekse mikrobiyal analiz ile diğer polikilotherm hayvanlara kolaylıkla bulaşabilen Ranavirüsün tarama çalışmaları yapılarak ülkemizin ilk kayıtları oluşturulmuştur.

2014, ix + 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirüs

ABSTRACT

M.Sc Thesis

FIRST TIME DETERMINATION OF PREVALENCE OF THE TWO AMPHIBIAN PATHOGEN(*BATRACHOCHYTRUM DENDROBATIDIS* VE *RANAVIRUS*) AROUND E irdir LAKE USING REAL-TIME PCR

Dilay YUMUK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Associate Professor Safiye Elif KORCAN

In this study, two amphibian pathogens were identified on endemic *Pelophylax caralitanus* which is located in E irdir Lake in Isparta and listed as Near Threatened (NT) on Red List by IUCN and also known as to be decreasing, using the Real ó Time PCR (quantitative PCR, qPCR) technique. That two amphibian pathogens are *Batrachochytrium dendrobatidis* and Ranavirus (Frog virüs, FV-3). In E irdir Lake, that pathogen organisms was determined for the first time using qPCR technique with specific primers. And also we aimed grow *B. dendrobatidis* in the medium in laboratuar conditions.

P. caralitanus samples were collected with swab technique for twice between 2012 and 2013 years from 6 localities in field. Results of experiment of 2012 yaer were %17,02 positive for *Batrachochytrium dendrobatidis* and totaly negative for Ranavirus. On the other hands, results of 2013 were %45 positive for *Batrachochytrium dendrobatidis* and %5 positive for Ranavirus. Furthermore, we have examined *B. dendrobatidis* cultures under light microscope and we have detected sporangia, mature and immature sporahifas, zoosporangiums and hapolid zoospores.

Consequently, that two deadly pathogens which responsible deadly disases and decreasing on amphibian populations; determinations of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and Ranavirus (*Iridoviridae*) have been srudied and first records of that pathogens in E irdir Lake have determined.

2014, ix + 56 pages

Key Words: Chytridiomycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, Ranavirus

TE EKKÜR

Bu ara tırman,n konusu, deneysel çal, malar,n yönlendirilmesi, sonuçlar,n de erlendirilmesi ve yaz,m, a amas,nda, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yard,m ve deste ini benden esirgemeyen, her türlü s,k,nt, ve sevincimi benimle payla an çok de erli dan, man hocam Say,n Doç. Dr. Elif KORCANøa te ekkürü bir borç bilirim.

Yapt, ,m,z çal, mayla Türkiyeø de bir ilke imza atmam,z, sa layan ve gerek arazi çal, malar,nda gerekse laboratuvar çal, malar,nda yard,mlar,n, esirgemeyen de erli hocam Doç. Dr. U ur Cengiz ER M øe te ekkürü bir borç bilirim.

Çal, malar,m boyunca bölümümüzün tüm hizmetlerini benden esirgemeyen Biyoloji Bölüm Ba kanl, ,na ve 13 FENED 05 numaral, proje desteklerinden dolayı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Koordinasyon Birimine te ekkür ederim.

Yine çal, malar,m a amas,nda deste ini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü s,k,nt,mda yan,mda olan can,m arkada ,m P,nar A YARøa te ekkürlerimi sunar,m. Tezime sa lad,klar, katk,lar,ndan dolayı, di er laboratuvar da çal, an arkada lar,ma ve Taner YOLDA øa te ekkür ederim.

Bana her konuda destek olan ve hiçbir konuda fedakârl,klar,n, esirgemeyen, verdikleri e itimle bugünlere gelmemi sa layan, yani bana her konuda güç veren sevgili aileme çok te ekkür ederim.

Dilay YUMUK

AFYONKARAH SAR, 2014

Ç NDEK LER D Z N

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TE EKKÜR	iii
Ç NDEK LER D Z N	iv
S MGELER ve KISALTMALAR D Z N	v
EK LLER D Z N	vii
Ç ZELGELER D Z N	viii
RES MLER D Z N	ix
1. G R	1
2. L TERATÜR B LG LER	3
2.1 Chytr,d,omycos,s Hastal, ,	3
2.2 Batrachochytr,um dendrobat,d,s	4
2.2.1 Ya am Döngüsü.....	6
2.2.2 B. dendrobatidis Taraf,ndan Enfekte Olan Baz, Türler	7
2.3 Ranav,rus.....	9
2.3.1 Virion Yap,s, ve Sitopatolojisi	9
2.3.2 Ranavirüslerin Genomik Özellikleri.....	12
2.3.3 Epidemiyolojisi ve Konak Özgüllü ü	14
2.4 Çal, ma Sahas,: E irdir Gölü	16
2.4.1 E irdir Gölü'nün Ev Sahipli i Yapt, , Baz, Türler	18
2.4.2 Gölü Kirleten Ba l,ca Kaynaklar.....	19
2.5 Pelophylax caralitanus (Arikan, 1988)	20
3.MATERYAL VE METOD	23
3.1. MATERYAL.....	23
3.1.1. Çal, mada Kullan,lan Besiyerleri.....	23
3.2.METOD	25
3.2.1. Arazi Çal, malar,.....	25
3.2.2. Batrachochytrium dendrobatidis Kültürlerinin izolasyonu	27
3.2.3. Batrachochytrium dendrobatidis'in Moleküler Analizler le Belirlenmesi27	
3.2.3.1. DNA ekstraksiyon	27
3.2.3.2. Bd için Standart E rinin haz,rflanmas,.....	28
3.2.3.3 Real time PCR i lemi	29

4. BULGULAR	32
4.1 Swap Örneklerinde B. dendrobatidis'in Besiyerinde Tespiti.....	34
4.2 Standart E ri.....	36
4.3 Rt- PCR Sonuçlar,	36
4.3.1 Swap Örneklerinden Bd analiz Sonuçlar,	36
5. TARTI MA SONUÇ.....	38
6. KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇM	55

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	Mesajc, Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
mL	Militre
Cm ²	Santimetre kare
µL	Mikrolitre
M	Molar
mM	Mili Molar
ng	Nanogram
km	Kilometre
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

Bd	Batrachochytrium dendrobatidis
rpm	Dakikada dönü -Rotation per minute
ITS1-3	ITS1-3 gen bölgesi
FV-3	<i>Frog virüs 3</i>
MCP	Major Capsid Protein
IE	Hemen ba ,nda-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 aras, virüs taksonomi toplulu u
SGIV	Singapore grouper iridovirus
RNA POL II	Ribonükleik asit polimeraz II enzimi
UV	Ultra Viyole I ,k
STIV	Soff-Shelled Turtle Iridovirus
IUCN	Uluslar Aras, Do a Koruma Birli i-International Union for Conservation of Nature
qPCR	Kantitatif -Quantative Polimeraz Zincir Reaksiyonu

EK LER D Z N

Sayfa

ekil 2.1 B.dendrobatidis'in ya am döngüsü	6
ekil 2.2 Zarfl, ve zarfs,z ranavirüs virion yap,s,í í í í í í í í í í í í í ..í	10
ekil 2.3 Ranavirüslerin replikasyon döngüsünün özetí í í í í í í í í í í í	11
ekil 4.1 Standart Grafi í	...36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Ranavirüs protein örnekleri ve tahmin edilen fonksiyonlar,	13
Çizelge 2.2	<i>Pelophylax caralitanus</i> ün taksonomik hiyerarşisi.....	20
Çizelge 3.1	Çal, maya dahil edilen lokalitelerin GPS verileri.....	25
Çizelge 3.2	Standart Erişimde Kullanılan DNA Yönlükleri,í í í í í í í í í í ..	28
Çizelge 3.3	Rt- PCR için reaksiyon tüplerinin hazırlanması,í í í í í í í í í í ..	29
Çizelge 3.4	Amplifikasyon Protokolü (PrimerDesign, İngiltere)í í í í í í ..	29
Çizelge 3.5	Ranavirüs primerleri í ..	30
Çizelge 3.6	Rt- PCR protokol koşulları,í í í í í í í í í í í í í í í í í í í ..	31
Çizelge 4.1	Çal, maya dahil edilen lokaliteleri í í í í í í í í í í í í í í í ..	34
Çizelge 4.2	Bd 2012- 2013 verileri í ..	36
Çizelge 4.3	Ranavirüs 2012- 2013 çal, ma sonuçları,í í í í í í í í í í í í ..	37

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 Batrachochytrium dendrobatidis patojenin yayılma alanı, olarak global dağılım haritası,.....	5
Resim 2.2 B.dendrobatidis için öngörülen temel ekolojik niş haritası, Koyu bölgeler B.dendrobatidis ekolojik niş alanı, için uygun olan bölgeler	6
Resim 2.3 E irdir Gölü Haritası,.....	17
Resim 2.4 P. carilatanus yayılma alanı,.....	22
Resim 3.1 Arazi çalınmalar sırasında swap örneklerinin toplanması,.....	26
Resim 3.2 E irdir arazi çalınması,.....	27
Resim 4.1 P. carilatanus vücudunda yara oluşumu.	32
Resim 4.2 P. carilatanus derisinde görülen k zarıklıklar	32
Resim 4.3 Derileri kaybı gözlenen amfibiler	33
Resim 4.4 P.carilatanus derisindeki lekelenmeler	33
Resim 4.5 Metamorfoz safhasındaki ölü P. carilatanus.....	34
Resim 4.6 Zoosporlar birleştikten sonra Sporangia.....	35
Resim 4.7 Sporahifleri Genç sporahif ve olgun sporahif	35
Resim 4.8 Haploid zoosporlar	35

1. G R

Anadolu, konum itibariyle Asya, Avrupa ve Afrika kıtaları, n kesi me noktasıdır. Türkiye genel olarak yer şekilleri ve Jeolojik özellikleri bakımından çeşitlilik gösteren ve ortalama yükseltisi de fazla olan bir ülkedir. Ayrıca yerküre üzerinde bulunduğu saha, bütün jeolojik devirler boyunca en hareketli sahadır. Bu konumu bakımından iklimsel özellikler, yüksek dağlar, bozkırlar, sulak alanlar, ormanlık ve çalılık alanlar gibi çok farklı ekosistemlere sahip olmasının yanında dört mevsimi de barındırması, biyoçeşitliliğin yoğun olması ve bu biyoçeşitliliğe özgü patojen hastalıklar, da beraberinde getirmektedir.

Bu hastalık etmeni patojenlerden biri, dünya genelinde amfibilerde kütleli ölümlere ve azalmaya sebep olan (Berger 1998, Bosch 2001, Rachowicz 2006) ve gelişmekte olan bulaşıcı, amfibi hastalık, Chytridiomycosis'dir (EID, Daszak 2000). Hastalığa neden olan ajan ise konak spesifitesi düşük olan non-hifal zoosporik fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) türüdür (Daszak 2003). Ekolojik dengenin bozulmasıyla da dağlık alanların genişleten patojen fungus *Bd*'nin amfibi türlerinde azalmalara neden olduğu da bilinen bir gerçektir. Ancak dünyanın birçok ülkesinde çalılık, ırmak ve halen çalılığa devam eden bu patojen fungusun varlığı ile ilgili ülkemizde yeterli kayıt mevcut değildir. Bu çalılık alanların bazıları, en önemli amaçlarından biri amfibi patojeni *Batrachochytrium dendrobatidis*'in Ege gölünde bulunup bulunmadığını araştırmak, olmuştur.

Bir diğer tehlike ise Ranavirüs'tür. Amfibilerdeki ektotermik omurgalı hayvanlarda da rastalanan Ranavirus, Iridoviridae familyası içinde bulunan beş cinsden biri olup özellikle amfibi ve reptillerde enfeksiyona neden olur (Brunner 2007). Ayrıca patojen türleri kurbağalar için Frog 3 Virus (FV-3; Ranavirus), diğer türler Bohle virüsü (BIV), Epizootic haematopoietic necrosis virüsü (EHNV), ranavirüsüdür ve azalmaya neden olduğu bir amfibi patojenleridir (Cullen 2002, Brunner 2005). FV-3 tüm dünya ekolojik ortamlarına yerleşebilen, yayılması kolay ve hızlı olan bir virüstür (Duffus 2008). Ranavirus memelilerde de enfeksiyona yol açan önemli bir gruptur. Birçok hastalık, suya ve su kaynaklı olduğu düşünüldüğünde Ranavirüsün kaynağını saptanması, epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Ayrıca ekolojik dengenin korunması için amfibi türlerinde bulunup bulunmadığını saptanması da gerekli

oldu undan al, mam,z,n bir di er amac, da, Dünya üzerinde yayg,n olan FV-3in, al, ma alan,m,z olarak belirledi imiz E irdir Gölünde bulunup/bulunmad, ,n,n ara t,r,lmas, olmu tur.

Çünkü jeolojik yap,s, bak,m,ndan tektonik bir gl olan E irdir Gölü iklimsel özellikler a, s,ndan da Akdeniz ve karasal iklimin etkisi alt,nda bulunmaktad,r. Ekolojik karakteri itibariyle Bey ehir Gölüne benzerlik göstermekte olup, Gln derin k,s,mlar, orta g,dal,, s, k,s,mlar, ise bol g,dal, özelliktedir. Gl, su ürünleri yönünden zengin bir yap,ya sahiptir. Ayr,ca gölde çok zengin olan tatl,su istakozu (*Astacus leptodactylus*) da fungal oldu u d ünülen ancak etkenin tam olarak belirlenmedi i bir hastal,k nedeniyle tamamen tkenmi tir. Muhtemelen etken fungus, göldeki di er canl,lar, da tehdit etmektedir. Özellikle son y,llarda görülen anur say,s,ndaki azal, nedeninin, keratin dokuda geli e bilen bir fungal enfeksiyon olabilece ini d ndrm tür.

al, mam,zda, E irdir Gölüne endemik *P. caralitanus* türünde ki azal, ta *Bd* ve FV-3 n etken olup olmad, , son y,llarda kullan,lmaya ba lanan güvenilir, h,zl, bir teknik olmas, nedeniyle Real time PCR (Rt- PCR) yöntemi ile tespit edilmesi amalanm, t,r. Bu al, ma Anadolu endemi i olan *P. caralitanus* da *Bd* ve FV-3 n saptand, , ilk al, ma olmas, nedeniyle önem ta ,maktad,r.

2. L TERATÜR B LG LER

2.1 Chytridomycosis Hastalığı

Chytridiomycosis, bulaşıcı, bir amfibi hastalığıdır (EID, Daszak 2000) ve kurbağa popülasyonlarında yaygın global bozulmalara neden olarak dünya genelinde amfibilerde kütleli ölümlere ve azalmaya sebep olmaktadır (Berger 1998, Bosch 2001, Rachowicz 2006).

İlk olarak Panama ve Avustralya'da yabancı kurbağa popülasyonlarında hızla düşüşe geçtiğinin tespit edilmesi üzerine Güney Amerika, Merkez Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa ve Yeni Zelanda'da tanımlanması yapılmıştır. Vahşi ve endemik popülasyonlarında her ikisinde de tespit edilmiş ve iki amfibi takımı kapsadığı, 14 familya ve 93 türün dünya çapında temsilini yapılmıştır. İlk kayıtlar 1974'de toplanan Kuzey Amerika *Rana pipiens* de tespit edilmiş ve Chytridiomycosis eldeki kayıtlarla dünya çapında amfibi hastalıkları, açığa çıkan, gelişmekte olan bulaşıcı hastalık olarak tanımlanmıştır.

Chytridiomycosis, *B. Dendrobatidis* tarafından sürekli olarak cildin enfeksiyonuna bağlı bir hastalıktır. Chytridlerin bulaşması, su aracılığıyla tanımlanan zoosporlar ve anur larvalarında ağız parçaları parazit olmasıyla, amfibilerin post metamorfik safhada enfeksiyona maruz kalmasıyla olur. Fakat bazı durumlarda larval kaudatlarda da Chytrid oluşumu bildirilmiştir (Berger 1998, Longcore 1999, Marantelli 2004, Kriger and Hero 2007, Brodman ve Briggler 2008).

Chytridiomycosis oluşumunda, amfibi epidermisi arasındaki elektrolit kaybı, % 50'ye kadar engellenir, hücre sitoplazmasındaki sodyum ve potasyumun konsantrasyonu düşer ve asistolik kalp durması, ölümlere sebep olabilmektedir (Voyles 2009). Çünkü sağlıklı amfibi iç dengesinin korunmasında önemli faktörlerin başında gelmektedir ve deri fonksiyonunu bozan nedenin doğrudan *B. dendrobatidis*'in metabolitlerinin oluşumu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Voyles 2009).

2.2 Batrachochytrium dendrobatidis

Batrachochytrium dendrobatidis, Chytridiomycota filumuna (ube), Chytridiomycetes clasisine (s,n,f), Chytridiales ordosuna (tak,m) ait (Hyatt 2007), kozmopolit ve geni da ,l,ma sahip olan heterotrofik bir fungus türüdür (Sparrow 1960, Karling 1977).

Chytridiomycota filumunun üyeleri küçük küresel mantarlard,r ve her yerde kozmopolit olarak yay,l, gösteren heterotrofik funguslard,r. Farkl, hayat döngüleri ve gereklilikleri bulunmaktad,r. Ba l,ca toprak ve suda bulunurlar, genellikle bulunduklar, ortamda yüzeyleri kullanarak (kitin, keratin ve bitki tortular,) indirgenerek ya da saprofit olarak hareket ederler. Baz, cinsler fakültatif ya da obligat anaeroblard,r ve birço u mantarlar,n, alglerin, tohumlu bitkilerin, rotiferlerin, nematodlar,n ya da böceklerin obligat parazitleridir. Burada bildirilen chytrid Chytridiomycota filumunun omurgal, paraziti olarak kabul edilen ilk üyesidir (Barr 1990).

*Batrachochytrium dendrobatidis*ın Panama ve Avustralyaø da amfibi türlerindeki ani azal, ,n sebebi oldu u bildirilmi tir (Berger 1998). Bu patojenin orjininin, Güney Afrika Müzesi, Cape Town (SAMZR 18927) 1938 y,l, kay,tl, *Xenopus leavis* örne ine dayand, , anla ,lm, ve iklim de i ikli i, dünya üzerinde yap,lan kurba a ticareti nedeniyle yay,ld, ,n, saptayarak Afrika, Güney Amerika, Orta Amerika, Kuzey Amerika, Avrupa, Asya ve Yeni Zellandaø da 287 amfibi türünde ve 25 familyas,nda *B. dendrobatidis* türünü tespit edilmi tir (Garner 2005, Skerratt 2007, Bovero 2008). *B.dendrobatidis* ilk olarak 1998 de mavi zehirli dart frogdan (*Dendrobates auratus*) izole edilmesinden dolay, bu ekilde isimlendirilmi tir. *B.dendrobatidis*, chytridiomycota filumuna ait konak omurgal,da hastal, a ve ölüme sebep oldu u bilinen ilk ve tek üyedir.

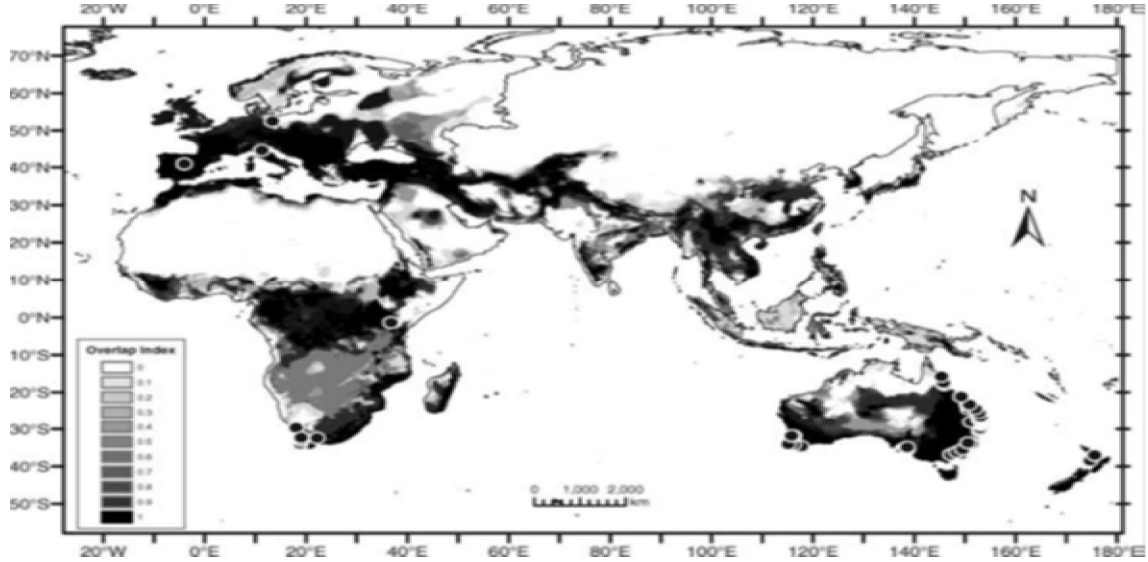


Resim 2.1 Batrachochytrium dendrobatidis patojenin yıllara bağlı olarak global dağılım haritası, (Kriger, 2009)

Bu amfibi chytrid fungusu toplu ölümlerin, nüfus çökmelerinin ve amfibi türlerinin yok olmasının sebebi olarak kabul edilmektedir. Özellikle enigmatik olarak tanımlanmış azalılarının birçoğunun sebebi olduğu da bilinmektedir. Bu azalılar hastalık tarihinde kaydedilen biyolojik çeşitliliğin olağan üstü omurgalı kaybına sebep olarak karakterize edilmiştir. Bir amfibi topluluğuna, *B. dendrobatidis*'in girişi ile mortaliteye bağlı olarak hızlı nüfus düşüşüne yüksek oranda neden olabilir (Lips 2006, Rachowicz 2006).

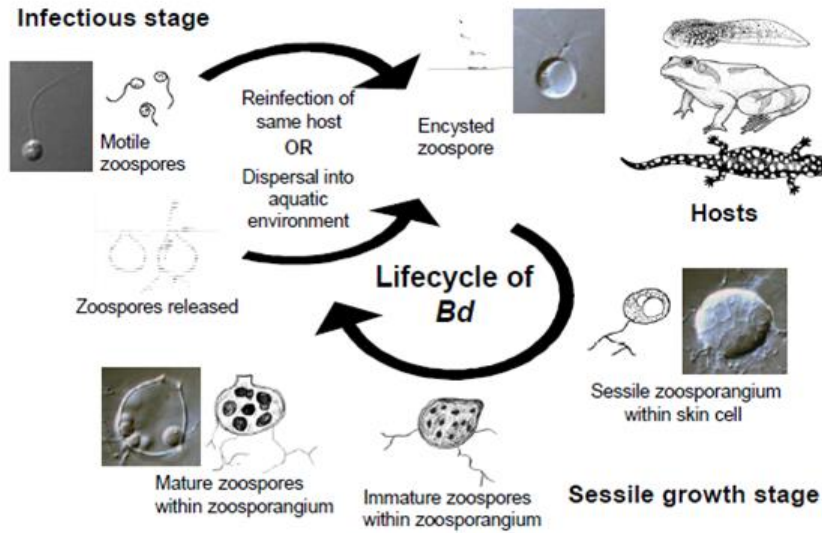
Çünkü, *B. dendrobatidis* enfeksiyonları, patofizyolojik değişimlerle ilişkilidir ve bu değişimler hastalık durumuna (chytridiomycosis) öncülük etmesinin yanında potansiyel olarak ölümlere de sebebiyet vermektedir.

Hastalık nedeni olan bu ajan, non-hifal zoosporik bir fungusdur ve konak spesifitesi düşüktür (Daszak 2003). Yapılan çalışmalar, malarda farklı yükseltilerde bulunan amfibi türlerinde Chytridiomycosis olduğu belirlenmiş ve iklim değişikliğinin (sıcaklık, rüzgarlar, nem ve yağış oranları gibi) etkisiyle hızla yayıldığı, tespit edilerek muhtemel risk taşıyan bölgeleri ile ekolojik nicelikleri haritalandırılmıştır (Berger 2005).



Resim 2.2 *B.dendrobatidis* için öngörülen temel ekolojik ni haritası. Koyu bölgeler *B.dendrobatidis* ekolojik ni alan, için uygun olan bölgeler (Kriger and Hero, 2007)

2.2.1 Yaşam Döngüsü



Resim 2.1 *B.dendrobatidis*'in yaşam döngüsü

B.dendrobatidis'in yaşam döngüsü 2 ana evreden oluşur, ilki hareketli safha, bu safhada zoospore ile taşınabilir ve yeni konaklara ulaşabilir zoospore bu evrede kısa ömürlüdür. İkinci safha ise zoosporangium (sporangium olarak da bilinir) içinde çoğalabilir ve gelişimi durduran evredir. Bu evrede monosentrik tallus ve eysiz çoğalma için bir

zoosporangium içinde bulunur. *B.dendrobatidis* konakta katlanm, deri epiteline uyum sa lar ve talli epidermis hücresi içinde ya ar, ilk olarak parazitizm birkaç tabaka derinliktedir ve geli me h,z, hücrenin geli im h,z, ile çak, ,r. *B.dendrobatidis* ilk olarak canl, hücreler içinde geli ir, ama talli zoosporangia olarak bilinen *B.dendrobatidis*lerin geli imini ölü, yüzeysel ve keratinize olmu hücrelerde tamamlan,r. Zoosporangia yüzeyinde ve vücudun distal k,sm,nda aç,lan bir bo alt,m kapa , ile zoosporlar çevreye yay,ırlar. Yeti kin ve iriba lardaki sporangia da ,l,m,; *B.dendrobatidis*, bir parazit oldu unda tabakalanm, ve keratinize epidermise ihtiyaç duymakta oldu unu göstermi tir (Berger 1998). Genç sporangialar daha derinlerdeki prekeratin içeren hücreler içinde geli ebilirler. Kültür ortam,nda ki ve deride ki ya am siklusu ayn,d,r. n vitro ortamdaki ya am siklusu 22 °C de 4 ile 5 gün sürmektedir. Dirençli dinlenen sporlar bulunmam, t,r yani *B.dendrobatidis*in sporlar,n,n dinlenme (uyku) faz, yoktur (Berger 2005).

25 °C üzerinde epidermal devir oran, artarken *Bd* büyüme h,z, yava lar (Piotrowski 2004), böylelikle s,cakl,k art, ,nda infeksiyon kaybolur (Berger 2004). *Bd* geni aral,ktaki çevre ko ullar,nda ya ayabilir; çe itli s,cakl,k ve ya , rejimi gibi (Ron 2003). *B.dendrobatidis*in laboratuvar ortam,nda ki optimum geli me s,cakl, , 17-25 °C dir, 28 °C de organizma geli imi durur ve 29 °C de bir hafta içinde ölür (Longcore 1999, Piotrowski 2004).

2.2.2 B. dendrobatidis Taraf,ndan Enfekte Olan Baz, Türler

Son 40 y,ld,r, birçok amfibi türü dünya çap,nda dramatik bir azal, göstermektedir. Son zamanlarda ki küresel de erlendirmelere göre (nt. Kyn. 1) 1/3 -i ya da dünyadaki 6593 amfibi türünün %32øsi büyük tehlike alt,ndad,r. 122 amfibi türü 1980 den beri yok olma tehlikesindedir ve populasyon büyüklükleri %43 oran,nda azalm, t,r. Bu toplu amfibi azalmalar,n,n birçok nedeni olmas,na kar ,n yap,lan çal, malar en önemli nedenin patojenler oldu unu ortaya koymaktad,r.

B. dendrobatidis Avrupa Birli inde yayg,n olarak; spanya, talya, Almanya, Belçika, ngiltere, Fransa, sviçre, Avusturya, Macaristan, Danimarka ve Portekiz'de bulunmu tur.

Dünya da ki amfibi ticareti enfekte hayvanlar,n saf populasyonla tan, mas,yla

chytridiomycosis in ortaya ,kmas,n, kapsar. Kabul edilir ki; *B. dendrobatidis*, ngiltere'de Amerikan Bullfroglar ya da Afrikal, Peneli Kurba alar ile birlikte ortaya ,km, lard,r. ngiltere'deki enfekte olmu bullfroglar; *Rana temporaria*, *Lissotriton vulgaris*, *Triturus cristatus* ve *Bufo Bufo* nun ,slah, için kullan,lan küçük göletlerde meydana gelmi dir (Cunningham 2005). Yayg,n olan kara kurba alar, enfeksiyona daha duyarlı oldu undan *B. Dendrobatidis* e ba l, olarak bu türlerde azalmalar meydana gelmi tir (Bosch and Martinez-Solano 2006).

Fransada, *B. Dendrobatidis* Amerikan bullfroglar,nda tespit edilmi tir (Garner 2006). En az 3 amfibi türü (*Alytes obstetricans*, *Salamandra salamandra* ve *Bufo bufo*) chytridiomycosis nedeiyle spanyada ölümler ya amaktad,r (Bosch 2001, Bosch ve Martinez-Solano 2006). Daha da ötesinde, *B. calamita*, *Hyla arborea*, *Rana iberica*, *R. perezi*, *Triturus alpestris* ve *T. Marmoratus*lerde de tespit edilmi tir (nt. Kyn. 2).

talyadaki ilk *B. Dendrobatidis* kayd, 2001 y,l,nda *Bombina pachypus* da tespit edilmi tir (Stagni 2004). Bununla birlikte, chytridiomycosis *Rana latastei* ve kuzeydeki Amerikan bullfrog populusyonunda tespit edilmi tir (Garner 2006).

Umbriadaki *Rana kl. esculenta/R. Lessonae* populusyonunda ve Turinde de tespit edilmi tir. Simocelli ve arkada lar, su kurba alar,nda herhangi bir lme rastlamam, lard,r fakat tüm enfekte vakalar,nda yo un insan kaynaklı bask,y, bir not olarak dmlerdir. *B. Dendrobatidis* ayr,ca Sardiniadaki endemik populusyonlarda da tespit edilmi tir (Bovero 2008).

Almanyada enfekte olan *Rana arvalis*, *R. esculenta* ve *R. esculenta synkleptonu* bulunmu ve yap,lan al, malar Almanyada oldukça yayg,n oldu unu ortaya koymaktad,r.

svirede *A. Obstetricans* ve Portekizde *Pleurodeles waltl* enfekte omu lard,r. Scalera ve arkada lar, *B. dendrobatidis*ın Danimakada bulunan kurba alardaki görülme s,kl, , üzerine bir al, ma yapm, lard,r. Her iki türde de funguslar tespit edilmi ve patojenleri tespiti için ileri a amada al, malar gerekli oldu u ortaya konmu tur.

B. Dendrobatidis pozitif amfibiler 2009da Hollanda çevresinde de görülmü tür.

Amfibilerin %40'üne gelen bir oranda testler *B. Dendrobatidis* için pozitif çıkmış, t.r. Alp semenderi, yumu ak semender, ebe kurbağa ve havuz kurbağalar, da *B. dendrobatidis* için pozitif çıkmış, doğal türlerdir.

B. dendrobatidis Sucul Hayvan Sağlığı, Standartlar, Komisyonu (OIE) tarafından amfibi hastalıklar, grubundaki özel öneme sahip 2 patojenden biri olarak kabul edilmiştir (Diğerleri ise Iridoviridae familyasındaki Ranavirus cinsidir) (OIE 2006).

2.3 Ranavirus

1965'te ilk Ranavirusler, kuzey leopar kurbağasından (*Lithobates pipens*) Allan Gronof tarafından izole edildi. 1980'lerin sonunda İrlanda'da viruslerin bir serisinin çalınmasıyla birlikte ekolojik ve ekonomik açıdan önemli olan balık, kurbağalar ve daha sonra sürüngenlerin ölümlerinde ranaviruslerin ajan olabilecekleri düşünülmüştür.

Ranavirusler günümüzde kuzey ve güney Amerika, Avrupa, Asya ve Avustralya'daki su kültürlerinde, hayvan ve vahşi populasyonlarda identifiye edilmiştir. Onların genetik yapıları, sınıflarının olması, ranavirusleri evcil ve vahşi populasyonlarda özellikle amfibilerde yaygın hale getirmiştir.

Dünya Hayvan Sağlığı, Organizasyonu (OIE), ranavirüsleri *epizootic hemotopoiteik nekrozu virüsü* (EHMV), bir balık ve amfibi patojeni olarak tanımlar (OIE 2011). Ranavirüsler geniş varyete de balık, amfibi ve hücre ölümüne sebep olur. Tüm hayvanlarda patojenite, viral izolata, konağına ve coğrafik durumuna bağlıdır (Chinchar 2005). Ranavirüslerin bazıları konağına özgü olsa bile bazı izolatlar hem balıklarda hem de amfibilerde görülür (Moody 1980 Wens 1994).

2.3.1 Virion Yapısı ve Sitopatolojisi

Iridoviridae familyasındaki üyeleri büyük çift iplikli DNA virüsleridir ve genellikle 120-200 nm çapında olup ikozohedral simetri gösterirler (Chinchar 2002). Virionun çekirdeği tanımlayıcı kapsid bileşimi ve transmembran proteinler içeren lipid bir zar tarafından sarımsaklı nükleoprotein filament içerir (Jancovich 2011). Virionlar konak hücre membranını tomurcuklanarak bir zara sahip olabilirler ve zarflı virionlar

olarak adlandırılır. Bunlar yüksek seviyede spesifik enfeksiyona sahip olmasına rağmen zarflı ve zarfsız virionlar her ikisinde enfeksiyondür (Braunwald 1979).

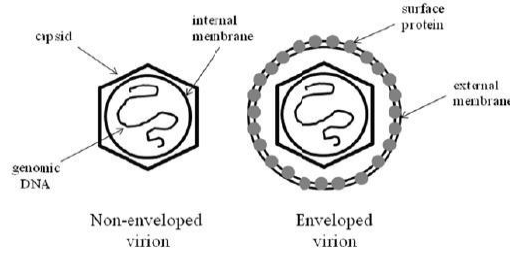


Figure 1. Structure of non-enveloped and enveloped rana virus virions.

ekil 2.2 Zarflı ve zarfsız rana virüs virion yapısı,

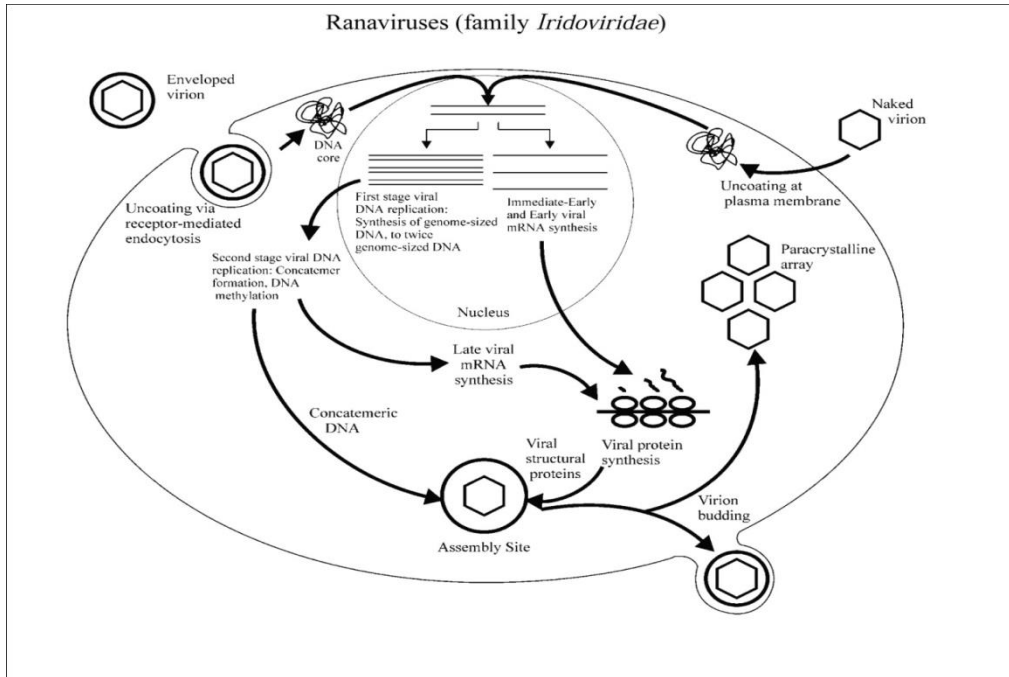
Ranavirüsler, sürüngenler, balıklar ve amfibilere ek olarak balık, kurbağa ve memeli hücrelerini içeren omurgalı hücrelerinde de enfeksiyon yeteneğini gösterebilir (Jancovich 2011). Virüs bilinmeyen bir reseptör vasıtasıyla hücre ortamına iki şekilde ulaşabilirler. Bu giriş yolu ya endositosiz ile konak hücreye girmeleri (zarflı parçacıklar) ya da sadece görünümünü hücre içerisine aktarmak (zarfsız partiküller) yoluyla olur (Chinchar 2002). Zarfsız girişten sonra DNA çekirdeğe nükleusa aktarılır ve burada immediate early (IE) ve delayed early (DE) viral transkriptleri hücresel RNA polimeraz II tarafından sentezlenir (Goorha 1978, Goorha 1981). Transkriptlerden birisi; viral DNA polimeraz, çekirdekte viral DNA sentezini katalizlemektedir (Goorha 1982, Chinchar 2002). Viral DNA replikasyonunun 2. fazı, sitoplazmada gerçekleşir. Yeni sentezlenen DNA parçaları ve 10 genomdan daha büyük boyutta konsatamerik protein parçaları rekombine edilir (Goorha 1982). Geç viral mRNA transkripsiyonu da 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).

Translasyon sonrası, üretimi ne geni ölçüde ne de glikozilasyon, sülfatilasyon ya da tespit edilen ranavirüs öncül proteinlerinden ayrılma gerektirir (Chinchar 2005).

Ranavirüs DNA'sında ki CpG geni adakları, yüksek seviyede metillenmiş bölgeleri belirler (Willis and Granoff 1980, Eaton 1991) ve viral DNA sitoplazmada virüs tarafından kodlanan sitozin DNA metil transferaz enzimi ile metillenir (Willis 1984). Viral DNA metil transferaz enzimi FV-3 ve diğer irido virüslerinden moleküler olarak karakterize olmuştur (Kaur 1995, T dona 1996, Mao 1996). Bu metilasyonun viral

DNA'yı, virüs tarafından kodlanan endonükleazlardan koruduğu düşünülmektedir (Goorha 1984). Diğer bir yandan ranavirüslerin en az 1 tanesi *Singapore grouper iridovis* (SGIV) DNA metil transferaz enziminden yoksundur (Song 2004) ve bu durum viral DNA metilasyonunun başka bir rolü de olduğunu göstermiştir. Böylece; metillenmemiş CpG adalar, içeren bakteriyel DNA, doğuştan gelen bakteriyel DNA'nın akabinde reseptör 9 (TLR9) aracılığıyla, tespit edilmiştir (Baver 2001). Buda onu göstermektedir ki ranavirüsler kendi genomlarına konak immun sistemini indirmek için metilleyebilirler (Williams 2005).

Virionun hücreye girişi viral proteinlerin girişi bölgelerine taşınmasıyla olur ve konsantrik viral DNA bazı mekanizmalar ile virionlar içinde paketlenir. Böylelikle halkasal permütasyon jenerasyonları ve terminal yedek genom oluşturur (Chinchar 2002). Virionlar hücreden doğrudan plazma membranına zarf parçalarıyla ya da sitoplazma içinde geni parakristalin dizileri şeklinde depolanarak tomurcuklanma şeklinde çıkarılır (Chinchar 2002). Ranavirüslerin replikasyon döngüsü aşağıda özetlenmiştir.



ekil 2.3 Ranavirüslerin replikasyon döngüsünün özeti (Chinchar (2002) tarafından Springer-Verlag Wien izni ile tekrar çizilmiştir).

FV-3, 12 - 32°C arasında replike olur ve 55°C'den daha yüksek sıcaklıklarda 30 dak. kaldığında ya da UV radyasyonuna maruz kaldığında inaktif olur (Chinchar 2002, Jancovich 2011). Ranavirüsler 1 yıl boyunca +4°C ya da -70°C'de saklandıklarında infektivitelerini korurlar (Bailey 2007). Bazı ranavirüsler kurumaya hassas iken BIV

42°C'de 6 haftalık kurutma işleminden sonra da infektivitesini korumu tur (Jancovich 2011). Hücre kültüründe ranavirüslerin replikasyonu hızlıdır. Viral makromoleküller sentezleri ve sitopatik etkileri (CPE) infeksiyondan sonraki birkaç saat içinde tespit edilebilmektedir (Goorha- Granoff 1974). Konak hücrelerinde ki fonksiyonlarda ise ranavirüs infeksiyonu konak hücrelerinin DNA, RNA ve protein sentezini hızlı bir şekilde inhibe eder ve hücre yapısını tekrar düzenlenmesini sağlar (Murti 1985, Willis 1985, Chinchar 2002). Ranavirüslerin konak hücrelerinde apoptozisin karakteristik septomları da neden olduğu gösterilmiştir (Zhang 2001, Essbauer- Ahne 2002, Chinchar 2003). Viral gen ekspresyonu apoptozis tetiklenmesinde gerekli değildir ama bunun programlanmış hücre ölümünde virion proteinleri tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak etkisi olup olmadığı henüz belirlenmemiştir (Chinchar 2003).

2.3.2 Ranavirüslerin Genomik Özellikleri

Ranavirüs genomu tek, lineer, çift zincirli DNA molekülüdür. Tüm genom sekansı, 7 ranavirüs izolatı, içinde neredeyse tamamlanmıştır. Bu izolatlar FV-3 (Tan 2004), EHNV (Jancovich *et al.* 2010), ATV (Jancovich 2003), *tiger frog virüs* TFV (He 2002), *Soff-shelled turtle irodo virüs* STIV (Huang 2009), *grouper irodovirüs* GIV (Tsai *et al.* 2005) ve *singapore grouper irodovirüs* SGIV (Song 2004) dir. Bunlardan; EHNV, SGIV ve GIV orijinal olarak balıktan, FV3, ATV ve TFV amfibilerden, STIV ise reptillerden izole edilmiştir.

Bu izolatların genom uzunluğu 105-140 kbp arasıdır ve GC içeriği % 48-55 ve potansiyel açık okuma uçları, (ORFs) 92-139 arasıdır. İzolatların ORFleri 32 den 1300 aminoasit uzunluğuna kadar değişmektedir ve DNA replikasyonunda, tamirinde, transkripsiyonunda nükleotit metabolizmasında, virion yapısında, virüs konak etkileşimlerinde görev alan proteinleri kodlamaktadırlar. Ranavirüs protein örnekleri ve tahmin edilen fonksiyonları aşağıdaki tablo da gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 Ranavirüslerdeki kodlanan protein örnekleri ve onların tahmin edilen görevleri (He 2002, Tsai 2005, Huang 2009, Jancovich 2010)

Fonksiyonu	Protein
DNA replication and repair	DNA polymerase
	Thymidine kinase
	NTPase/helicase
Transcription of DNA	RNA polymerase II
	Transcription elongation factor IIS
	Ribonuclease III (RNase III)
Nucleotide metabolism	Ribonucleotide reductase and subunit (RNR and)
	Thymidylate synthase (TS)
	Deoxyuridine trisphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase)
	Major capsid protein (MCP)
Structural protein	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

Genomların tümü tekrarlayan sekanslar içerirler ve bu sekansların gen regülasyonunda, transkripsiyonunda ve virüslerin protein fonksiyonlarında rol aldıkları, düşünülmektedir (Kashi and King 2006). Kodlanmayan RNA'lar örneğin mikroRNAs (miRNAs) STIV genomunda tanımlanmıştır (Huang 2009). Memeli virüslerinde miRNAs'lar, konak immün sistemine cevap olarak, apoptozis viral yaşam döngüsünü ve gen ekspresyonu düzenlenmesi tarafından oluşturulan enfeksiyonda rol oynamaktadırlar (Nair and Zauolan 2006, Cullen 2007).

Ranavirüs vironunun temel yapısal bileşeni MCP'dir. MCP'nin boyutu tipik olarak 50 kDa ve total virion proteinlerinin %40-45'ini oluşturmaktadır (Williams 1996). MCP geni, *Iridoviridae* familyasında, içinde yüksek seviyede korunmuş ve bu aminoasit sekans kimliğini ortaya koymaktadır.

Tüm genom sekanslarının filogenetik analizlerine bağlı olarak EHNV, ATV, FV3, STIV ve TFV birbirleriyle yakın ilişkilidirler ve diğer ranavirüslerden GIV ve SGIV'den ayrı gruplardır (Eaton 2007, Huang 2009, Jancovich 2010).

2.3.3 Epidemiyolojisi ve Konak Özgüllü ü

30 y,1 önce birçok amfibi türünü dünya çap,nda dramatik bir azal, gösterdi i bildirilmi tir. Son zamanlarda ki küresel de erlendirmelere göre (nt. Kyn. 1) 1/3 -i ya da dünyadaki 6593 amfibi türünün % 32øsi büyük tehlike alt,ndad,r. 122 amfibi türü 1980 den beri yok olma tehlikesindedir ve popülasyon büyüklükleri % 43 oran,nda azalm, t,r. Bu azal, ,n birçok karma ,k sebebi bulunmaktadır. Bu sebepler aras,nda habitatlar,n yok olmas,, kirlilik ya da avc, türlerin ortama girmesi bunun yan,nda iklim de i iklikleri, UV-b art, , kimyasal kontaminantlar ve infeksiyon hastal,klar say,labilir. Son y,llar da yap,lan çal, malar amfibi popülasyonlar,n,n azalmas,ndaki en büyük etkenin infeksiyon hastal,klar oldu u bildirilmesine ra men ranavirüs ölümleriyle ilgili çok az say,da uzun dönemli veriler bulunmaktadır. Yine de bu virüsün tehlikeli bir patojen oldu u ve be ülkede amfibilerin yok olmas,na neden oldu u bilinmektedir(Gray 2009). Avrupa, Asya ve Amerikaø da ranavirüs kaynakl, kitlesel amfibi ölümleri birçok ara t,r,c, taraf,ndan bildirilmi tir. (Fox 2006, Ariel 2009, Une 2009), Hatta Avusturalyaø da vah i amfibilerden de ranavirüs izole edilmi tir (Speare ve Smith 1992). En fazla ölüm Kuzey Amerikaø da görülmü tür. Muths (2006) 2000 ve 2005 y,llar, aras,nda ranavirüs kaynakl, ölümlerin % 43 oldu unu bildirmi lerdir. Benzer olarak Green (2002) 1996-2001 y,llar, aras,nda ngiltereø deki ranavirüs kaynakl, mortalite oran,n,n % 57 oldu unu belirtmi lerdir. Ranavirüslerin, 14 familyada bulunan en az 72 amfibi türünü infekte etti i bilinmektedir.

OIE kayd,na göre tüm ranavirüsler, amfibiler için patojen olarak bildirildi (OIE 2011). Patojenik deri fungusu *B.dendrobatidise* ek olarak ranavirüsler dünya genelinde amfibi hastal,klar,na sebep olan ajanlar olarak kabul edilir (Chinchar 2002). zole edilen ilk ranavirüs FV3 olup tümör ta ,yan bir kuzey kurba as, (*Lithobates pipiens* eskiden *Rana pipiens*)ø,n böbre inden izole edilmi tir (Granoff 1966).

1990ø lar da Avrupada ki çay,r kurba as, (*Rana temporaria*)ø,n s,rad, , ölümlerinden izole edildi (Drury 1995, Cunningham 1996). ATV Kanadaø da ki hastal,kl, kaplan semenderler (*Ambystoma tigrinum diaboli*) aras,ndan izole edildi (Bollinger 1999). Bir FV3 benzeri ranavirüs hastal,kl, domuz kurba alar,ndan (*Rana grylio*), a aç kurba alar,ndan (*Rana sylvatica*) ve kuzey leopar kurba alar,ndan (*Lithobates pipiens*) (Greer 2005) izole edildi. 1992ø de, BIV Avustralyaø da süslü kaz,c, kurba a

(*Limnodynastes ornatus*)dan izole edilmi tir. rodovirüs gibi ajanlar can çeki en ye il kurba a (*Rana esculenta*)dan izole edildi (Fijan 1991).

Venezüella'da 7 farklı ranavirüs izolat, kara kurba alar,ndan (*Bufo marinus*) bulundu (Zupanovic 1998). Son zamanlarda Belçika ve Hollanda'da ki k,rm,z, kuyruklu pürtüklü semenderde (*Tylotatritan kweichowensis*) ranavirüs infeksiyonunun oldu u saptanm, t,r (Pasmans 2008), ortak bir ekilde spanyada ki ebe kurba alar (*Alytes obstetracians*) ve alp semenderlerinde (*Mesotritan alpestris*) (Balseiro 2009, Balseiro 2009) ve Danimarka'da ki yenilebilir kurba alarda da (*Peolophylax kl. esculentus*) (Ariael 2008) varl, , tesbit edilmi tir.

Reptillerde ranavirüsler, birçok türden izole edilmi tir, ye il pitonlarda (*Chondaptyhon viridis*) (Hyatt 2002), yaprak kuyruklu kertenkeleler de (*Uroplatus fimbriatus*) (Marschang 2005) ve çok çe itli kaplumba alarda da izole edildi (Chen 1999, Marchang 1999, De Voe 2004, Allender 2006, Johnson 2007, Johnson 2008).

Balıklar, infekte eden virüsler EHNV Dünya Hayvan Sa l, , Organizasyonu taraf,ndan (OIE 2011), tek tür olarak kabul edilmi tir. Su kültürlerinde ve do al sucul hayvanlardan zararlı etki gösterdikleri için Avrupa Birli i (AB) epizootic kanamal, nekrozis (EHN) listesine al,nm, t,r (Anonim 2006).

EHNV ilk kez k,rm,z, yüzgeç levrek (*Perca fuliviatialis*) izole edilmi tir. Avustralya'da hastal, ,n salg,n, s,ras,nda gökku a , alabal, ,na da bula t, , saptanm, t,r (Langdon 1986, Langdon 1988). Daha sonra bir di er yak,n ili kili ranavirüs izolat, olan ESV Almanya'da ki yavru yay,n bal, , (*Silurus glanis*) yeti tirme çiftli inden izole edilmi tir (Ahne 1989). Fransa ve talyada Avrupa catfish (ECV) virüsü hastal,kl, bal,ktan izole edilmi tir (Amerus meler previously lctalurus melas) (Pozet 1992, Bovo 1993). Bir di er ranavirüs geni a ,zl, levrek iridovirüsü (LBMV) Güney Carolina, USA daki do al geni a ,zl, levreklerin (*Micropterus Salmoides*) kütleli ölümü üzerine izole edilmi tir (Pumb 1996). Güney Do u Asya'da iki ranavirüs izolat, GIV ve SGIV izolatlar, sar, orfoz (*Epinephelus awoara*)dan izole edilmi (Lai 2000) ve daha sonrada kahverengi benekli orfozda da (*Epinephelus tawina*) bulundu u bildirilmi tir (Chua 1994). Tüm bunlara ek olarak ranavirüsler süs bal, ,ndan (Headrick and Mc Dawell 1995, Paperna

2001, Gibson and Kueh 2003), görünüşte sağlıklı, konaklar olan sudak balı, (*Sander lucioperca*)dan (Tapiovaara 1998) ve kısa kanatlı, yılan balığı, bundan da (*Aguilla australis*) izole edilmiştir (Bang Jensen 2009).

Ranavirüsler balıklar, kurbağalar, ve sürüngenleri infekte edebilir. Ama izolatlar tür, yaş ve coğrafik orjinine göre konak hayvana özgüllük gösterirler (Chinchar 2002, Chinchar 2005) ve bulaşma yolu viral dozaj, çevresel faktörler hastalığın bulaşmasında rol oynarlar (Brunner 2005, Brunner 2007).

2.4 Çalınma Sahası: E irdir Gölü

Ülkemizin jeolojik, jeomorfolojik yapısından kaynaklanan iklimsel özellikler, yüksek dağlar, bozkırlar, sulak alanlar, ormanlık ve çalılık alanlar gibi çok farklı ekosistemlere sahip olması, biyoçeşitliliğin yoğun olması, neden olmakla birlikte bu biyoçeşitliliğe özgü patojen hastalıklara neden olan mikroorganizmalar içinde uygun ortam yaratmaktadır.

E irdir Gölü, Türkiye'nin güneybatısında Isparta iline bağlı, bulunmaktadır. E irdir Gölü Havzası, Türkiye'deki 25 büyük havza içinde yer alan, Antalya havzasıdır, içinde bir alt havza konumundadır ve iklimsel özellikler açısından bakıldığında da Akdeniz ve karasal iklimin etkisi altında bulunmaktadır.

E irdir havzasının toplam büyüklüğü (E irdir gölü dahil) 3,020 km²'dir. Göl yüzey alanı ise 468 km²'dir. Gölün maksimum su seviyesi 919,3 m ve göl hacmi de 4 milyon m³ olarak belirlenmiştir. Deniz seviyesinden 917,7 m yükseklikte bulunan göl, yıllara göre değişimle beraber ortalama 10-12 m derinliğe sahiptir ve gölün kuzey bölümü sığ, yer yer sazlık alanlarla kaplıdır.

Jeolojik yapısından bakıldığında tektonik bir göl olan E irdir Gölünün göl çanının biçimlenmesinde karstik olaylar da etkili olmuştur (nt. Kyn. 3). Gölün yüzölçümü 468 km², uzunluğu 50 km, ortalama genişliği 10-16 km'dir. Kuzey-güney doğrultulu bir

çukurlu a yerle mi olan göl, Türkiye'nin dördüncü büyük gölü iken Beyehir Gölü'nden sonra Türkiye'nin ikinci büyük tatlı su gölüdür.

Gölü, çevresinden inen küçük çaylar ve dereler beslemektedir. Bunlardan en önemlileri Uluborlu yöresinden gelen Pupa çayı, Hoyran ovasından inen Derim çayı ve Yalvaç'tan gelen Akçay olarak sayılabilir. Buna karşılık gölleri besleyen ana kaynak yeraltı sularıdır. Kuzeyde bulunan Karamuk Gölü'nün suları bu altan Düden, Hoyran Gölü'nün kuzeyinde Tirtar altından çukur göle karışmaktadır. Batısında Gençali köyünün altından çıkan Kanlıpalamut pınarı ve daha güneyden çıkan Karaotlu pınarı ile Havlutlu pınarı gölü besleyen başlıca pınardır. Göl suları güney ucunda Kovada Kanalı ile Kovada Gölüne ve Kurudere'den Aksu Irmağına akarak Akdeniz'e ulaşır.



Resim 2.3 Eğirdir Gölü Haritası,

Eğirdir Gölü oligotrof göl özelliği gösteren yani düşük besin ve yüksek çözünmüş oksijen düzeyi olan, duru ve turkuaz renk suya sahip, sığ, bitki yaşamı olan bir göldür. (Bildiren 1991, Kubilay ve Timur 1992). Bugüne kadar su kalitesinin uygunluğu açısından Eğirdir Gölü'nde; içme suyu ve tarımsal sulama suyu temini, balıkçılık, turizm ve enerji üretimi yapılmaktadır.

2.4.1 E irdir Gölünün Ev Sahipli i Yapt, , Baz, Türler

Göl, do udaki Gelendost k,y,lar, ile kuzeybat,daki Gençali ve kuzeydeki Hoyran Ovas,n,n k,y, düzlükleri d, ,nda genellikle dik yamaçlarla inen da larla çevrilidir. Bu nedenle güneyde yer alan E ridir Gölünün daha derin k,y,lar,n,n dik ve sazlık alanlar,n,n az olmas, sebebiyle su ku lar, için elveri sizdir. Daha s, olan Hoyran Gölündeki geni sazlık alanlar, su ku lar, için kuluçka ve beslenme ortam, olu turmakta, kuzeyden gelen ku lar için önemli bir u rak alan, olmaktadır. Küçük karabatak (*Phalacrocorax pygmaeus*), alaca bal,kç,l (*Ardeola ralloides*), küçük bal,kç,l (*Egretta garzetta*), b,y,kl, sumru (*Chlidonias hybridus*), Hoyran Gölünde kuluçkaya yatan önemli türlerdir. Gölün sonbahar ve k, aylar,ndaki ortalama ku popülasyonu 30 000 civar,ndad,r (nt. Kyn. 3).

Ekolojik karakteri itibariyle Bey ehir Gölüne benzerlik göstermekte olup, gölün derin k,s,mlar, orta g,dal,, s, k,s,mlar, ise bol g,dal, özelliğindedir. Göl, su ürünleri yönünden zengin bir yap,ya sahiptir. Ancak, 1960 y,l,ndan önce gölde 11 bal,k türü bulunmakta iken, göle uzun levrek (*Sander lucioperca*) a ,lanm, ve y,rt,c, bir tür olan uzun levrek göldeki di er bal,k türlerinin popülasyonunun azalmalara hatta yok olmalara sebep oldu u dü ünülmü tür.

Cyprinus carpio (sazan bal,), Cyprinidae familyas, üyesi olup Türkiyeø nin Akdeniz ve Güneydo u bölgesi hariç 3 ó 30 °C s,caklı ,ndaki tüm tatlı sularda bulunabilirler. Günümüzde E irdir Gölünde de Hoyran kesimindeki s, bölgelerde varlı ,n, sürdürmeye çal, maktadır.

Phoxinellus handlirschi (E irdir ya bal,), Cypr,nidae familyas,ndan olan bu türün ilk bulunuyeri; E irdir Gölü'dür. Anadolu'ya özgü olan bu endemik tür E irdir Gölü'ne akan baz, akarsularda örneklerine rastlanmaktadır (Ak iray 1961).

Capoeta pestai (Siraz bal,), Cypr,nidae familyas,na ba l, olan bu türün ilk bulunuyeri

yeri E irdir Gölüdür. Bu tür günümüzde sadece E irdir ve Bey ehir Göllerinde ya amaktadır. *Cobitis simplicispinna* (Çöpçü balı,), Ait oldu u familya Cobitidae olan bu türün ilk bulun u yeri; Gökçek, s, k, r (Eski ehir). Ayr, ca, Porsuk Çay,, Sakarya Nehri Havzas,, Tersakan Çay,, Köprüçay, Dipsiz ve Çine Çaylar, ile E irdir Gölünde yay, l, göstermektedir.

Rana ridibunda caratilana, Ranidae familyas, n, n üyesi olup bu alttürün ilk tespit edildi i yeri; Bey ehir Gölü, yay, l, gösterdi i di er alanlar E irdir Gölü, Su la Gölü ve Çar amba Suyu dır (Demirsoy 1996).

Pelophylax caralitanus (Anadolu kurba as, ya da Bey ehir kurba as,), Ranidae familyas, ndan, Türkiye'de endemik bir kurba a türüdür. çAnadolu'da Konya, Isparta, Burdur, Denizli ve Afyonkarahisar'da da , l, m gösterir.

Gölde çok zengin olarak bulunan ve Türkiye iç sular, nda ya ayan tek kerevit türü olan *Astacidae* familyas, üyesi, *Astacus leptodactylus* (tatlısu istakozu) da fungal oldu u dü ünülen ancak etkenin tam olarak belirlenmedi i bir hastal, k nedeniyle tamamen tükenmi tir (nt. Kyn. 3).

2.4.2 Gölü Kirleten Ba lıca Kaynaklar

Isparta lında bulunan 51 belediyeden 27'si E irdir Gölü havzas, nda yer almaktadır. Be tanesi ilçe belediyesi olmak üzere havzada bulunan 27 belediyeden sadece E irdir ve Yalvaç Belediyelerinde at, k su ar, tma tesisi bulunmaktadır. Bunlar, n d, , nda küçük yerle im birimleri için havzada 11 adet Do al Ar, tma Tesisi in a edilmi tir. Yöredeki do al ar, tma sistemlerinin birço unda baca t, kanmas, ve otland, rma çal, malar, n, n yap, lmamas, gibi i letme problemleri ya and, , için do al ar, tma tesislerinin gerekli de arj standartlar, n, sa layamad, , l Çevre ve ehircilik Müdürlü ü taraf, ndan rapor edilmi tir.

E irdir Gölü havzas, nda gölü en fazla kirletme potansiyeli olan faaliyetler aras, nda

tarımsal aktiviteler bulunmaktadır. Başta elmacık olmak üzere göl çevresinde meyve yetiştiriciliği günümüzde yoğun şekilde sürdürülmektedir. Bu faaliyetler sırasında kullanılan gübre ve pestisitler yapılan sulama ile birlikte gölü en çok tehdit eden unsurların başında gelmektedir.

Eğirdir Gölü ve civarında yoğun bir endüstri faaliyeti bulunmamaktadır. Ancak Yalvaç ilçesinde kösele imal eden tabakhaneler mevcuttur. Bu işletmelere ait atıksular herhangi bir arıtıma tabi tutulmadan, DSÖ'ye ait kanala verilmekte, buradan 2 km mesafede bulunan Gökçek Deresine daha sonra da Eğirdir Gölüne karışmaktadır. Bölgede bulunan bir diğer endüstri olan meyve suyu fabrikası da ve mevsimlik çalışmaktadır. Bu tesis de atıksuların arıtılmak üzere Eğirdir İlçesi atıksularını arıtma tesisine pompalamaktadır.

2.5 *Pelophylax caralitanus* (Arikan, 1988)

Çizelge 2.2 *Pelophylax caralitanus*'ün taksonomik hiyerarşisi

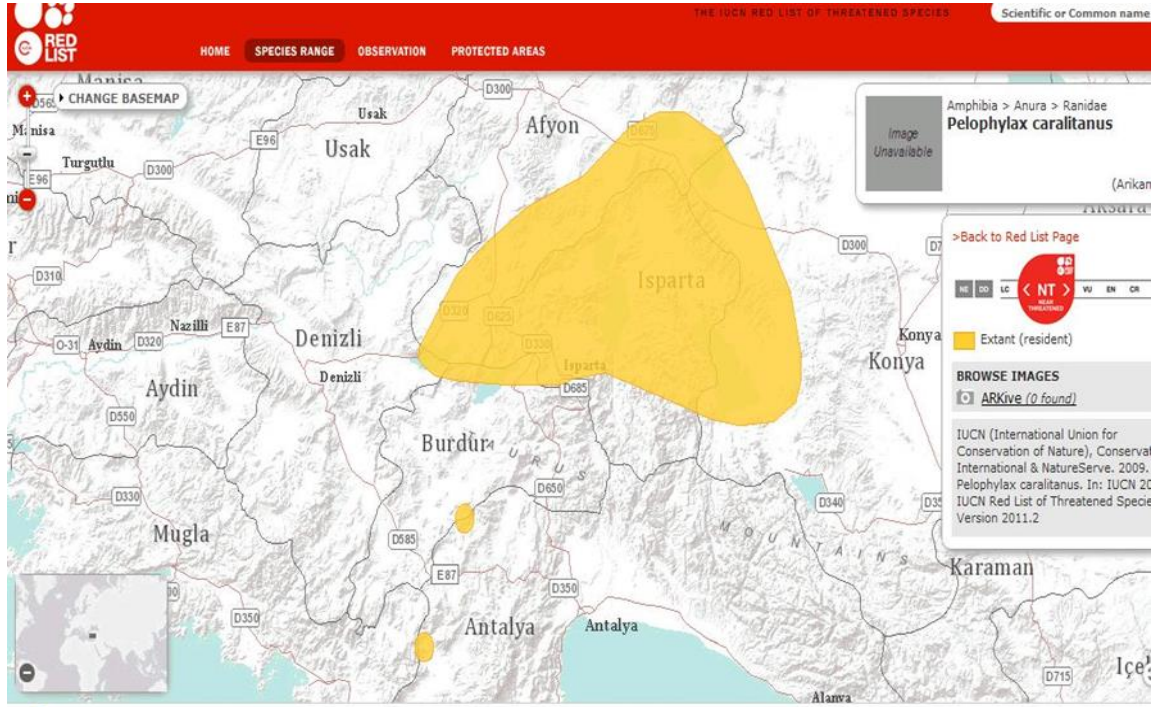
Kingdom (Alem)	Animalia (Hayvanlar)
Phylum (Üstçe)	Chordata (Kordalılar)
Subphylum (Alt üstçe)	Vertebrata (Omurgalılar)
Class (Sınıf)	Amphibia
Order (Takım)	Anura
Suborder (Alt takım)	Neobatrachia
Family (Aile)	Ranidae (Rafinesque 1814)
Genus (Cins)	<i>Pelophylax</i> (Fitzinger 1843)
Species (Tür)	<i>Pelophylax caralitanus</i> (Arikan 1988)

Önceleri *Pelophylax bedriagae* türü içinde sınıflandırılan ve halk arasında Anadolu kurbağı ya da Beyehir kurbağı olarak adlandırılan *Pelophylax caralitanus*, Ranidae familyası içinde yer alan, Türkiye'de endemik olarak bulunan

bir amfibi türüdür. Ranidae (Gerçek Su Kurba alar,) familyas,n,n temel özellikleri; arka bacaklar uzun, diller a ,z taban,na ön k,s,mdan ba l,, arka ucu serbest, genellikle çatall,d,r ve kulak zar, her zaman bulunur. Di ler üst çenelerinde (Maksilla-Premaksilla) bulunur. Dünyadaki da ,l,m, kozmopolittir. Ço unlukla Afrika ve Güney Asyaøda bululunmaktad,rlar (Budak ve Göçmen 2008). Ranidae familyas,n,n bir üyesi olan kurba alar genellikle dere, çay, nehir, suyu temiz gölcüklerin kenarlar,nda ve hatta tuzlu sularda ya ayan canl,lard,r. lkbahar ve yaz aylar,nda sulara yumurtalar,n, b,rak,rlar.

Pelophylax caralitanus, akak bölgesinde koyu kahve erit bulundurmamas, ile Türkiye'deki di er ova kurba as, türleriyle (*P. ridibundus* ile *P. bedriagae*) benzerlik gösterse de onlardan farklı olarak kar,n k,sm, ve boyun bölgesinde turuncu ve bazen sar,ms, renklenme gösteren lekeler bulunur ve di erlerine göre nispeten daha iri boyutlara ula ,r (Arikan 1988).

Konya ovas,ndan Denizliøye kadar yay,l, gösterirler. Bey ehir Gölü, E ridir Gölü, Su la Gölü, Çar amba Deresi (Konya), Gölcük Gölü (Isparta), Hotam, Gölü, Ivriz Gölü (Ere li/Konya), Çardak ve Çivriløde (Denizli) I ,kl, Gölünde kay,tlar, bulunmaktad,r (IUCN, 2011). *P.caralitanus*un yay,l, alanlar,; bat, 29,73-do u 31,95, kuzey 38,71-güney 36,71 enlem ve boylamlar, aras,nda oldu u belirtilmi tir. *P.caralitanus*un temel besin kayna ,n, böcekler [Insecta (Orthoptera, Coleoptera, hemiptera, Diptera)] ve Gastropodaølar olu turmaktad,r (Atatür 1993).



Resim 2.4: *P. caralitanus* yayılma alanı, (nt. Kyn. 4)

Ekonomik ve ekolojik büyük öneme sahip olan endemik *P. Caralitanus*'ün küresel, sınırlı ve diğer faktörlerden kaynaklı olarak sucul habitatların kuruması, dikkate alınmayan tür sayısının azalma nedenlerinin başında gelmektedir. Bu sucul habitatların günden güne yok olması, türlerin beslenme, barınma ve üreme alanlarının kısıtlanarak olumsuz yönde etkilenmektedir. Bunlara ek olarak da günümüzün patojen hastalıklarının yayılmasında etken olan en önemli sebeplerinden biride *P. caralitanus*'ün yenilebilir kurbağa türü olmasıyla bilinçsiz ve aşırı derecede toplanmasıdır. Fransa, İtalya ve İsviçre gibi ülkelere ticareti yapılmaktadır. Türkiye'deki ihracat, canlı, donmuş bacak, konserve ve taze bacak şeklinde olup, bu ihracatın % 80'ini de donmuş bacak ve canlı kurbağalar oluşturmaktadır. Bu faaliyetler kurbağa türünün hem azalmasına sebep olmakla birlikte bahsedildiği üzere patojen mikroorganizmaların taşınmasıyla yayılma alanlarının genişlemesine de sebep olmaktadır. Bu patojenler arasında *Batrachochytrium dendrobatidis* fungusu ve Ranaviruslerin (*Iridoviridae*) amfibiler üzerinde ölümcül hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler de tür azalması sebepleri arasında bu iki hastalık yapıcı mikroorganizmanın da önemini ortaya koymaktadır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1 MATERYAL

3.1.1 al, mada Kullan,lan Besiyerleri

H Broth Besiyeri (HB)

Tripton	10 g
Glikoz	3,2 g

Distile su ile son hacim 1000 mLø ye tamamlanarak 121⁰Cø de 15dk otoklavlanarak steril edildikten sonra Bd için zenginle tirme besiyeri olarak kullan,ld, (Longcore 2000).

Antibiyotik çeren Tripton Jelatin Hidrolizat Laktoz (mTGhL) Besiyeri

Tripton	8 g
Jelatin hidrolizat	2 g
Laktoz	4 g
Agar	10 g
Penicillin-G	200 mg/L
Streptomisin sülfat	200-500 mg/L

Distile su ile son hacim 1000 mLøye tamamlanarak, 121⁰Cø de otoklavlanarak steril edildi. pH ayarlamas,na gerek yoktur. Haz,rlanan besiyeri s,cakl, , yakla ,k 50⁰Cøye kadar so udu unda antibiyotikler eklendi (Johnson 2003). Zenginle tirme besiyerinde üreyen organizmalar,n kültürünü yapmada kullan,ld,.

Tripton Jelatin Hidrolizat Laktoz (TGhL) Besiyeri

Tripton	16 g
Jelatin hidrolizat	4 g
Laktoz	2 g
Agar	10 g

Distile su kullan,arak son hacim 1000 mLø ye tamamland,. 121⁰Cø de 15dk otoklavlanarak steril edildi pH ayarlanmas,na gerek duyulmamaktad,r (Longcore 2000). Elde edilen su lar,n tekrar ekiminde kullan,ld,.

3.2 METOD

3.2.1 Arazi Çal, malar,

Yapılan bu tez çal, mas,nda 2012 ve 2013 y,llar,nda ayn, lokalitelerden örnekler toplanarak çal, maya dahil edilmi lerdir. Çal, maya al, nan lokaliteler a a ,daki tablo da gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Çal, maya dahil edilen lokalitelerin GPS verileri. L:Lokalite

Lokalite	Enlem	Boylam
L1	37 ⁰ 55 ⁰ 43,274ö	30 ⁰ 46 ⁰ 54,664ö
L2	37 ⁰ 59 ⁰ 11,431ö	30 ⁰ 47 ⁰ 23,115ö
L3	38 ⁰ 0 ⁰ 8,881ö	30 ⁰ 45 ⁰ 57,006ö
L4	37 ⁰ 50 ⁰ 40ö	30 ⁰ 53 ⁰ 20ö
L5	38 ⁰ 2 ⁰ 24,102ö	30 ⁰ 49 ⁰ 42,695ö
L6	37 ⁰ 50 ⁰ 46,778ö	30 ⁰ 51 ⁰ 42,979ö

Çal, ma alan, olarak belirlenen bu lokalitelerden Chytridiomycosis tan, s, için örneklemeler steril pamuk uçlu swap (Medical Wire and quipment, MW 100-100; sourced from Biomerieux) kullan, larak hayvan üzerinden al, nm, t, r (nt. Kyn.5). Bu i lem; 10 kez kurba an, n dorsal yüzeyinden, 10 kez her iki koltuk alt, ve kas, k bölgesinden, 10 kez ventral yüzeyinden, 10 kez her kalçan, n alt k, sm, ndan ve 10 kez ayaklar, n, n alt yüzeyinden sürüntü al, nmas, ile gerçekleştirilmi tir (Resim 3.1). Swaplama tekni i yüzey alan, ndan en fazla miktarda örneklem al, nabilmesi için ve negatif sonuç ç, kma ihtimalini minimuma indirgenmesi için en ideal yöntemdir. Al, nan swaplar 2.0 ml'lik steril ependorf tüplere al, n, p arazi s, ras, nda azot tanklar, nda muhafaza edilmi tir. Laboratuvar ortam, na götürüldükten sonra analizler yap, lana kadar - 20 °C de saklanm, t, r (Kriger 2006).Ölü olarak bulunan amfibiler +4 °C'de saklanarak laboratuvara ula t, r, lm, t, r.



a: Amfibi ventralinden swaplama metoduyla örnekleme **b:** Parmak aras, perdelerden örnekleme



c: *P. caralitanus* iriba ,ndan swap örne i alma

Resim 3.1 Arazi çal, malar, s,ras,nda swap örneklerinin toplanmas,



Resim 3.2 E irdir arazi çal, mas,

Ranavirus tan,s, için örneklerin konuldu u kaplar içerisinde bulunan epitel deri döküntüleri al,narak %70ø lik etanol bulunan 2.0mlødik ependorf tüplere konulmu tur. Ayr,ca arazi s,ras, esnas,nda ölü *P. caralitanus* örneklerden 0.5 cm²lik deri veya kas parçalar, al,narak %70ø lik etanol bulunan 2.0 mlødik ependorflara konulmu tur. Arazi s,ras,nda al,nan örnekler azot tanklar,nda muhafaza edilmi tir. Laboratuvar ortam,na götürüldükten sonra analizler yap,lana kadar - 20°Cøde saklanm, t,r.

3.2.2. Batrachochytrium dendrobatidis Kültürlerinin izolasyonu

Swap örnekleri kültürlerin izolasyonu içinde kullan,lm, t,r. Swaplardan, H-broth besiyerine ekimi yap,larak 22±1 °Cøde 2 gün inkübasyona b,rak,lm, t,r. Daha sonra HB besiyerinden 2 ml al,naraki mTGhL besiyerine dökme plak metodu ile ekim yap,lm, t,r. 23 °C 5 gün inkübasyonu takiben Bd oldu u dü ünülen mukoid kolonilerin mikroskopik analizleri gerçekleştirilmi tir. Ayn, ekilde HBø dan örnek al,narak hareketli zoosporlar,n varl, , gözlemlenmi tir (Boyle 2004).

3.2.3. Batrachochytrium dendrobatidisø in Moleküler Analizler le Belirlenmesi

3.2.3.1. DNA ekstraksiyon

Çal, ,lacak örnek say,s, kadar 1,5 mL ependorf tüplere 30-40 mg zikonyum/silika boncuklar kullan,lm, t,r. Daha sonra üzerlerine 50 L oda ,s,s,nda bulunan PrepMan Ultra (Applied Biosystems #4318930) ekstraksiyon solüsyonu eklenmi tir ve en son

olarak araziden getirilen swaplar tüplerin içine yerle tirilmi tir. Bir vorteks kullan,larak 45 s boyunca çalkalanarak zirkonyum/silika boncuklar,n mevcut fungus ve zoosporlar, homojenize etmesi sa lanm, t,r. Sonras,nda k,sa bir süre ependorflar buz üzerinde so utulup 30 s 13 000 g de santrifüj edilmi tir. Bu i lem iki kez tekrarlanm, t,r. Santrifüjden sonra tüplerin kapaklar, 22-23 ayar ayr, steril i neler kullan,larak delinmi tir. Kapaklar, delinen örnekler özel tüp tutuculara yerle tirildikten sonra 10 dakika 100 °C'de ki su banyosunda bekletilmi tir. Su banyosundan al,nan tüplerin üst k,sm,na hafifçe vurularak olu an yo unla malar giderilmi ve 2 dakika oda s,cakl, ,nda so umaya b,rak,lm, t,r. Bu i lem bittikten sonra maksimum h,zda (13 000 rpm) 3 dakika boyunca santrifüj edilerek yakla ,k 20-40 L kadar süpernatant toplanm, t,r. Örnekler agoroz jelde (75V / 1sa) yürütülerek DNAø n,n varl, , belirlenmi tir. DNA örnekleri içeren süpernatandlar daha sonraki çal, malarda kullan,lmak üzere -20°C de saklanm, t,r (Boyle 2004).

3.2.3.2. Bd için Standart E rinin haz,rlanması,

Bd DNA örne i (PrimerDesign) 10 ar kat suland,r,larak standart e rinin haz,rlanması,nda kullan,lm, t,r. Her bir spor dilüsyonun, Rt- PCR i lemi ile DNA yo unlu u belirlenerek standart e ri amac,yla olu turulacak standart e ri için (Çizelge 3.2).

Pozitif kontrol olarak da en yüksek yo unlu a sahip Tüp 1 örne i her RT-PCR uygulamas,nda kullan,ld,. Negatif kontrol olarak her Rt-PCR deneyinde DNA örne i yerine DNaz-RNaz içermeyen steril dH₂O kullan,ld,.

Çizelge 3.2 Standart E riøde Kullan,lan DNA yo unluklar,

Dilüsyon Tüpleri	DNA Kopya Yo unlu u
Standart 1	2 x 10 ⁵ / µL
Standart 2	2 x 10 ⁴ / µL
Standart 3	2 x 10 ³ / µL
Standart 4	2 x 10 ² / µL
Standart 5	20 / µL
Standart 6	2 / µL

3.2.3.3 Real time PCR i lemi

zole edilen DNAølar *B. dendrobatidis* türünün 16s rDNAø s,nda yer alan ve türün belirlenmesinde spesifik öneme sahip olan ITS1-3 bölgesine özgü evrensel primerler kullan,lm, t,r. [Chytr 5 -CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TC-3 ve 5 -AGC CAA GAG ATC CGT TGT CAA A-3) primerleri ve 5 -6FAM CGA GTC GAA CAA AAT MGBNFQ3]. (TaqMan). Rt- PCR için reaksiyon tüplerinin haz,rlanması, Çizelge 3.2 de gösterilmiştir. Rt- PCR protokolü Boyle (2004)ø a göre yap,lm, t,r (Çizelge 3.3). K,saca Real-time PCR için haz,rlanan örneklerin her biri 0.2 ml strip PCR tüplerine konularak üzerleri effaf seal bant ile kapat,larak kar, ,m,n homojenize olmas, ve tüplerin duvar,nda kalm, olabilecek damlalar,n dibe inmesi amacıyla bütün tüpler vorteks/spin cihaz, kullan,larak (Bioneer, Kore) 2500 rpm de 5s., øhardø seviyede çalkalama ayar,nda 20 s. ve 20 tekrar ekinde vorteks/spin edilmiştir. Daha sonra haz,r olan tüpler, Rt- PCR cihaz,n,n (Bioneer exicycler96, Kore) blo u üzerindeki kuyucuklara yerle tirilerek Rt-PCR i lemi gerçekleştirilmiştir.

Rt-PCR tekni i *B. dendrobatidis*ın belirlenmesinde kullan,lan en güvenilir ve çabuk sonuç veren bir tekniktir. Bu teknik ile aynı zamanda Bdø nin DNA miktar,, bilgisayar görüntüleme sistemiyle tespit edilebilmektedir.

Çizelge 3.3 Rt- PCR için reaksiyon tüplerinin haz,rlanması,

çerik	Miktar (µL)
2 x Precision™ MasterMix (PrimerDesign, ngiltere)	10
<i>B.dendrobatidis</i> ø özel Primer/Probe (10 pikomol) mix	1
DNAz ve RNAz içermeyen steril su	4
DNA örne i (5 ng / µL)	5
Reaksiyon Toplam, Son Hacmi	20

Çizelge 3.4 Amplifikasyon Protokolü (PrimerDesign, ngiltere)

Döngü Say,s,	lem Basama ,	Süre (sa.dk.s)	S,cakl,k
1	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.10	95 °C
50	Ba lanma ve Uzama	00.01.00	60 °C
	Verilerin Okunup Bilgisayara aktar,ılması,	-	-
1	Erime	-	55 °C ö 94 °C

Ranavirus için DNA izolasyonu:

% 95 etanol buluna ependorf tüpler içerisinde getirilen fikse edilen örnekler DNA izolasyonu için kullanılır. Ependorf tüpleri üzerine 400µL ötüme tamponu eklenerek, homojenizatör yardımıyla 60-70 s boyunca 4000 rpm'de homojenize edilmiştir. Oluşan homejanat 30 dk, 65 °C de inkübe edildikten sonra üzerine 57 µL 8M potasyum asetat eklenerek 30 dk buz banyosunda bekletilmiştir. 10 000g de 15 dk santrifüj yapılarak süpernatant yeni bir tüpe alınarak her bir tüp üzerine 1mL buz soğukluğunda %100 etanol eklenerek yavaşça karıştırılır. Daha sonra 10 000g de 15dk santrifüj edilen örneklerde DNA çöktürülerek, 50 µL TNE tamponu içerisinde çözdürülmü ve +4 °C ve -20 °C'de daha sonraki çalışmalarında kullanılmak üzere saklanmıştır (Galli 2006).

Ranavirus (FV-3) Tespiti için Real Time PCR yöntemi

Ranavirusün varlığını tespiti için Rt-PCR uygulama yöntemi, aşağıdaki tabloda verilen MCP (Major Capsid Protein) ve IE (immediately early) primerleri kullanılarak çizelge 3.5 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 ó RNAz içermeyen steril su ve 5 µL (25 ng) DNA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Galli 2006). Rt-PCR yönteminin ardından Ct (cycle treshold) değeri alınan örnekler % 1,5 lik agaroz jel elektroforezinde DNA marker kullanılarak yürütülerek hedeflenen DNA örneğinin boyutunun görüntülenmesiyle sonuçlandırılmıştır.

Çizelge 3.5 Ranavirüs primerleri ^a Referred to sequence AF192508, ^b Referred to sequence U15575.

Primer Ad,	Genom	Nucleotide sequence
	Üzerindeki Yeri	
MCP ileri	61681 ^a	5ø- TAC TTT GTC AAG GAG CAT TAC - 3ø
MCP geri	3986418a	5ø- TCA TGT TAT AGT AGC CTA TGC - 3ø
IE ileri	104622b	5ø- ATG ATC CAA GCC TACCTG TGC - 3ø
IE geri	5636583b	5ø- AAA TGT CCT AAT CTA TAC ACC - 3ø

Çizelge 3.6 Rt- PCR protokol ko ullar,

Döngü Say,s,	lem Basama ,	Süre (sa.dk.s)	S,cakl,k
1	Enzim Aktivasyonu	00.10.00	95 °C
	Denatürasyon	00.00.20	95 °C
50	Ba lanma ve Uzama	00.00.45	55 °C
	Verilerin Okunup Bilgisayara aktar,lmas,	-	-
1	Melting	-	55 °C ó 94 °C

4. BULGULAR

07 ó 11 A ustos 2012 ve 03604. A ustos 2013 tarihlerinde yap,lan arazi çal, malar,nda E irdir Gölü çevresinde yap,lan gözlemler sonucunda 4 farklı lokalite çal, maya dahil edilmi tir. Belirlenen bu lokalitelerden toplanan örneklerde Bdø nin tipik fizyolojik septomlar,na rastlanm, t,r. Deride k,zar,kl,klar (Resim 4.2), lekelenmeler (Resim 4.4) ve deri kayb,n,n ya anmas, (Resim 4.3) gibi septomlar saptanarak üpheli amfibilerden ve her hangi bir septom gözlenmeyen *P. carilatanus*lardan swap örnekleri al,nm, t,r.



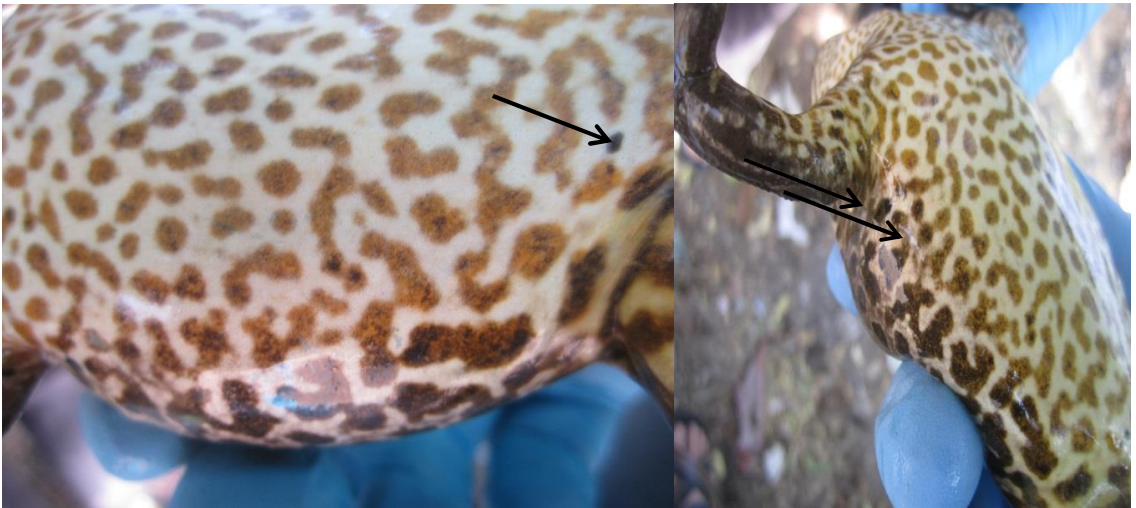
Resim 4.1 *P. carilatanus* vücudunda yara olumu. (a: A ,z Çevresinde b: Göz bölgesinde)



Resim 4.2 *P. carilatanus* derisinde görülen k,zar,kl,klar



Resim 4.3 Derileri kayb, gözlenen amfibiler



Resim 4.4 *P. caralitanus* derisindeki lekelenmeler.



Resim 4.5 Metamorfoz safhasındaki ölü *P. caralitanus*

Çizelge 4.1 Çal, maya dahil edilen lokaliteler

Lokalite	Lokalite Bilgileri (Enlem/ Boylam/ Yükseklik)	Toplanan Örnek Say,s,	
		2012	2013
L1	37°37'57ö/ 31°32'49ö/ 1135m	34	17
L2	37°40'08ö/ 31°42'1ö/ 1153m	8	3
L3	37°52'21ö/ 31°20'42ö / 1132m	5	2
L4	03°09'443ö/ 42°12'482ö/ 919m	-----	-----
L5	03°11'882ö/ 41°90'919ö/ 921m	-----	-----
Toplam Örnek Say,s, (n)		47	22

2012 y,l,nda gerçekte tirilen arazi çal, mas,nda *P. caralitanus* türüne ait toplamda 47 amfibi tespit edilmi ve swap örnekleri alınm, t,r. Yapılan çal, mada en fazla örnek tablo (Çizelge 4.1) da görüldü ü üzere L1 bölgesinde saptanm, t,r. Gözlemlenen toplam amfibi say,s, 47 olarak belirlenmi tir.

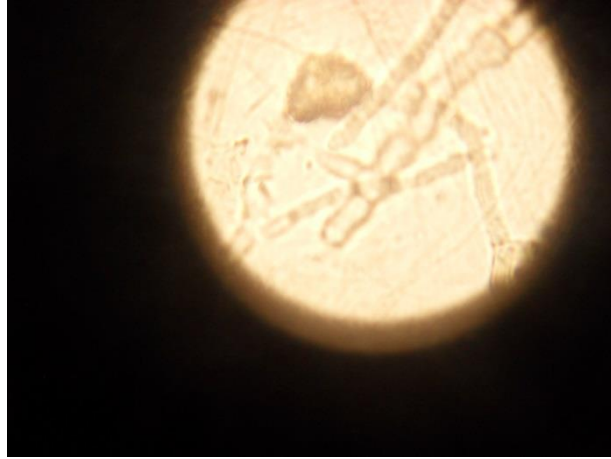
2013 y,l,nda tekrar ayn, bölgeler gözlemlenmi ve en fazla amfibi yine L1 bölgesinden toplanmas,na ra men çal, ma sonunda ortaya ç,kan sonuç gözlemlenen amfibi say,s,nda büyük bir azal, tespit edilmi tir.

4.1 Swap Örneklerinde *B. dendrobatidis* in Besiyerinde Tespiti

Çal, ma, Joyce E. Longcore (2000) un metodu kullan,larak yap,lm, ve elde edilen kültürler mikroskop alt,nda incelenmi tir. nceleme sonucunda; sporangia (Resim 4.6), genç ve olgun sporahif (Resim 4.7), zoosporangia ve haploid zoospor (Resim 4.8) yap,lar,na rastlanm, t,r.



Resim 4.6 Zoosporlar birle tikden sonra Sporangia

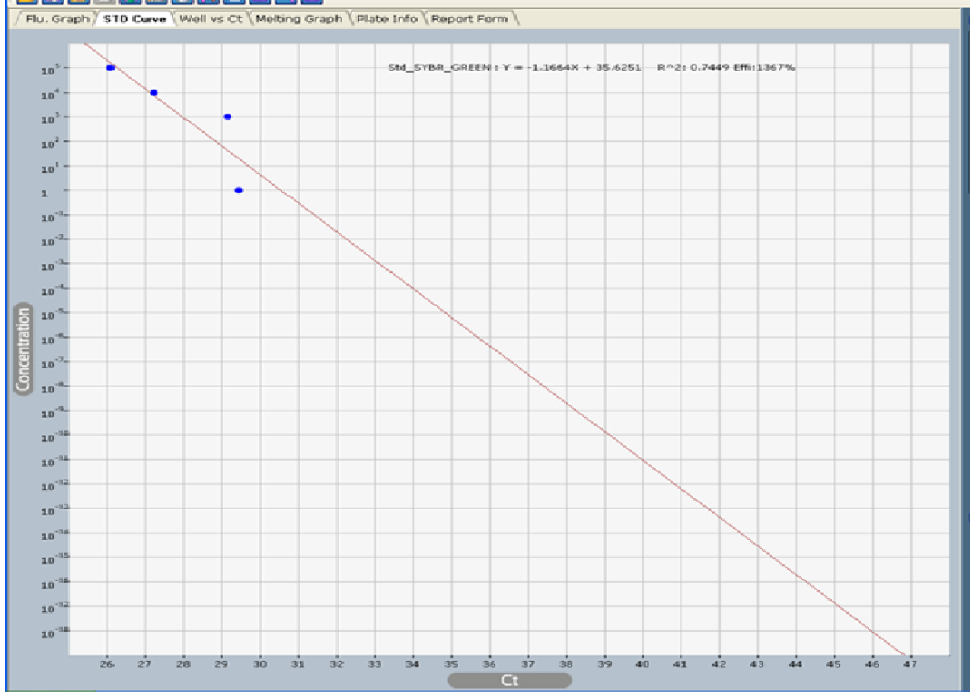


Resim 4.7 Sporangileri Genç sporahif ve olgun sporahif



Resim 4.8 Haploid zoosporlar(küçük siyahlar)
Zoosporangia

4.2 Standart E ri



ekil 4.1 Standart Grafi i

4.3 Rt- PCR Sonuçlar,

4.3.1 Swap rneklerinden Bd analiz Sonuçlar,

Toplam 69 swap rne inden 67øsinde al, ma gerçekle tirilmi tir. Bunun nedeni 2 swap rne inin kontamine olmas,ndan kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.2 Bd 2012- 2013 verileri

YIL	ÇALI ILAN ÖRNEK SAYISI	POZ T F ÖRNEK SAYISI	NEGAT F ÖRNEK SAYISI	Pozitiflik yüzdesi %
2012	47	8	39	17,02
2013	20	9	11	45,00
TOTAL	67	17	50	25,37

67 swap rne inin 17øsinde Bd saptanm, t.r. 2012 de Bd pozitif say,s, 8, 2013 de ise 9 olarak tespit edilmi tir. Toplam rnek say,s,na bak,ld, ,nda pozitiflik ydesi en fazla 2013 de % 45,00 olarak saptanm, t.r. Bu oran 2012 de % 17,02ø dir. ki y,l,n ortalamas,na bak,ld, ,nda pozitiflik yüzdesinin % 25,37 oldu u belirlenmi tir (izelge 4.2).

Çizelge 4.3 Ranavirüs 2012- 2013 çalışma sonuçları,

YIL	ÇALIřILAN ÖRNEK SAYISI	POZİTİF ÖRNEK SAYISI	NEGATİF ÖRNEK SAYISI	POZİTİFLİK YÜZDESİ %
2012	30	0	30	0
2013	26	3	23	11,54
TOPLAM	56	3	53	5,36

56 swap örne i FV3 tepitinde kullanılmıştır, t.r.2012 yılında E irdir Bölgesi örneklerinde virüs saptanmamıştır. Buna kar şın 2013 de 26 örnekten 3ünde (%11,54) pozitif sonuç tespit edilmi ştir. Toplam 56 örnekte pozitiflik oranı, % 5,36 olarak belirlenmi ştir.

5. TARTI MA SONUÇ

Dünyanın ikliminde görülen de i iklikler ne yaz,k ki dünyamız ve atmosfer üzerinde ya ayan tüm canlılar, olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, bu de i im tüm dünyada e it iddetinde olmad, , gibi her bireyde de farklı tepkiler vermektedir. İklim de i ikli i ça ,m,z,n en önemli çevresel ve ekonomik sorunlar, arasında ön sıralarda yer alan, özellikle bulunduğumuz coğrafyada sağlıktan tarıma ya am,n her alanda olumsuz etkiler olmaktadır son derece karmaşık bir sorundur.

İklim de i ikliminin canlıların sağlığına etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan bulgulardan biride bazı bulaşıcı hastalıkların vektörlerinin ve dağılımında de i mesidir. Bu durum i) hastalığın meydana gelme olasılığı olan bölgelerin artması, ii) yayılma mevsimi de i mesine iii) göçlerin artması,na ve son olarak iii) hastalıkların görülme sıklığının artması,na yol açmaktadır. Dolayısıyla insanolu bilerek veya bilmeyerek iklimsel de i melere neden olmakta bunun sonucunda ekosistemler de i mekte ve türlerin yeni alanlara girmesine sebep olmaktadır.

Patojen türlerin yayılımı ve patojeniteleri gün geçtikçe artmaktadır. Bunun nedeni çevresel, biyotik ve abiyotik etkiler sonucunda konak organizmanın immün sisteminin zayıflaması, patojenin direnç kazanarak patojenitesinin artması, ve geniş alanlara yayılmasıdır.

Son 30 yıldır küresel de i erlendirmelere göre dünyadaki yaklaşık 6593 amfibi türünün %32'si büyük tehlike altındadır. 1980 yılından beri yaklaşık 122 amfibi türü yok olma tehlikesindedir. Bu durum popülasyon büyüklüklerinin % 43 oranında azalması,na yol açmaktadır.

Ülkemizde de 30 kurbağa (14 Urodel, 16 Anur) ve 127 (10 kaplumbağa, 62 kertenkele ve 55 yılan) sürüngen türü yayılmaktadır. Ne yazık ki ülkemizde yaygın kurbağa türlerinin yaklaşık tamamı ve sürüngen türlerinin % 67'si Dünya Tabiat 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. Ayrıca türlerin % 80'si

inin popülasyonlar, azalmakta, % 17'sinin dura an ve % 3'ünün ise bilinmemektedir.

Tüm Dünya da anur türlerindeki bu azalmanın en önemli nedenleri olarak Chytridiomycosis hastalığının etkeni *B. dendrobatidis* ve FV3 gösterilmektedir.

Berger vd. (1998) tarafından dünya genelinde amfibilerde kütleli toplu ölümlere neden olduğu bilinen Chytridiomycosis hastalığının sebebi olan patojen fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* ilk olarak Panama ve Avustralya'da amfibi türlerindeki ani azalmanın sebebi olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda kapsamlı Güney Afrika Müzesi, Cape Town (SAMZR 18927) daki 1938 kayıtlı *Xenopus leavis* örneklerinde yapılan incelemeler sonucunda patojenle ilgili en eski kayıtlar bu örnek üzerinde bulunmuştur. Birçok araştırmacı, bu patojenin başta iklim değişikliği olmak üzere dünya çapında yapılan kurbağa ticaretinin de etkisiyle yayılmaktadır. 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. (Bosch 2007, Skerratt 2007, Lips 2008, Laurance 2008, Rohr 2008, Krigger 2009).

Batrachochytrium dendrobatidis, kurbağalarda metabolizma değişikliklerine yol açtığı gibi aynı zamanda infekte popülasyondaki bireyin büyümesini de etkilediği belirlenmiştir (Bosch 2007, Skerratt 2007, Lips 2008, Laurance 2008, Rohr 2008). *B.dendrobatidis* zoosporlar, suyoluyla bir hayvandan diğerine bulaşarak amfibilerin derisini infekte eder ve bu zoosporlar sadece epitelyumun keratinleşmiş bölümünde büyüme gösterirler (Berger 1998, Longcore 1999, Pessier 1999, Nichols 2001). Bu zoosporlar etrafa saçıldıktan sonra 24 saat içinde hareketli forma dönerler (Berger 2001). Zoosporlar hem yetkin hem de iribaş safhasında olan (bu safhada sadece ağız parçalarında tespit edilmiştir) kurbağalar, infekte eder (Berger 1999, Nichols 2001). Enfeksiyondan sonra ölüm genellikle 18-45 gün içinde gerçekleşir.

Ülkemizde de Göçmen 2013 tarafından yapılan çalışmada 12 lokaliteden toplanan 330 *Lyciasalamandra* türü, 2 *Pelophylax bedriagae* ve 1 *Pseudepidalea variabilis* örnekleri 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).

Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada göller bölgesi ve 26 Austos Milli Parkından toplanan 7 türe ait 228 amfibi örneğinde Bd tespiti yapılmıştır. 26 Austos milli parkından toplanan örneklerde türlere göre % 8 ile % 29 oranlarında pozitif sonuç elde edilmiştir. Göller bölgesi çalışmaları, malar,ında ise Beyşehir gölü % 32 pozitiflik ile en yüksek enfeksiyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Erişim 2014).

Bizim çalışmamızda 67 swap örneğinin 17'sinde Bd saptanmıştır. 2012'de Bd pozitif sayısı 8, 2013'de ise 9 olarak tespit edilmiştir. Toplam örnek sayısına bakıldığında pozitiflik yüzdesi en fazla 2013'de % 45,00 olarak saptanmıştır. Bu oran 2012'de % 17,02'dir. Kişilerin ortalamasına bakıldığında pozitiflik yüzdesinin % 25,37 olduğu belirlenmiştir.

Bd pozitif olarak saptanan örneklerin bir kısmında deride lekelenmeler, deri kayıpları ve kızamıklar saptanmıştır. Ancak diğer kısmında ise hiçbir fizyolojik bulguya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalar bu bulgumuzu desteklemektedir. Bu nedenle hastaların belirli bir fizyolojik bulgusu olmayıp histolojik çalışmalar ve mikrobiyolojik çalışmaların belirlenmesi için yeterli değildir. Fungusun belirlenmesinde en etkili yöntem RT-PCR yöntemi olup yapılan çalışmalar bu metod ile gerçekleştirilmektedir. (Boyle 2004) Aynı zamanda Chytridiomycosis sekonder enfeksiyon olarak da ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle primer enfeksiyon nedeni olan patojen faktörlerde büyük önem taşımaktadır.

2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün Yaban hayat organizasyonu (World Organisation for Animal Health 2008) tarafından Yaban hayat Hastalıkları Listesi yerleştirilen ve yüksek ölümcül salgın hastalıkları sınıfına dahil edilen ranaviral hastalıklar, bulaşıcı ranavirus türleri, Iridoviridae familyasına dahildir. Ranavirüs türleri amfibilerde olduğu gibi poikilotherm hayvanlarda da sistemik enfeksiyonla ölümlere neden olur. FV-3'ün en önemli özelliği genomunda major capsid protein (MCP) genini içermesidir.

1990'lerden itibaren ranavirus ve chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* yeni patojenler olarak bildirilmiştir ve dünya Sağlık Örgütü tarafından dikkat edilmesi gereken hastalıklar listesine alınmıştır (William 2010).

Çalışmamızda 56 swap örneği FV3 tespitinde kullanılmıştır. 2012 yılında Erişim Bölgesi örneklerinde virüs saptanmamıştır. Buna karşın 2013'de 26 örnekten 3'ünde (%)

11,54) pozitif sonuç tespit edilmiştir. Toplam 56 örnekte pozitiflik oran, % 5,36 olarak belirlenmiştir.

P.caralitanus Ekonomik ve ekolojik büyük öneme sahip olan endemik bir türdür. Arazi çal, malar, s,ras,n gözlemlendi imiz kadar,yla tehlike alt,ndadır. Küresel ,s,nma, suçul habitatlar,n kurumas,, bilinçsiz ve a ,r, derecede toplanmas, say,lar,ndaki azal, ,n ba l,ca nedeni olarak say,lmaktadır. Ancak bu türe ait daha önce Bd ve FV-3 ile yapılm, hiçbir çal, ma bulunmamaktadır. Sonuç olarak çal, mam,zda patojen hastal,klar,n yay,ımas, (Bd ve FV-3) bu türün azal, ,n,n nedenleri aras,ndadır. Bundan sonraki çal, malar patojenin da ,l,m,n, etkileyen faktörlerin saptanmas, üzerine olmal,dır. Ayr,ca elde edilen sonuçlar Türkiyeø de ki di er tür azal, lar,nda da patojenlerin etkin olup olmad, ,n,n ara t,r,ımas,n, zorunlu k,lmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- 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 Journal*, **37**: 187-190.
- Ak iray, F., 1961. Baz, Türkiye göllerine a ,lanan sudak (*Lucioperca sandra cuv. et al.*) bal,klar, hakk,nda. stanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobioloji Ara t,rma Enstitüsü Yay,nlar,, Seri A, **1-2**. 104-113.
- 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 Diseases*, **42**: 677-684.
- Ar,kan, H. (1988). On a new form *Rana ridibunda* (Anura: Ranidae) from Turkey. *stanbul Universitesi Fen Fakültesi Mecmuas,,* **53**: 81-87.
- Atatür, M.K., Ar,kan, H., Mermer, A. (1993). A Preliminary study on the feeding biology of a *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) population from Bey ehir Lake. *Turkish Journal Zoology* **17**:127-131.(in Turkish with English abstract).
- Anonim, (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**: 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 Diseases*, **32**:1017-1025.
- 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.
- 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. *Diseases 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, **83**: 169-179.
- 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., Slocumbe, 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.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**: 51663.

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 Diseases*, **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**: 3316337.

Bosch, J., Martínez-Solano, I. (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. **(1)**: 84 ó 89.

Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J. (2008). Detection of chytridiomycosis casued by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered Sardinian newt *Euproctus platycephalus* in southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildl Diseases* **44 (3)**: 712 - 715.

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'állevamento. *Boll Soc Ital Patol Ittica* **11**: 3-10.

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**: 1416148.

Braunwald, J., Tripier, F., Kirn, 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)**: 3206

- 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 kitab, Ege Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Yayın No:194 Isbn 975-483-658-2.
- 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., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A.D., Miyaki, T., Seligy, V., Williams, T. (2005). Family Iridoviridae. In: Fauquet 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*, 145-162.
- 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.
- 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. *Journal Fish Diseases*, **17**: 417-437.
- 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
- Cullen, B.R. (2007). Immunology. Outwitted by viral RNAs. *Science*, **317**: 329-330.

- 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*). *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biology Science*, **351**:1539-1557.
- 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.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, **287**: 4436449.
- Daszak, P., Cunningham A.A., Hyatt, A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, **9**: 1416150.
- Demirsoy, A., (1996). Türkiye Omurgalılar, *Memeliler*. Çevre Bakanl., „ Çevre Koruma Gen. Müd. Proje No: 90-K-1000-90.292 s.
- 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.
- Duffus, A.L., Pauli, B.D., Wozney, K., Brunetti, C.R., Berrill, M.. (2008). Frog virus 3 like infections in aquatic amphibian communities. *Journal Wildlife Diseases*, **44**:109-120.
- Eaton, B.T, Hyatt, A.D., Hengstberger, S. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: Purification and classification. *Journal Fish Diseases*, **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.
- Er,sm,s 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
- Essbauer, S., Ahne, W. (2002). The epizootic haematopoietic necrosis virus (*Iridoviridae*) induces apoptosis in vitro. *Journal Veterinary Medicine B Infection Diseases Veterinary Public Health*, **49**: 25-30.
- Fijan, N., Mata-in, Z., Petrinc, Z., Valpotic, I., Zwillenberg, L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**: 151-158.
- 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**: 786-82.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A., Fisher, M.C. (2005). Chytrid fungus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **11** (10): 1639-1641.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham A.A., Fisher, M.C. (2006). The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, **2**: 455-459.
- 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.

- 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. *Journal of Virology*, **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.
- Göçmen B., Veith M., I ci N., Akman B., Godmann O., Wagner N. (2013). No Detection Of The Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Terrestrial Turkish Salamanders (*Lyciasalamandra*) Despite Its Occurrence in Syntopic Frogs (*Pelophylax bedriagae*). *Salamandra*, **49(1)**: 51-55
- Gray MJ, Miller DL, Hoverman JT (2009) First report of *Rana virüs* infecting lungless salamanders. *Herpetol Reviev*, **40**: 316-319
- Green ve ark. 2002 Green D.E., K. A. Converse, A. K. Schrader. 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996ö2001. *Ann New York Academy Sciences*, **969**:323ö339.
- 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., 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 Diseases*, **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**: 1756192
- 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., 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., 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.
- Joyce E. Longcore, Department of Biological Sciences, University of Maine, Orono, Maine 04469-5722

- 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 Diseases*, **44**:851-863.
- Karling, J.S. (1977). Chytridiomycetorum Iconographia: An Illustrated and Brief Descriptive Guide to the Chytridomycetous Genera with a Supplement of the *Hyphochytriomycetes* (Lubrecht and Cramer, Monticello, NY).
- Kashi, Y., King, D.G. (2006). Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genetics*, **22**:253-259.
- Kaur, K., Rohozinski, J., Goorha, R. (1995). Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene. *Journal Genetics Virology*, **76 (Pt 8)**:1937-1943.
- Kruger, K.M., Hero, J.M. (2006). Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth*, **3**: 171 ó 177.
- Kruger, K.M., Hero, J.M. (2007). The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is nonrandomly distributed across amphibian breeding habitats. *Diversity and Distributions* **13**: 781ó788.
- 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 Diseases*, **23**: 379-388.
- 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 redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*, **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 Diseases*, **11**: 93-96.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., R.A., Alford, Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P., Collins, J.P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **103**: 316563170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**: 2196227.
- 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.
- 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**: 1736-179.
- 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.
- Moody, N.J.G., Owens, L. (1994). Experimental demonstration of pathogenicity of a

- frog virus, bohle iridovirus, for fish species, barramundi *Lates calcifer*. *Disease of Aquatic Organisms*, **18**: 95-102.
- 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.
- Muths E, Gallant AL, Campbell EHC, Battaglin WA and others (2006) The Amphibian Research and Monitoring Initiative (ARMI): 5-year report. US Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5224
- Nair, V., Zavolan, M. (2006). Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiology*, **14**: 169-175.
- OIE. (2006). Epizootic haematopoietic necrosis. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. *World Organisation for Animal Health*, 82-103.
- OIE. (2011). Diseases listed by the OIE. In: Aquatic Animal Health Code, Chapter 1.3. *World Organisation for Animal Health*
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P. (2001). Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Diseases 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.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore J.E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96**: 9615.
- 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.
- 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.
- Speare R, Smith JR (1992) An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis Aquant Org*, **14**: 51-57
- 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.
- Stagni, G., Dall'olio, R., Fusini, U., Mazzotti, S., Scoccianti, C., Serra, A. (2004): Declining populations of Apennine yellow bellied toad *Bombina pachypus* in Northern Apennines, Italy: is *Batrachochytrium dendrobatidis* the main cause. *Ital.J.Zool.* **71**(Suppl.2): 5-13
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C and others (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, **326**: 582-585
- 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*. *Diseases 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.
- 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.
- Une Y, Sakuma A, Matsueda H, Nakai K, Murakami M (2009) Ranavirus outbreak in North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*), Japan, 2008 *Emerging Infectious Diseases Journal*, **15**: 1146-1147
- 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. *Currern Topics in Microbiology and Immunology*, **116**: 77-106.
- 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. *Diseases 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, **33**: 1-9.

nternet Kaynaklar,

1. www.globalamphibians.org (3.3.2013)
2. <http://www.spatialepidemiology.net/B.dendrobatidis> (20.3.2013)
3. <http://www.hakkinda-bilgi-nedir.com> (12.4.2014)
4. <https://www.savethefrogs.com/threats/chytrid> (2.3.2013)
5. <http://www.iucnredlist.org> (10.4.2013)

ÖZGEÇM

Ad, Soyad, : Dilay YUMUK
Do um Yeri ve Tarihi : Göztepe / stanbul 03.07.1989
Yabanc, Dili : ngilizce
leti im (Telefon/e-posta) :dilay.yumuk@hotmail.com

E itim Durumu (Kurum ve Y,l)

Lise : Körfez Hereke Lisesi 2006
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi 2011
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi -

Çal, t, , Kurum/Kurumlar ve Y,l :

Celtis laç Tan,t,m ve Pazarlama A. 2013 ó 2014
lko laç Sanayi A. 2014 - Çal, ,yor

Yay,nlar, (SCI ve di er) :