

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİZE VE GÜMÜŞHANE İLLERİNDEKİ *Mertensiella caucasica*
(Waga, 1876) POPÜLASYONLARINDA CHYTRIDIOMYCOSIS
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

SÜMEYYE ALTUNIŞIK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SERKAN GÜL
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. BİLAL KUTRUP
PROF. DR. NURHAYAT ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİZE VE GÜMÜŞHANE İLLERİNDEKİ *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876)
POPÜLASYONLARINDA CHYTRİDİOMYCOSİS VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Serkan GÜL danışmanlığında, Sümeyye ALTUNIŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/05/2019 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Bilal KUTRUP
Üye	: Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR
Üye	: Doç. Dr. Serkan GÜL

İmzası




Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Dağılımı Gürcistan ve Türkiye ile sınırlı olan ve IUCN Kırmızı listesinde duyarlı (Vulnerable) kategorisinde yer alan ve ülkemiz biyoçeşitliliği açısından büyük önem arz eden Kafkas semenderinde (*Mertensiella caucasica*) Chytridiomycosis varlığını araştırmak üzere planlanan bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu araştırmanın konusu, arazi ve deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında, tecrübesi ve bilgileriyle her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Serkan GÜL'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başarılı bir şekilde yürütülmesinde katkıları olan aynı zamanda Biyoloji bölüm başkanı olan sayın Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR'e ve real time PCR tekniğinin uygulanmasındaki yoğun emeklerinden dolayı sayın Dr. Ayşenur EMİNOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Yine çalışmalarımın tüm aşamasında desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü sıkıntıda yanımda olan kıymetli eşim Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK'a ve verdikleri eğitimle bugünlere gelmemi sağlayan değerli anne ve babama minnetlerimi sunarım.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi Tübitak tarafından 116Z131 nolu proje ile desteklenmiştir.

Sümeyye ALTUNIŞIK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Rize ve Gümüşhane İllerindeki *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876) Popülasyonlarında Chytridiomycosis Varlığının Araştırılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 21/05/2019



Sümeyye ALTUNIŞIK

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

RİZE VE GÜMÜŞHANE İLLERİNDEKİ *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876) POPÜLASYONLARINDA CHYTRİDİOMYCOSİS VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Sümeyye ALTUNIŞIK

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Doç. Dr. Serkan GÜL

Chytridiomycosis, sucul fungal patojenler olan *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) ve *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*)'in neden olduğu bulaşıcı bir amfibi hastalığıdır. Dağılım alanı Gürcistan ve Türkiye ile sınırlı olan ve IUCN Kırmızı listesinde duyarlı (Vulnerable) kategorisinde yer alan *Mertensiella caucasica* (Kafkas Semenderi)'da Chytridiomycosis varlığını araştırmak üzere planlanan bu çalışmada ülkemiz biyoçeşitliliği açısından büyük önem arz eden Kafkas semenderi hem *Bd* hem de *Bsal* açısından ilk kez test edilmiştir. 2 farklı popülasyonda (Rize ve Gümüşhane) yaşayan toplam 20 bireyin derilerinden sürüntü örneği alınarak DNA izolasyonları yapılmış ardından Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) tekniği kullanılarak Chytridiomycosis hastalığının bu canlılara bulaşıp bulaşmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar bireylerin hiçbirisinde Chytridiomycosis hastalığının olmadığını göstermiştir. Kafkas semenderinin yaşadığı iki farklı popülasyonda hastalığın varlığına dair bir ize rastlanılmamış olması türün habitat seçiciliği ile ilişkilendirilebilir. Su kalite sınıflandırmasına göre birinci kalite yani içilebilir su kalitesinde olan habitatlarda yaşayan bu tür genellikle yüksek rakımlı yerlerde potansiyel olarak daha fazla bulunma eğilimindedir. Bu yüzden insan etkisinin nispeten daha az olduğu yüksek rakımlı habitatlarda yaşayan Kafkas semenderinin Chytridiomycosis hastalığına yakalanmamış olabileceğini düşünüyoruz.

2019, 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoçeşitlilik, Koruma, Fungal Hastalık, Semender, *Mertensiella caucasica*

ABSTRACT

The Investigation Of The Presence Of Chytridiomycosis In *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876) Populations In Rize And Gümüşhane Provinces

Sümeyye ALTUNIŞIK

**Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology.
Master Thesis
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serkan GÜL**

Chytridiomycosis is an infectious disease of amphibians caused by two aquatic fungal pathogens, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*). In this study, which aimed to investigate Chytridiomycosis presence on *Mertensiella caucasica* (Caucasian Salamander) which categorized as being Vulnerable in IUCN red list and its distribution is limited with Georgian and Turkey, Caucasian salamander which is crucial for the Turkish biodiversity tested for positive both for *Bd* and *Bsal* for the first time. DNA was extracted from the skins of 20 individuals living in 2 different populations (Rize and Gümüşhane) and then Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) technique was used to determine whether Chytridiomycosis disease infect these organisms or not. The results showed that none of the patients had Chytridiomycosis disease. The fact that there are no signs of the presence of the disease in two different populations of Caucasian salamander could be related to the habitat selectivity of the species. According to the water quality classification, this type of habitat, which is of first quality, ie in potable water quality habitats, tends to be more likely to be at higher altitude locations. Therefore, we think that Caucasian salamanders that live in high altitude habitats where human impact is relatively less may not have been infected with Chytridiomycosis.

2019, 36 pages

Key words: Biodiversity, Conservation, Fungal Disease, Salamander, *Mertensiella caucasica*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Literatür Bilgisi	2
1.3. Amfibiler Hakkında Genel Bilgiler	7
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Kafkas Semenderinin Sistematikteki Yeri	12
2.1.2. Kafkas Semenderinin Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri	13
2.1.3. Coğrafi Dağılışı.....	14
2.2. Yöntem.....	15
2.2.1. Çalışma Alanı ve Birey Sayıları	15
2.2.1.1. Güvenköy (Rize) Habitatı	15
2.2.1.2. Kocadal (Gümüşhane) Habitatı.....	16
2.2.3. Swablardan DNA İzolasyonu	17
2.2.4. Elektroforez İşlemi.....	18
2.2.5. Real Time PCR (qPCR) İşlemi	18
2.2.6. Habitat Kalitesi Parametrelerinin Analizi	19
3. BULGULAR.....	21
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	24
5. ÖNERİLER.....	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Dünya genelinde <i>Bd</i> ⁺ görülen yerler (URL-1).....	6
Şekil 2.	Dünya genelinde <i>Bsal</i> ⁺ görülen yerler (URL-2).....	6
Şekil 3.	<i>Mertensiella caucasica</i> dişi bireyi (Fotoğraf: Serkan GÜL).....	12
Şekil 4.	<i>Mertensiella caucasica</i> (Kafkas semenderi)'nin dağılışı haritası	14
Şekil 5.	Örneklemenin yapıldığı lokaliteler (1: Güvenköy, İkizdere/Rize; 2: Kocadal köyü, Torul/Gümüşhane)	15
Şekil 6.	Rize Güvenköy Habitataı	16
Şekil 7.	Gümüşhane Kocadal köyü habitataı.....	17
Şekil 8.	Steril tek kullanımlık swabla sürüntü alınması (a) ve swabın tüpe yerleştirilmesi (b)	18
Şekil 9.	5.8S rRNA ve ITS bölgelerinin şematik çizimi.....	19
Şekil 10.	Rize popülasyonunda 1 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Serkan GÜL)	21
Şekil 11.	Rize popülasyonunda 5 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Serkan GÜL)	22
Şekil 12.	Gümüşhane popülasyonunda 1 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Abdullah ALTUNIŞIK).....	22
Şekil 13.	Gümüşhane popülasyonunda 2 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Abdullah ALTUNIŞIK).....	22

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR’de kullanılan primer ve problemler.....	20
Tablo 2. Tüplerin DNA yoğunluğu	20
Tablo 3. Habitatlara göre bazı parametrelerin ölçüm sonuçları	23



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<i>Bd</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
<i>Bsal</i>	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IUCN	Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	Real Time



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Sayıları dünya genelinde yaklaşık 8000 kadar olan amfibiler Antarktika kıtası hariç hemen her yerde yaşarlar. Eski Yunancada çift anlamına gelen “amphi” ve yaşam anlamına gelen “bios” kelimelerinden türetilen Amphibia sınıfı, adını yaşam tarzından almıştır. Hem karada hem de suda yaşamaları sebebiyle diğer canlı gruplarından farklılık arz ederler. Amphibia sınıfı 3 takımdan oluşur. Kuyruksuz kurbağaların yer aldığı Anura takımında 7016 tür, su keleri ve semenderler gibi kuyruklu kurbağaların bulunduğu Urodela takımında 716 tür, bacaksız kurbağaların yer aldığı Apoda takımında ise 209 tür yer alır (Amphibiaweb, 2019).

2004 yılında yapılan küresel bir değerlendirmede (Baillie vd., 2004), dünyadaki amfibilerin yaklaşık üçte birini temsil eden 1.856 türün tehlike altında olduğu rapor edilmiştir. Yeryüzünde 300 milyon yıldan fazla bir süredir var olan amfibilerin sayısı son yirmi yıl içinde endişe verici düzeyde düşüşe geçtiği nitekim yaklaşık 168 türün soyu tükendiği ve en az 2.469 popülasyonun azalma trendine girdiği belirtilmektedir (Skerratt vd., 2007). Bu durum, tükenmiş ve tehdit altındaki türlerin sayısının muhtemelen artmaya devam edeceğini göstermektedir (Stuart vd., 2004). O halde amfibi popülasyonları neden azalmaktadır? Bunun birçok nedeni vardır. Habitatın bozulması veya yıkılması, bulaşıcı hastalıklar, iklim değişikliği ve hayvan ticaretinin artması gibi faktörler bu tehlikelerin başında yer almaktadır (Collins ve Cramp, 2009; Collins, 2010). Son yıllarda hayvan ticaretinin artmasıyla paralel bir şekilde artan amfibi ölümlerinin sorumlusu olarak Chytridiomycosis adı verilen bulaşıcı bir hastalık gösterilmektedir. Günümüzde bu fungal hastalık tüm dünyaya yayılmış ve amfibiler için en büyük tehdit haline gelmiştir (Scheele vd., 2019).

Chytridiomycota sınıfının bir üyesi olan *Batrachochytrium* cinsine ait türlerin sebebiyet verdiği, amfibilerde bilinen tek bulaşıcı hastalık olan Chytridiomycosis, bu canlıların deri kısmında elektrolit kaybı ve osmotik dengesizlik gibi önemli fizyolojik

fonksiyon bozukluklarına yol açar ve devamında kalp krizi ile birlikte ölümlerine sebebiyet verir (Berger vd., 1998; Voyles vd., 2007).

Ülkemizde Chytridiomycosis varlığının araştırılmasına ait iki çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan biri Akdeniz bölgesi (Göçmen vd., 2013), diğeri ise Ege bölgesi ile (Erişmiş vd., 2014) sınırlıdır. Karadeniz bölgesi de dâhil diğer bölgelerde yapılan bir çalışma bildiğimiz kadarıyla mevcut değildir. Bu yüzden ülkemiz sınırlarında sınırlı yayılış gösteren ve Kafkasya bölgesine endemik olan *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi) için bahsedilen mantar hastalığının bulaşıp bulaşmadığının belirlenmesi, türün korunmasına dair önlemler alınmasına katkı sağlayacaktır. Bu amaçla, yapılan bu çalışmada Kafkasya bölgesine endemik olan ve Türkiye'nin sadece Doğu Karadeniz Bölgesinde yaşayan ve Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN) ölçütlerine göre Kırmızı Liste'de (Red List) "Hassas hayvanlar (Vulnerable, VU)" kategorisinde yer alan *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi)'nin Rize ve Gümüşhane'de yaşayan iki popülasyonunun *Bd* ve *Bsal* patojenleri tarafından enfekte edilip edilmediği araştırılmıştır.

1.2. Literatür Bilgisi

Chytridiomycosis, Chytridiomycota şubesinde yer alan *Batrachochytrium* *Batrachochytrium* cinsine ait sucul ortamda yaşayan türlerin (*Batrachochytrium dendrobatidis*: *Bd*; *Batrachochytrium salamandrivorans*: *Bsal*) amfibilerde kitlesel ölümlere ve azalışa sebebiyet verdiği ve tüm dünyada hızla yayılmakta olan bulaşıcı bir amfibi hastalığıdır (Berger vd., 1998; Daszak vd., 2000; Bosch vd., 2001, Rachowicz vd., 2006). Goka vd. (2009) bir çalışmasında "yeni patojen hipotezi" ve "endemik patojen hipotezi"nin bir kombinasyonu olarak hastalığın mevcut yaygınlığını açıklamıştır. Chytridiomycosis, cildin sürekli olarak patojenler (*Bd* ve *Bsal*) tarafından enfekte edilmesine dayalı bir hastalıktır. Bu durum mevcut patojenlerin yaşam döngülerini devam ettirmeleriyle, suyla taşınan zoosporlar vasıtasıyla, amfibi larvalarının ağız parçalarının parazitlere ve metamorfoz sonrası safhada ise enfeksiyona maruz kalmasıyla oluşur. Larvalarda enfeksiyon sadece ağız kısmındaki keratinleşmiş dokularda tespit edilir ancak bazı durumlarda larvaların kuyruk kısımlarında da oluştuğu bildirilmiştir (Berger vd., 1998; Longcore vd., 1999; Marantelli vd., 2004; Kriger ve Hero 2007; Brodman ve

Briggler, 2008). *Bd* enfeksiyonları patofizyolojik değişimlere sebep olur ve bu değişimler ya hastalık durumuna öncülük eder ya da potansiyel olarak ölüme sonuçlanır. Chytridiomycosis oluştuğunda, amfibi epidermisi içerisinde elektrolit taşınımı %50 ye kadar engellenir, sodyum ve potasyumun hücre sitoplazmasındaki konsantrasyonu düşer ve asistolik kalp durması ölüme sebep olabilir. Çünkü sağlam deri amfibi iç dengesinin korunmasında önemli bir faktördür, deri fonksiyonunu bozan madde ya da maddelerin, doğrudan *Bd*'nin salgı ürünlerinin mekanizması olduğu düşünölmektedir (Voyles vd., 2007).

Bd amfibilerin olduğu her yerde, başka bir deyişle Antarktika kıtası hariç tüm kıtalarda bulunur (Fisher vd., 2009). *Bd* enfeksiyonlarına deniz seviyesinden (*Leptodactylus fallax* türü, Karayiplerde), amfibilerin ulaşabileceği en yüksek rakımlara (*Pleurodema marmoratum* ve *Telmatobius marmoratus* türleri, 5,348 m yükseklikteki Peru Andları,) kadar geniş bir skalada rastlamak mümkündür (Seimon vd., 2006). Sadece amfibilere özgü sucul bir patojen olan *Bd*, keşfedilmesinden bu yana dünya genelinde amfibilerin %40'ından fazlasını (>200) yok olma noktasına getiren ve bu canlıların biyoçeşitliliğini tehdit eden en önemli unsurdur (Martel vd., 2013). *Bd* kaynaklı enfeksiyonlara şu ana kadar çok sayıda kuyruksuz ve kuyruklu kurbağa türleri ile bir bacaksız kurbağa türünde (*Typhlonectes sp.*) rastlanılmıştır (Whittaker ve Vredenburg, 2011). Fisher vd. (2009)'ne göre 350'den fazla amfibi türünde *Bd*'den kaynaklı enfeksiyon tespit edilmiştir. *Bd*'nin göl sularında enfeksiyon yapabilme süresi 7 haftaya kadar çıkabilmektedir (Johnson vd., 2003). Hastalığın su, toprak ve hayvanlara bulaşması uygun karantina ve enfeksiyonu uzaklaştırma stratejileriyle hassasiyetle tarandığı takdirde, daha fazla yayılması engellenebilir (Boyle vd., 2004).

Daha önceleri bu hastalığa tek bir türün (*Bd*) sebep olduğu bilinmekteydi. Son zamanlarda Hollanda'da yaşayan Avrupa lekeli semenderlerinin (*Salamandra salamandra*) esrarengiz bir biçimde ölüm sayılarının artması ve bunun önüne geçilemediği Spitzen-van der Suluijs vd. (2013) tarafından rapor edilmiştir. Bu rapora göre 2010 yılından beri birey sayısındaki azalma 2013 yılına gelindiğinde popölasyonun sadece % 4'lük bir kısmının geride kalmasına neden olmuştur. Bu durum kalan 39 bireyin *ex situ* (doğal ortam dışında) koruma programına alınmasını sağlamıştır. Fakat Kasım ve

Aralık 2012 tarihleri arasında bu programa alınan bireylerin % 49'unun beklenmedik ölümü bu semenderlerin neslini tehlike altında bırakmaktan kurtaramamıştır. *Bd*'nin de dahil olduğu bilinen amfibi patojenlerinin bu semenderde var olup olmadığını belirleyen tüm testler negatif çıkmıştır (Spitzen-van der Suluijs vd., 2013).

Martel vd. (2013), Avrupa lekeli semenderi (*Salamandra salamandra*) popülasyonlarını yok olma noktasına getiren bu hızlı azalmanın sebebinin araştırılmışlar ve daha önce tanımlanmamış *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) adını verdikleri yeni bir türün bu semenderlerin ölümüne sebebiyet verdiğini bulmuşlardır. Yaptıkları histolojik ve filogenetik çalışmalar neticesinde *Bsal*'ın *Bd*'den farklı morfolojik ve genetik özelliklere sahip olduğunu ve aynı zamanda ekolojik açıdan daha düşük sıcaklıkta en uygun büyümeyi sağladığını tespit etmişlerdir.

Yakın bir zamana kadar Chytridiomycosis teşhisi hayvanların ayak parmakları veya deri sürüntüsünün hematoksilin-eozin ile boyanmasına dayanan histolojik incelemeyle yapıyordu (Daszak vd., 1999). *Bd*'ye karşı poliklonal antikörlerin immunoperoksidaz boyanması ise teşhisin özgünlüğünü ve duyarlılığını arttırmıştır (Berger vd., 2002). Daha yakın bir zamanda geliştirilen bir boyama protokolüne göre amfibi derisindeki *Bd* ve keratinin yerini birlikte belirlemeye yarayan teşhis yöntemi tanıtıldı (Hyatt vd., 2007). Fakat histolojik yöntemde hastalığın tanımlanabilmesi için uzmanlık gerektirmesi, parmak kesiti alırken herhangi bir mikrobu vücuda nüfuz edebilme olasılığı, harcanan fazla zaman, testin düşük duyarlılığı ve parmaklar arasındaki enfeksiyon düzeyi farklılıkları gibi negatif özellikler bu yöntemin dezavantajları arasında sıralanabilir (Boyle vd., 2004; Livo vd., 2004; Canestrelli vd., 2013).

Bu taramayı yapabilecek moleküler testler Annis vd. (2004) ve Boyle vd. (2004) tarafından tanıtılmıştır. Bunlardan ilki normal PZR, ikincisi ise real time PZR'dir. Temelde belirli bir gen bölgesini çoğaltmaya yarayan bu testler, *Bd*'ye bağlı enfeksiyonları yüksek duyarlılıkla teşhis edebilen ve yayılmacı olmayan, bu yönüyle de araştırmacıların tercih ettiği yöntemlerdir. Histolojik metottan farklı olarak 7 ile 14 gün (veya daha fazla) arasında enfeksiyonu erken teşhis etme avantajı bulunan bu testler, 1 tek zoosporu dahi miktar olarak ölçülebilir niteliktedir (Boyle vd., 2004). *Bd*'nin erken

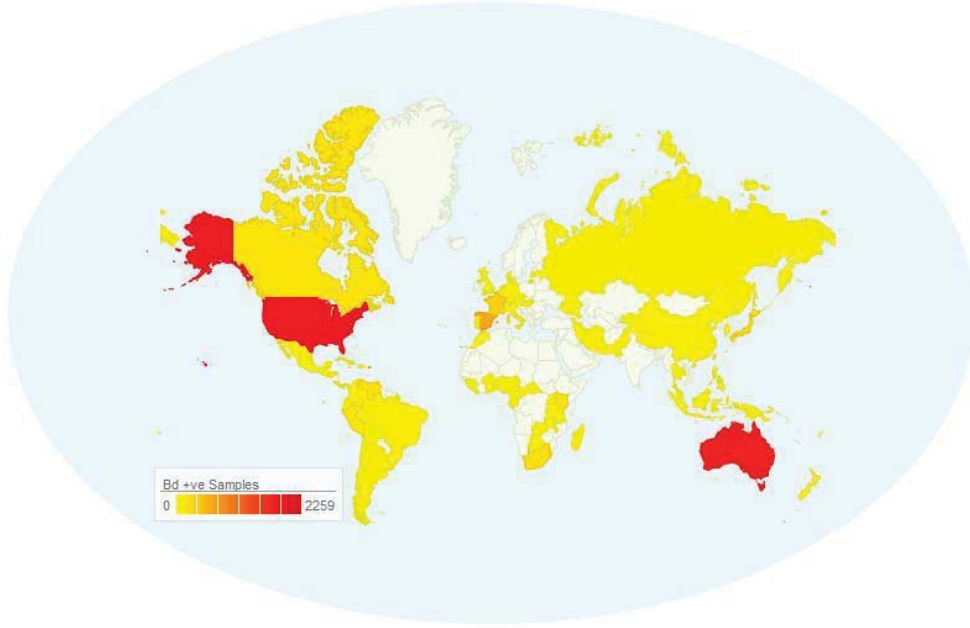
teşhisi hastalığın dünyadaki amfibi ticareti ile yayılmasını kontrol altına almak için hayati derecede önemlidir. (Boyle vd., 2004). Zira *Bd*, zoolojik koleksiyon (Pessier vd., 1999), uluslararası hayvan ticareti (Mutschmann vd., 2000), laboratuvar hayvanı ticareti (Parker vd., 2002) ve gıda ticareti (Mazzoni vd., 2003) gibi amaçlarla ithal edilen hayvanlarda tespit edilmiştir. Hastalığın erken teşhisi, özellikle nesli tehlike altında olan hayvanların tedavi edilmesine yönelik atılacak adımlara da olanak sağlayacaktır (Boyle vd., 2004).

Göçmen vd. (2013), Türkiye'deki Chytridiomycosis varlığını ilk kez Levanten kurbağası (*Pelophylax bedriagae*) için Göynük kanyonu (Antalya, Akdeniz bölgesi)'nden bildirmişlerdir. Türkiye'de var olan tüm *Lyciasalamandra* türlerine ait 12 popülasyondan toplam 330 bireyin *Bd* patojeni açısından test edilmesi sonucunda tüm bireylerin bu patojen açısından negatif olduklarını fakat bu semenderle simpatrik olarak yaşayan *Pelophylax bedriagae* ve *Bufoetes variabilis* kurbağalarını test ettiklerinde ise bunlardan ilkinin %50 oranında *Bd+* olduklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışma, Chytridiomycosis hastalığının ülkemizde var olduğunu göstermesi açısından dikkate değerdir.

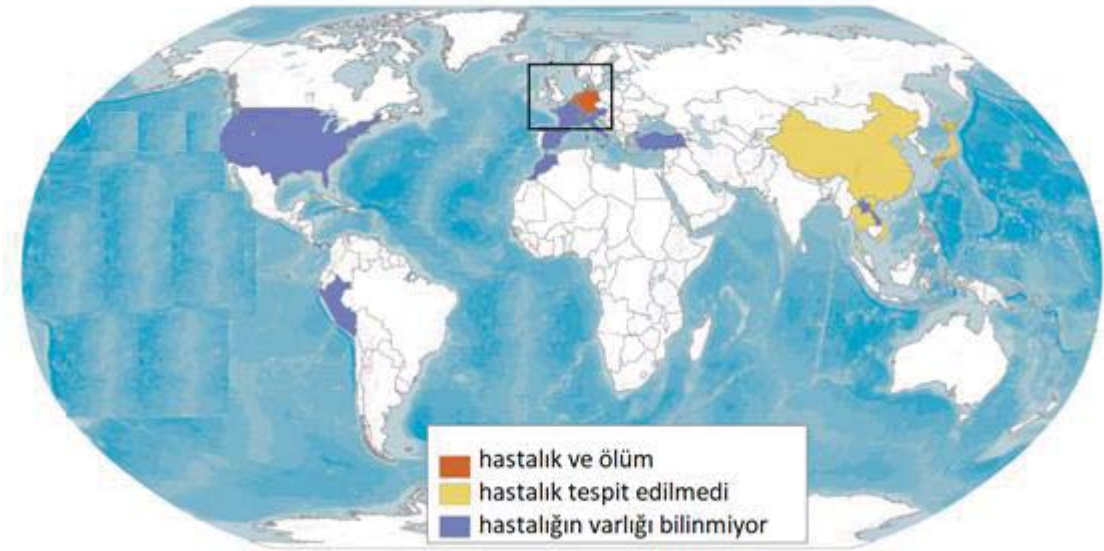
Daha sonraları Erişmiş vd. (2014), 2 farklı lokasyondan (26 Ağustos Ulusal Parkı, Afyonkarahisar ve Göller Bölgesi, Afyonkarahisar-Isparta) aldıkları 7 amfibi türüne (*Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Bufoetes variabilis*, *Pelophylax caralitanus*, *Pelobates syriacus*, *Triturus karelinii*) ait toplam 228 bireyi *Bd* açısından test etmişler ve bu türlerin beşinde (*Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Bufoetes variabilis* ve *Pelophylax caralitanus*) *Bd*'den kaynaklanan mantar hastalığını rapor etmişlerdir.

Şekil 1'de gösterilen haritada bu vakaların henüz kayıt altına alınmadığı görülmektedir. Bahsedilen çalışmalar Akdeniz (Antalya ve çevresi, Göçmen vd., 2013) ve Ege (Afyonkarahisar ve Isparta Göller Yöresi, Erişmiş vd., 2014) bölgelerinde gerçekleştirilmiş olup diğer bölgelere ait herhangi bir çalışma mevcut değildir. Üstelik bu bölgelerde *Bsal* açısından bir tarama gerçekleştirilmemiştir. *Bsal* patojeni yeni keşfedildiğinden bundan kaynaklı hastalık kayıtları da çok fazla olmamakla birlikte gün geçtikçe artmaktadır. Şekil 2'de haritada gösterildiği üzere ölümlü hastalıklar sadece Belçika, Hollanda ve Almanya'dan bildirilmiş olup, Türkiye'de *Bsal* açısından bir taramanın gerçekleştirilmemiş olduğu anlaşılmaktadır. Diğer bölgelerdeki durumun

açıklığa kavuşturulması amfibi biyoçeşitliliğinin devamı açısından önem taşımaktadır. Bu yüzden ülkemiz sınırlarında sınırlı yayılış gösteren ve Kafkasya bölgesine endemik olan *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi)'ya bahsedilen mantar hastalığının bulaşıp bulaşmadığının belirlenmesi, türün korunmasına dair önlemler alınmasına katkı sağlayacaktır.



Şekil 1. Dünya genelinde *Bd*+ görülen yerler (URL-1)



Şekil 2. Dünya genelinde *Bsal*+ görülen yerler (URL-2)

1.3. Amfibiler Hakkında Genel Bilgiler

Omurgalı hayvanların bir sınıfı olan amfibiler sistematikte balıklar ile sürüngenler arasında yer alır. Embriyonik gelişmelerinde amniyon zarının bulunmayışı (embriyolarının çıplak olması) nedeniyle balıklar ile amfibiler, omurgalıların Anamnia (amniyon zarı bulunmayanlar) grubunu oluştururlar. Amfibiler sudan karaya geçen ilk omurgalı sınıfı (Lauder ve Reilly, 1994) olmakla birlikte aynı zamanda dört üyeli omurgalıların (Tetrapoda) bir üyesi konumundadırlar (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Bu sınıfa ait olan birçok tür hem karada hem de suda yaşama yeteneğine sahiptir. Genel olarak yumurtaların gelişimi ve larva evresi suda geçirilirken, ergin evrede karaya geçenlerin büyük bir çoğunluğu da üreme zamanı suya girer. Böyle bir yaşam tarzı önemli morfolojik ve anatomik değişiklikleri de beraberinde getirmiştir. Yüzgeçler yerine bacakların, solungaçlar yerine akciğerlerin meydana gelmesi bu değişikliklerdendir. Bununla beraber, larva evrelerinde sucül karakterler daha belirgindir (bu evrede solungaç solunumu yapmaları gibi) (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Su formundan kara formuna geçişte amfibilerde çok önemli anatomik değişiklikler olmuştur. Amfibiler, deri koruması olmayan tek canlı sınıfıdır. Pullu balık derisi yerine amfibilerde, yumuşak ve çıplak deri görülür. Amfibi derisi de diğer omurgalıları benzer bir şekilde epidermis ve dermis olmak üzere iki tabakadan meydana gelmiştir. Deri, her zaman mukus, bazen de zehir bezlerini ve pigment hücrelerini içerir. Amfibi derisinin kan damarı bakımından çok zengin olması bunların solunumda akciğerlere yardımcı olmasını sağlar (Demirsoy, 1997).

Epidermis, çok tabakalıdır (en az iki tabaka olur). En dıştaki (stratum corneum) boynuzsu bir tabaka olup ölü hücreler içerir. Bu tabaka su kaybının önlenmesine yardımcı olur ve aynı zamanda kara hayvanlarında karakteristik olup, birçok semender türünde bulunmaz. Örneğin, hayatının tamamını veya büyük bir kısmını su içinde geçiren bazı kuyruklu kurbağalarda ölü olan üst kısım düzenli bir şekilde bir bütün olarak dökülür. Özellikle *Ommatoriton* cinsine ait semenderlerin adeta içi boş şeffaf bir torba gibi suya bıraktıkları ölü derilerini görmek mümkündür. *Rana* ve *Bufo*'larda da durum benzerdir;

fakat dökülmüş bir *Bufo* derisine rastlamak hemen hemen imkânsızdır. Çünkü deri dökülmesi sırasında, kıvrılıp bükülmeden dolayı yırtılma olur, deri parçalanır ve sonra da hayvan tarafından yenir. Dermis, epidermis altında uzanan ve ondan daha kalın olan bir kısım olup, iki tabakadan oluşur. Bunlar daha içteki kompakt (*stratum compactum*) tabaka ve daha dıştaki, gevşek olan (*stratum spongiosum*) tabakasıdır. Gevşek tabakada bol miktarda mukus ve zehir bezleri ile vücut renklerinden sorumlu olan pigment hücreleri (kromatoforlar), bol miktarda kan damarları ve sinirler yer alır. Deri, kan damarı bakımından fevkalade zengin olduğundan, solunumda akciğerlere yardımcıdır. Deri bezleri, işlevlerine erken larval evrede başlarlar. Örneğin, larvanın başı üzerindeki bezler, yumurta kapsülünün gevşemesi için enzim salgılar. Balıklarda bulunan bezlerden farklı olarak amfibi bezleri çoğunlukla çok hücrelidirler. Bazı cinslerin (*Salamandra* ve *Bufo* gibi) çok hücreli zehir bezleri iyi gelişmiş olup gruplaşarak paratoid bezlerini oluştururlar. Genel olarak salgıları süt renginde olan zehir bezleri, ancak basınç veya incinme halinde faaliyete geçtikleri halde, çoğunlukla salgıları renksiz olan mukus bezleri basit uyarımlarla salgı yaparlar (Kuru, 1999).

Bazı kurbağa cinslerinin (*Bufo* ve *Salamandra* vb. gibi) derilerinden elde edilen zehirli salgılar, vücut içine enjekte edilirse ölüme sebebiyet verebilir. Bu amaçla yapılan deneylerde kelebeklerin ve küçük kuşların birkaç dakika sonra öldükleri; kobay, tavşan, köpek gibi memelilerin ise bir saatten daha az bir süre içinde aynı akıbetine uğradıkları gözlenmiştir. Genel olarak amfibi zehrinin çıplak deriye zararı yoktur; ancak bazı türler insan derisinde iltihaplanmalara neden olabilir. Ayrıca Afrika'daki bazı kurbağaların zehir bezlerinden zehirli ok yapıp, bunların silah olarak da kullanıldığı bilinmektedir (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Amfibiler hem karada hem de suda yaşadıkları için solunum sistemleri de buna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Amfibi larvaları erken evrelerde dış solungaçlar ile solunum yaparlar, sonra iç solungaçlar meydana gelir. Metamorfozlarını tamamlayan larvalar ergin hale geçince iç solungaçların yerini akciğerler alır. Metamorfoz geçirmeyen ya da yarı metamorfoz geçiren (neoteni) amfibilerde, solungaçların yaşam boyu kullanıldığı görülmüştür. Amfibilerde, akciğer solunumundan başka deri solunumu ve ağız boşluğu solunumu da görülür. Kan damarlarıyla sıkı bir şekilde kaplanmış deri,

birçok amfibinin solunumunda önemli rol üstlenir. Larvalardaki deri solunumu genellikle kuyruk yüzgecinin genişlemiş kısımlarında gerçekleştirilir (Demirsoy, 1998).

Amfibilerin yaşama ortamları çok farklı olduğundan, hareket tipleri de buna bağlı olarak farklılık gösterir. Larvalar kuyruklarıyla hareket ederler. Bazı türlerin larvaları, hızlı akan sulara direnebilmek için tutunma ve yapışma organı geliştirmişlerdir. Ergin amfibilerde ise, yüzme derisi olmayan veya az gelişmiş sucul kuyruklu kurbağalarda, yüzme esnasında üyeler vücuda doğru çekilir ve su içindeki hareket, kuyruğun yanlara doğru sallanması ile sağlanır. Sucul kuyruklu kurbağaların üyeleri çok kısadır ve kara ortamında karınlarını yerden kaldırmadan hantal bir şekilde yürürler (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Amfibilerde dikkat çeken özelliklerden birisi de bazı cinslerde (*Salamandra* ve *Neurergus* gibi) fark edilebilir renk ve desenlerin olmasıdır. Bazı bilim adamlarına göre renk bakımından parlak ve çok renkli oluş bir uyarı sayılır. Tropik bölgelerde yaşayan farklı renkteki kurbağaların zehirli olması bunu destekler (Kuru, 1999).

Amfibilerin düşmanları arasında balıkçıl kuşlar, su kaplumbağaları, yılanlar, bazı yırtıcı kuş ve memeliler ve büyük tatlı su balıkları sayılabilir. Derisi zehirli olan kurbağalar, düşmandan korunma konusunda daha şanslıdır. Fakat bunlar da tehlikeden tamamen korunmuş değildir (Kuru, 1999).

Amfibi larvaları da sucul hayvanların saldırı tehlikesi altındadır. Özellikle Rhyncota (Hortumlular) ve Coleoptera (Kıncanatlılar) takımından böcekler amfibi larvalarının en büyük düşmanları arasındadır. Ayrıca, Odonata (Kız böcekleri) larvaları, genç evrelerinde bulunan kurbağa yavrularına büyük zarar verir. Ayrıca, günümüzde insanlar da amfibilerin doğal düşmanları arasındadır (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Amfibiler kural olarak yumurta bırakırlar (ovipardırlar). Fakat yarı gelişmiş yavru doğurma (ovoviviparlık) ve canlı yavru doğurmaya (viviparlık) da rastlanır. Canlı olarak yavru doğuran pek az form (*Nectophrynoidos*) dışında, kuyruksuz kurbağaların tümü dış döllemeyle ürer. Genellikle, erkek dişinin sırtına çıkarak koltuk altına, karnına ya da

kalça kısmına sıkıca sarılır (bu harekete amplexus denir) ve dışarıya çıkan yumurtaları dölleri (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Kuyruklu kurbaçalarda ise Cryptobranchidae ve Hynobidae familyaları hariç iç döllenen görülür. Hem sucul hem de karasal semenderlerde erkekler; kloaklarında oluşturdukları bir ya da daha fazla sayıdaki jelâtinli spermatoforu (sperma kesesi) dış ortama bırakırlar. Daha sonra bu spermatoforlar dişi tarafından kloaka alınıp depo edilir ve böylelikle yumurtlamadan önce yumurtanın dişi vücudunda döllenenmesi sağlanır. Burada iki durumdan bahsedilebilir; ya spermalar hemen yumurta kanalına ulaşarak yumurtaları dölleri ya da yumurtaların oluşmasına kadar belli bir süre kloakta bekletilir. Döllenenin gerçekleşebilmesi, eşey hücreleri oluşumunun ve iletilmesinin zaman bakımından uyumuna bağlıdır. Amfibiler bunun için çeşitli akustik metotlar geliştirmişlerdir. Özellikle *Triturus* cinsinde erkeklerin gerçekleştirdiği çiftleşme seromonisi dikkate değerdir (Kuru, 1999).

Amfibilerde yumurta bırakma işlemi; tek tek (*Triturus* ve *Bombina* cinslerinde) veya kümeler halinde (*Rana* ve *Hyla* cinslerinde) olacağı gibi boncuk dizileri (*Bufo* ve *Alytes* cinslerinde) şeklinde de olabilir. Kural olarak yumurtalarını veya yavrularını koruyamayan amfibilerin yumurta sayısı daha fazladır (Demirsoy, 1997).

Amfibilerin gelişmelerinde çoğunlukla bir larva evresi mevcuttur. Bilindiği gibi larvalar metamorfoz geçirerek ergin hale geçerler. Metamorfozun süresi, türe ve bulunduğu ortama göre değişiklik gösterir. Doğada bilinen en uzun süreli (4–5 sene kadar) larva evresi *Necturus* cinsine aittir. En kısa larva evresi (yumurtadan çıktıktan sonra 12 gün) ise Pelobatidae familyasına ait türlerde görülmüştür. Amfibilerde larva evresi genellikle birkaç ay devam eder. Bu süre dış faktörlere göre değişiklik gösterebilir. Sıcaklık, metamorfoz süresini etkileyen en önemli faktördür. Aynı türün sıcak bölgelerde yaşayan popülasyonlarında bu evre bir üreme zamanında tamamlandığı halde, soğuk bölgelerde yaşayan popülasyonlarında ise bu evre bir yıl veya daha fazla sürebilir (Kuru, 1999).

Metamorfozdan sonra amfibilerin eşeyssel olgunluğa erişebilmeleri için belli bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Bu süre; belli bir yaşa ulaşma veya belli bir vücut büyüklüğüne ulaşmayla yakından ilgilidir. Bazı türlerde bu süre bir yıl kadar olabilirken, bazı büyük boylu türlerde ise birkaç yıl kadar olabilmektedir. Cinsel olgunluğa erişildikten sonra büyüme durmaz, türün erişebileceği boy kadar her yıl artış gösterir (Özeti ve Yılmaz, 1994).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Bu çalışmada *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi, Şekil 3) türüne ait 2 farklı lokaliteden (Güvenköy/Rize ve Kocadal/Gümüşhane) alınan toplam 20 sürüntü örneği kullanılmıştır.



Şekil 3. *Mertensiella caucasica* dişi bireyi (Fotoğraf: Serkan GÜL)

2.1.1. Kafkas Semenderinin Sistematikteki Yeri

Türün sistematik pozisyonu Satoh vd. (2014)'nin çalışmasına dayanarak oluşturulmuştur.

Regnum : Animalia
Superphylum : Chordata
Group I : Craniata
Pylum : Vertebrata
Group II : Gnathostomata

Superclassis : Tetrapoda
Classis : Amphibia
Ordo : Urodela
Familia : Salamandridae
Genus : *Mertensiella*
Species : *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi) (Waga, 1876)

2.1.2. Kafkas Semenderinin Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri

Kafkas semenderi habitat seçici bir türdür özellikle kayın (*Fagus orientalis*), şimşir (*Buxus sp.*), iğne yapraklı ağaçların (*Abies nordmanniana* ve *Picea orientalis*) olduğu Akdeniz çalı ormanlarında ve karma ormanlarda yaşam sürmeyi tercih eder. Bu tür Türkiye’de yaklaşık 500-2800 m. (Özeti ve Yılmaz, 1994), Gürcistan'da ise 50-2400 m. (Tarkhnishvili ve Kaya, 2009) yüksekliklerde akarsu (ırmak v.s.) yakınlarında bulunur. Tür, büyük akıntılardan kaçınma eğilimindedir ve çoğunlukla 1-1,5 m genişliğini ve ilkbaharda 20-30 cm derinliği geçmeyen nehirlerin kollarında yaşar. Bu dereler çoğunlukla gölgede kalmış yoğun bir ağaçsı ve otsu (devekuşu eğreltisi *Mateuccia struthiopteris* dâhil) bitki örtüsüyle kaplıdır. Akarsularda üreyen bu semender genellikle antropojenik olarak değiştirilmiş habitatlardan kaçınır (Kaya vd., 2009).

Gündüzleri taş veya kuru ağaç gölgesi altına saklı olarak yaşar. Gizlendiği yer fazla nemli olmak şartıyla bazen sudan oldukça uzaklarda bulunabilir. Geceleyin aktiftirler, karanlıkta böcek, solucan, örümcek, kırkayak ve tesbih böcekleri gibi daha pek çok omurgasız hayvanları avlarlar. Sığ sulara girebilirler ve bir kertenkele kadar hızlı hareket edebilirler. Yakalamak için kuyruğundan tutulursa kuyruğu kopabilir fakat daha sonra rejenerer olur (Özeti ve Yılmaz, 1994).

Çiftleşme (amplexus) ise erkek dişinin altına girerek ön bacakları ile dişinin ön bacaklarını kavrar. Bazen erkek dişiyi bir bacağı ile tutar, ara sıra iki hayvan kuyruk kısımlarını birbirine dolar. Erkek hedonik bezini dişinin kloakına sürmek suretiyle dişiyi uyarır. Amplexus suda geçer. Çiftleşme ilkbaharda gerçekleşir ve dişinin yumurta bırakması Nisan ile Haziran ayları arasında olur (Özeti ve Yılmaz, 1994). Bir diş normal

olarak 11 ile 24 arası yumurta bırakır. Yumurtalar tek ya da küçük kümeler halinde bırakılır. Bu hayvanlar yumurtaları akarsularda gizli yerlere bırakırlar ya da bitki veya yapraklara yapıştırırlar (Schultschik, 1994a; 1994b; Franzen, 1999).

En küçük bilinen larvaları 35 mm. kadardır. Metamorfoza yakın evrede larvaların boyu 80-85 mm kadardır. Kuyruk yüzgeci arka bacaklar hizasından başlar ve kloaka kadar devam eder. Vücuda nazaran küçük olan solungaçlar az gelişmiştir. Genç larvalar, koyu kahverengi siyahtır. Erginlerdeki gibi sarı lekelerin meydana gelişi daha yaşlı larvalarda görülür (Özeti ve Yılmaz, 1994).

2.1.3. Coğrafi Dağılışı

Mertensiella caucasica Gürcistan'da bulunan Lesser Kafkasya dağının batı kısmında, Güneybatı Gürcistan'da ve Kuzeydoğu Türkiye'de (Şekil 4) bulunan Kafkasya bölgesi için endemik bir türdür (Tarkhnishvili ve Gokhelasvili, 1999). Ülkemiz'de Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerinde; Ordu, Giresun, Trabzon, Gümüşhane, Rize ve Artvin illerinde yayılmıştır (Atatür ve Budak, 1982; Tarkhnishvili ve Gokhelasvili, 1994).



Şekil 4. *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi)'nin dağılışı haritası (IUCN, 2019)

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Alanı ve Birey Sayıları

Çalışma kapsamında Kafkas semenderinin yayılış gösterdiği lokalitelerden Rize ve Gümüşhane’de bulunan 2 popülasyondan örnekleme yapılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Örneklemenin yapıldığı lokaliteler (1: Güvenköy, İkizdere/Rize; 2: Kocadal köyü, Torul/Gümüşhane)

2.2.1.1. Güvenköy (Rize) Habitatı

Kafkas semenderine ait bireylerden elde edilen swab örnekleri Rize'nin İkizdere ilçesine bağlı Güvenköy köyünden alınmıştır (40° 73' 86.58" K, 40° 75' 21.02" D, rakım 1894 m). Şekil 6'dan görüleceği üzere bu habitat küçük bir dereye yakın konumda bulunmakta ve etrafında çok sayıda bitki türü bulunmaktadır. Bunlardan bir aslanpençesi türü olan *Alchemilla caucasica*'nın (kaf şebnemlisi) baskın tür olarak öne çıktığı ve *Juncus* (Kofa) cinsine ait bitki türlerinin de bu habitatta yaşadıkları gözlemlenmiştir. Bu habitata 11 Temmuz 2018 tarihinde arazi gezisi düzenlenmiş ve toplam 10 bireyden deri sürüntüsü elde edilmiş ve habitata ait su numunesi alınarak laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 6. Rize Güvenköy Habitati

2.2.1.2. Kocadal (Gümüşhane) Habitati

Gümüşhane lokalitesi sürüntü örnekleri Torul ilçesine bağlı 1929 rakıma sahip Kocadal köyünden alınmıştır (40° 34' 33.49" K, 39° 16' 88.58" D). Semenderlerin bulunduğu habitat orman vejetasyonuna sahip olup karışık orman tipinde yer almaktadır. Durgun su birikintilerinden oluşan bu habitatın çevresinde *Epilobium angustiolium* L. (Dar yapraklı yakı otu), *Rumex alpinus* L. (Dağ labadası), *Menta longifolia* (Uzun yapraklı nane) ve *Juncus inflexus* (Sazak) gibi otsu bitkiler yaşam sürmektedir (Şekil 7). 17 Eylül 2018 tarihinde bu bölgeye arazi gezisi düzenlenmiş ve toplam 10 bireyden deri sürüntüsü elde edilmiş ve habitata ait su numunesi alınarak laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 7. Gümüşhane Kocadal köyü habitatu

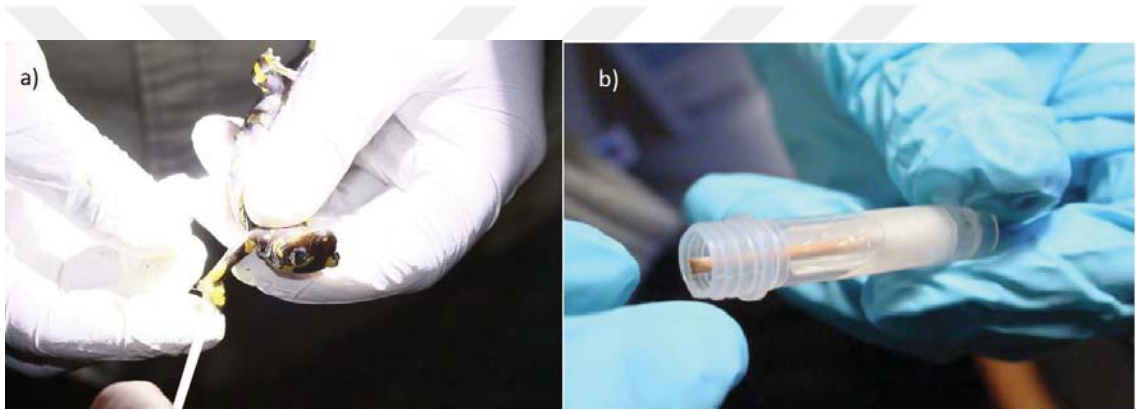
2.2.2. Sürüntü Elde Edilmesi

Sürüntü örneği elde etmek için pamuk uçlu swaplar (Medical Wire & equipment, MW 113, Biomerieux) ile semenderlerin vücutlarının ön ve arka parmaklarını da içeren tüm ventral kısmı steril pamuklu eküvyonlarla Şekil 8a'deki örnek fotoğrafta gösterildiği gibi 25-30 kez silinmiştir. Bu teknik yüzey alanından en fazla miktarda örneklem yapılabilmesi için seçilmiştir ve yanlış negatif sonuç çıkma riskini en aza indirmektedir. Alınan swaplar 2 ml'lik steril ependorf tüplere alınmış (Şekil 8b) ve 10 saat içinde -20 °C'ye taşınarak laboratuvar analizleri yapılincaya kadar burada saklanmıştır (Kriger vd., 2006; Yoldaş 2014).

2.2.3. Swablardan DNA İzolasyonu

Öncelikle çalışılacak örnek sayısı kadar 2 ml'lik vidalı kapaklı tüpler hazırlanıp ve örnek numaraları yazılarak etiketlenmiştir. Tüplerin içerisine 35 mg ağırlığında 0,5 mm çapında zirkonyum/silika boncuklar konulduktan sonra üzerine 50 µl PrepMan Ultra (Applied Biosystems #4318930) ve son olarak swapların sapları kesilerek tüplere

eklenmiştir. Tüplerdeki örnekler vortex cihazı ile 45-60 sn boyunca homojenize edilerek mevcut zoosporların parçalanması sağlanmış, kısa bir süre buz küvetinde bekletilip 13,000 x g de 30 sn santrifüj yapıldıktan sonra homojenizasyon ve santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Tüplerin kapakları 22 numara steril iğneler kullanılarak delinmiş ve tüpler 10 dk boyunca kaynayan su banyosunda bekletilmişlerdir. Su banyosundan alınan örnekler 2 dk. oda sıcaklığında soğumaya bırakılmasının ardından en yüksek hızda (~ 13,000 g.) 3 dk. +4 °C de santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant toplanarak qPCR işlemlerinde kullanılmak üzere 1/10 oranında sulandırılmıştır (~ 5 ng/µl). qPCR çalışması DNA izolasyonu işleminden daha ileri bir tarihte yapılacağı durumlarda DNA örnekleri etiketlenmiş steril 0,5 ml 'lik tüplerde -20 °C de saklanmıştır (Kriger vd., 2006).



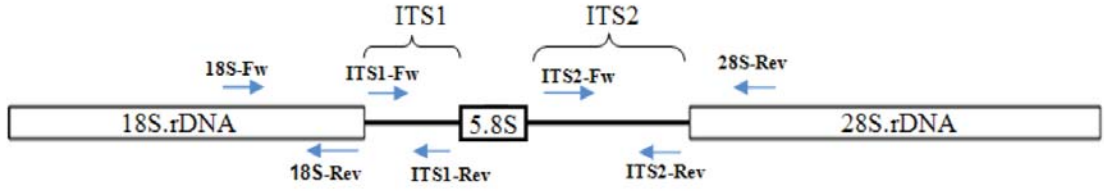
Şekil 8. Steril tek kullanımlık swabla sürüntü alınması (a) ve swabın tüpe yerleştirilmesi (b)

2.2.4. Elektroforez İşlemi

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

2.2.5. Real Time PCR (qPCR) İşlemi

5.8S rRNA ile ITS bölgeleri birbirine bitişik olan gen bölgeleridir (Annis vd., 2004, Şekil 9). Bu bölgelerin çoğaltılması her iki patojene özgü farklı primerlerle sağlanmıştır. Bu genlerin gerçek zamanlı PZR yardımı ile çoğaltılmasında kullanılan türlere özgü primerler ve probalar referanslarıyla birlikte Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 9. 5.8S rRNA ve ITS bölgelerinin şematik çizimi (Kebeish ve El-Sayed, 2012)

Gerçek zamanlı PZR işlemi sırasında çalışılan örneklerdeki DNA yoğunluğunu belirlemek amacıyla oluşturulacak standart eğri için Belçika’da bulunan Gent üniversitesinden temin edilen *Bd* ve *Bsal* DNA örnekleri 10’ar kat sulandırılarak kullanılmıştır (Tablo 2). Dublex RT-PZR reaksiyon karışımının içeriği; 10 µl TaqMan Universal master mix II, 0.3 µM her bir primer (STerF ve STerR), 0.1 µM STerC prob, 0.9 µM her bir primer (Chytr F ve Chytr R), 0.15 Mm Chytr MGB2 prob, 5 µl kalıp DNA olacak şekilde son hacim 20 µl ye tamamlanmıştır.

Dublex RT- PZR reaksiyonu ise üreticinin verdiği prosedüre uygun olarak; 50 C’de 2 dk UNG enzim aktivasyonu, 95 ‘de 1 dk. ön denatürasyon, 95°C’de 15 saniye denatürasyon ve 61°C’de 1 dk bağlanma ve uzama şeklindedir. Her bir PZR çalışmasında, pozitif ve negatif kontrol (DNA içermeyen) kullanılmıştır. Her bir örnek için iki tekrar uygulanmıştır.

2.2.6. Habitat Kalitesi Parametrelerinin Analizi

Patojenlerin varlığının ya da yokluğunun çevresel parametrelerle ilişkisini ortaya koyabilmek adına örnekleme yapılan her bir habitatın su kalitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çevresel sıcaklık, su sıcaklığı, pH, çözünmüş oksijen, iletkenlik gibi parametreler Hach marka taşınabilir bir multimetre cihazı ile habitatın bulunduğu yerde; fosfat iyonu, amonyum azotu, nitrat ve nitrit azotu gibi parametrelerin ölçümleri ise test kitleri yardımıyla Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, su kimyası analiz laboratuvarında bulunan spektral fotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Örnek alınan numunenin aynı gün laboratuvara getirilmesinin mümkün olmadığı durumlarda suyun derin dondurucu buzdolabına konulması ve o şekilde analiz yapılacak güne kadar saklanması sağlanmıştır.

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR’de kullanılan primer ve probalar

Gen Bölgesi	Patojen türü	Primer adı ve baz sırası	Prob adı ve baz sırası	Referans	Yaklaşık uzunluk (bp)
5.8S rRNA geni ve ona bitişik ITS bölgesi	<i>Bd</i>	ITS1-3 Chytr 5’CCTTGATATAATACAGTGTGCCAT ATGTC-3’ 5.8S Chytr 5’- TCGGTTCTCTAGGCAACAGTTT- 3’	Chytr MGB2 (5’- CGAGTCGA AC-3’)	Boyle vd., 2004; Longo vd., 2013	146
5.8S rRNA geni ve ona bitişik ITS bölgesi (ITS-1 ve ITS-2)	<i>Bsal</i>	STerF 5’-TGCTCCATCTCCCCCTTCA- 3’ STerR 5’-TGAACGCACATTGCACTCTAC	STerC (5’- ACA AGA AAA TAC TAT TGA TTC TCA AAC AGG CA –3’	Martel vd. 2013; Blooi vd.,2013	160

Tablo 2. Tüplerin DNA yoğunluğu

Dilüsyon Tüpleri	DNA Kopya Yoğunluğu (/ µl)
Tüp 1	2 x 10 ⁵ / µl
Tüp 2	2 x 10 ⁴ / µl
Tüp 3	2 x 10 ³ / µl
Tüp 4	2 x 10 ² / µl
Tüp 5	20 / µl

3. BULGULAR

Rize ve Gümüşhane illerine yapılan arazi çalışmalarında Chytridiomycosis hastalığına sebep olan patojenler *Batrachochytrium dendrobatidis* ve *Batrachochytrium salamandrivorans* fungusunun tespit çalışmaları için her lokaliteden 10'ar bireyden sürüntü örneği alınmıştır. Bu örneklerden uygun metot ile DNA izolasyonu yapılmış ve patojenlere özgü primer ve prob dizileri kullanılarak qPCR çalışmaları yapılmıştır. Tüm örneklerin qPCR işlemleri 3 kez tekrarlanarak yanlış negatif ve hatalı pozitif sonuç verme ihtimalleri en aza indirilmiştir. qPCR cihazının bilgisayara aktarmış olduğu Ct (cycle treshold) değerlerine bakılarak pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda 20 örneğin tümünde hem *Bd* hem de *Bsal* açısından negatif sonuç alınmıştır. Bireylerin yakından çekilmiş fotoğrafları da morfolojik olarak derilerinde herhangi bir lezyonun olmadığını destekler niteliktedir (Şekil 10-13).



Şekil 10. Rize popülasyonunda 1 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Serkan GÜL)



Şekil 11. Rize popülasyonunda 5 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Serkan GÜL)



Şekil 12. Gümüşhane popülasyonunda 1 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Abdullah ALTUNIŞIK)



Şekil 13. Gümüşhane popülasyonunda 2 nolu bireye ait ön ve arkadan çekilmiş görüntüler (Fotoğraf: Abdullah ALTUNIŞIK)

Habitatlardan su kalitesi analizi için alınan su numunelerinde çevresel sıcaklık, su sıcaklığı, pH, çözülmüş oksijen, iletkenlik gibi parametreler Hach marka taşınabilir multimetre cihazı ile habitatın bulunduğu yerde; fosfat iyonu, amonyum azotu, nitrat ve nitrit azotu gibi parametrelerin ölçümleri ise test kitleri yardımıyla Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, su kimyası analiz laboratuvarında bulunan spektral fotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 3’de analiz sonuçları verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre Güvenköy (Rize) lokalitesinden alınan su numunesi; pH ve çözülmüş oksijen açısından 2. kalite su sınıfına girerken diğer tüm parametreler (su

sıcaklığı, nitrat, nitrit, sülfat, amonyum) açısından 1. kalite su sınıfında yer almaktadır. Kocadal (Gümüşhane) lokalitesinden alınan su numunesi ise; pH, çözülmüş oksijen ve amonyum azotu açısından 2. kalite su sınıfına, diğer tüm parametreler (su sıcaklığı, nitrat, nitrit, sülfat) açısından 1. kalite su sınıfına girmektedir.

Tablo 3. Habitatlara göre bazı parametrelerin ölçüm sonuçları

Parametreler	Lokalite	
	Güvenköy (Rize)	Kocadal (Gümüşhane)
Çevre sıcaklığı (°C)	26	17
Su sıcaklığı (°C)	22	15.9
pH	8,75	8,04
Çözülmüş oksijen (mg/L)	7,11	6,53
İletkenlik (µs/cm)	78	96
Nitrat (mg/L)	0,8	2,1
Nitrit (mg/L)	0,006	0,006
Sülfat (mg/L)	50	60
Amonyum (mg/L)	0,093	0,21

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği'nin internet sitesinde (IUCN, 2019) yer alan rapora göre türlerinin %40'ı yok olmanın eşiğinde olan amfibiler tehdede en açık canlı grubu olarak dikkat çekmektedir. Amfibiler hem karada hem de suda yaşadıklarından ve üremeleri için suya bağımlı olduklarından yaşadıkları çevrenin koşullarından doğrudan etkilenirler. Amfibileri tehdit eden çok sayıda faktör (habitat kaybı ve tahribatı, kirlilik ve pestisitler, iklim değişikliği, istilacı türler, bulaşıcı hastalıklar, evcil hayvan veya yiyecek ticareti için aşırı avlama vb.) vardır ve ne yazık ki bunların tümü antropojeniktir (URL-3). İşin kötü tarafı bu tehditlerin çoğu sinerjik (büyütülmüş) bir etki yaratabilmek için birbirleriyle uyumlu hareket ederler. Örneğin, belirli bir pestisit veya patojene maruz kalmak, etkilenen kurbağaları muhtemelen öldürmez. Bununla birlikte, eğer bir böcek ilacı hayvanın yeterli bir bağışıklık tepkisi oluşturma yeteneğini tehlikeye attıktan sonra kurbağa chytrid mantarı tarafından enfekte edildiyse, popülasyon ölümcül bir hastalık salgını yaşayabilir ve yerel tükenmeye gidebilir. Eğer türlerin kalan habitatının önemli bir kısmı daha önce girmiş olan türler tarafından istila edilmiş veya değişmiş yağış rejimleri nedeniyle kullanılamaz hale gelmişse, türler küresel yok oluşa doğru hızlı bir ilerleme kaydetmiş olabilir (Url-3). İklim değişikliğinin canlıların sağlığı üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalardan ortaya çıkan bulgulardan biri de bazı bulaşıcı hastalıkların vektörlerinin ve dağılımının değişmesidir. Bu durum hastalığın daha hızlı yayılabilmesine hastalık yaşanmayan bölgelerin tehdede açık hale gelmesine, göçlerin artmasına ve hastalıkların görülme sıklığının artmasına yol açmaktadır (Yoldaş, 2014).

Bulaşıcı bir amfibi hastalığı olan Chytridiomycosisin varlığı ilk kez Berger vd. (1998) tarafından ortaya çıkarılmış ve buna sebebiyet veren patojen *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) ise bundan bir yıl sonra tanımlanmıştır (Longcore vd., 1999). Keşfedilmesinden bu yana dünya genelinde amfibilerin %40 'ından fazlasını (>200) yok olma noktasına getiren ve bu canlıların biyoçeşitliliğini tehdit eden en önemli unsur olmuştur (Martel vd. 2013). *Bd* kaynaklı enfeksiyonlara şu ana kadar çok sayıda kuyuksuz ve kuyruklu kurbağa türleri ile bir bacaksız kurbağa türünde (*Typhlonectes sp.*) rastlanılmıştır (Whittaker ve Vredenburg, 2011). 2013 yılında hastalığa sebebiyet veren

ikinci patojen *Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*'ın keşfiyle (Martel vd., 2013) bu hastalığın çok daha fazla amfibi türünü etkileyebileceği ortaya konmuştur.

Ülkemizde son kayıtlara göre toplam 37 amfibi türü yaşamaktadır. Bu türlerden beşi tehlikeli (EN); biri ise kritik derecede tehlikeli (CR) kategorisinde yer almaktadır (Amphibiaweb, 2019). Ayrıca türlerin % 73'ünün popülasyonları azalmakta, % 20'sinin durağan, % 3.3'ünün artmakta ve % 3,3'ünün ise durumu bilinmemektedir (IUCN, 2019). Bu çalışma kapsamında analiz edilen *Mertensiella caucasica* (Kafkas semenderi) türü ise Kafkasya bölgesine endemik olup IUCN ölçütlerine göre Kırmızı Liste'de (Red List) "Hassas hayvanlar (Vulnerable, VU)" kategorisinde yer almaktadır.

Dünyada ve buna bağlı olarak Türkiye'de amfibi türlerindeki bu azalmanın en önemli tetikleyicisi olarak Chytridiomycosis hastalığı öne çıkmaktadır. Bu yüzden amfibiler ilgili çalışma yapan bilim insanları son yıllarda Chytridiomycosis hastalığının varlığını araştırmak üzere yoğunlaşmışlardır. Bu çalışmalardan birinde Parrot vd. (2017) Peru, Amerika ve İsviçre'nin dağlık kesimlerinde yaşayan 17 semender türünden oluşan toplam 509 bireyi hem *Bd* hem de *Bsal* açısından test etmişler ve sadece *Bd* açısından pozitif bir sonuca ulaşmışlardır. Bu dağlardan Peru, Amerika ve İsviçre'den elde edilen enfeksiyon yüzdesi sırasıyla % 3,53, % 13,74 ve % 1,51 olarak rapor edilmiştir.

Vietnam semenderleri üzerine yapılan diğer bir çalışmada (Laking vd., 2017) ise araştırmacılar 8 türden elde edilen 583 bireye *Bd* ve *Bsal* patojenlerinin bulaşıp bulaşmadığını araştırmış ve 55 habitatın 14'ünde *Bsal* patojeninin % 2.92 enfeksiyon oranında varlığını tespit etmişlerdir. *Bd* açısından ise daha düşük bir enfeksiyon yüzdesi (% 0.69) tespit eden araştırmacılar *Bsal*'ın yaygınlığının daha yüksek olduğuna işaret etmişlerdir.

Yakın bir zamanda yayınlanan ve Almanya ve İsviçre'deki 11'i kuyruksuz ve 100'ü kuyruklu kurbağa olmak üzere 111 amfibi türünde *Bsal* varlığını araştıran Sabino-Pinto vd. (2018), analiz ettikleri toplam 918 bireyin 23'ünde bu patojenin açısından pozitif sonuç elde edildiğini bildirmişlerdir. *Bsal* veya muhtemelen yeni keşfedilen veya henüz keşfedilmemiş patojenlerin hayvansal ithalat yoluyla getirilmesi ya da yaban hayatından

koparılmış olan ve belli yerde tutulan hayvanların doğal habitatlarına bırakılması yerli amfibi popülasyonlarına yıkıcı etki yapabileceği bu araştırmacılar tarafından bir uyarı olarak bildirilmiştir. Buna ek olarak, *Bsal*'ın Avrupa Birliği ve diğer ülkeler tarafından epizootik bir hastalık olarak ilan edilmesi ve tedavi edilmesi gerektiğini ve *Bsal*'ın Avrupa'ya yayılmasını sınırlamak için karantina ve biyogüvenlik kurallarının uyarlanması ve geliştirilmesi gerektiğini savunmuşlardır.

Türkiye'de Chytridiomycosis varlığını araştırmak üzere yapılan ilk çalışma Göçmen vd. (2013) tarafından Antalya (Akdeniz bölgesi)'da yapılmıştır. Bu bölgede yaşayan *Lyciasalamandra* cinsine ait 12 popülasyondan toplam 330 bireyin *Bd* patojeni açısından test edilmesi sonucunda tüm bireylerin bu patojen açısından negatif olduklarını fakat bu semenderle simpatrik olarak yaşayan *Pelophylax bedriagae* ve *Psedepidalea variabilis* kurbağalarını test ettiklerinde ise bunlardan ilkinin % 50 oranında *Bd+* olduklarını rapor etmişlerdir. Bu çalışma, Chytridiomycosis hastalığının ülkemizde var olduğunu göstermesi açısından dikkate değerdir.

Türkiye'nin önemli tatlı su göllerinden birisi olan Eğirdir Gölü ve çevresinde yapılan diğer bir çalışmada ise Yumuk (2014), *Pelophylax caralitanus* (Beşşehir kurbağası) türüne amfibi patojenlerinden *Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirüs'ün bulaşıp bulaşmadığını araştırmıştır. 2012 ve 2013 yılları arasında toplam 6 lokalitede yapılan bu çalışmanın ilk yılında *B. dendrobatidis* açısından % 17,02 ve Ranavirüs açısından % 0 oranında pozitif sonuç elde edilirken, 2013 yılı çalışmalarında ise % 45,00 oranında *B. dendrobatidis* ve % 5,00 oranında Ranavirüs pozitif sonuçlarını rapor etmişlerdir.

Beşşehir kurbağasının hastalığı üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise Yoldaş (2014), Denizli iline bağlı Çivril ilçesindeki Işıklı Göl'deki 4 farklı lokaliteden toplanan 67 endemik (*Pelophylax caralitanus*) üzerinde *Batrachochytrium dendrobatidis* patojen fungusunun varlığını araştırmış ve bu bireylerden 21'inde pozitif sonuç elde edildiğini bildirmiştir. Ayrıca bu bireylerin 49'u Ranavirus patojeni açısından test edilmiş ve bunlardan 9'unun pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir.

Daha sonraları Erişmiş vd. (2014), 2 farklı lokasyondan (26 Ağustos Ulusal Parkı, Afyonkarahisar ve Göller Bölgesi, Afyonkarahisar-Isparta) aldıkları 7 amfibi türüne (*Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Bufo variabilis*, *Pelophylax caralitanus*, *Pelobates syriacus*, *Triturus karelinii*) ait toplam 228 bireyi *Bd* açısından test etmişler ve bu türlerin beşinde (*Pelophylax ridibundus*, *Hyla orientalis*, *Bufo variabilis* ve *Pelophylax caralitanus*) *Bd*'den kaynaklanan mantar hastalığını rapor etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada ise *Mertensiella caucasica*'nın yaşadığı 2 farklı lokasyondan elde edilen toplam 20 bireye ait sürüntü örneğinin hiçbirisinde Chytridiomycosis hastalığına sebebiyet veren patojenler olan *Bd* ve *Bsal* saptanmamıştır. Her bireyin çekilen detaylı fotoğrafları da incelenmiş olup hastalığın deride oluşturduğu kızarıklık ve deri kaybına dair bir bulguya rastlanılamamıştır. Yumuk (2014), yaptığı çalışmada *Bd* pozitif olarak saptadığı örneklerin bir kısmında deride lekelenmeler, deri kayıpları ve kızarıklıklar saptamışken, diğer kısmında ise hiçbir fizyolojik bulguya rastlanmadığını bildirmiştir. Bu durumdan yola çıkarak hastalığın belirli bir fizyolojik bulgusu olmadığını ve patojenin belirlenmesinde yöntem olarak gerçek zamanlı PCR (Boyle vd., 2004)'ın tercih edilmesini önermişlerdir. Yoldaş (2014) da benzer olarak morfolojik olarak hastalığın tespitinin sağlıklı sonuçlar vermeyeceğini rapor etmiştir.

Bu çalışmada semenderlerin yaşadığı sucul habitatın bazı kimyasal parametreleri de kaydedilmiş fakat lokalitelerin hiçbirinde Chytridiomycosis enfeksiyonu tespit edilmediğinden bu parametrelerin hastalıkla ilişkilendirilmesi de mümkün olmamıştır. Kafkas semenderinin yaşadığı 2 farklı popülasyonda hastalığın varlığına dair bir ize rastlanılmamış olması bu türün habitat seçiciliğinin yüksek olmasıyla bir ilgisi olabileceğini düşündürmektedir. Su kalite sınıflandırmasına göre birinci kalite yani içilebilir su kalitesinde olan habitatlarda yaşayan bu tür genellikle yüksek rakımlı yerlerde potansiyel olarak daha fazla bulunma eğilimindedir. İnsan ve diğer canlıların nüfus yoğunlukları düşük rakımlarda potansiyel olarak daha fazladır. Çünkü yüksek rakımlarda iklim genellikle daha soğuktur. Bu yüzden insan etkisinin nispeten daha az olduğu yüksek rakımlı habitatlarda yaşayan Kafkas semenderlerinin Chytridiomycosis hastalığına yakalanmamış olabileceğini değerlendiriyoruz.

Bu tez çalışmasında:

- 1- Kafkas semenderinin yaşadığı iki farklı habitatta tüm örneklerin hem *Bd* hemde *Bsal* patojenleri açısından negatif oldukları,
- 2- Semenderlerin yakından çekilmiş fotoğraflarında görünür herhangi bir lezyon bulunmadığı,
- 3- Habitat kalitesi açısından her iki popülasyondaki parametrelerin çoğunlukla birinci kalite su sınıfında yer aldığı sonuçlarına varılmıştır.



5. ÖNERİLER

Biyolojik çeşitlilik üzerindeki olumsuz etkisi bakımından Chytridiomycosis tüm dünyada en kötü hayvansal hastalıklardan bir tanesi olarak şimdiden kayıtlara geçmiştir. Ülkemizde Chytridiomycosis vakaları ile ilgili çalışmaların sınırlı olması ve Karadeniz bölgesinde yaşayan *Mertensiella caucasiaca* türüne bahsedilen mantar hastalığının bulaşıp bulaşmadığı bilinmediğinden bu çalışmanın yapılması planlanmıştır. Her ne kadar sonuçlar bu hastalığın çalıştığımız bölgelerde Kafkas semenderine bulaşmamış olduğunu gösterse de türün dağılış alanını temsil edecek şekilde daha fazla sayıda örnekleme yapılarak bir taramanın yapılması bölgedeki ve ülkemizdeki durumun açıklığa kavuşturulması adına önem taşımaktadır. Bu açıdan özellikle antropojenik etkinin daha fazla olduğu ekolojik olarak farklılık gösteren Kafkas semenderi popülasyonlarında Chytridiomycosis varlığının araştırılması önerilebilecek çalışmalardandır.

KAYNAKLAR

- Amphiaweb, 2019.** Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>. (Accessed: 19 February 2019).
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. and Longcore, J.E., 2004.** A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 40, 420–428.
- Atatür, M.K. and Budak, A., 1982.** The present status of *Mertensiella caucasica* in Northeastern Anatolia. *Amphibia-Reptilia* 4, 295-301.
- Baillie, J., Hilton-Taylor, C. and Stuart, S.N., 2004.** World Conservation Union. Species Survival Commission and International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Red List Programme A Global species assessment : 2004 IUCN red list of threatened species. IUCN--The World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Bales, E.K., Hyman, O.J., Loudon, A.H., Harris, R.N., Lipps, G., Chapman, E, Robble, K., Kleopfer J.D and Terrell, K.A., 2015.** Pathogenic Chytrid Fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, Detected on Eastern Hellbenders, *Plos One*, 10 (2), 1-9.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., and Parkes, H., 1998.** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9031-9036.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Olsen, V., Hengstberger, S.G., Boyle, D., Marantelli, G., Humphreys, K. and Longcore, J.E., 2002.** Production of polyclonal antibodies to *B. dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians, *Diseases of Aquatic Organisms*, 48, 213-220.
- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J.E., Spitzen-van der Sluijs, A., Vercammen, F. and Martel, A., 2013.** Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 4173–4177.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. and García-París, M., 2001.** Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97, 331–337.

- Brodman, R. and Briggler, T.J., 2008.** *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Ambystoma jeffersonianum* larvae in southern Indiana. *Herpetological Review*, 39, 320–321.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. and Hyatt, A.D., 2004.** Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay, *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 141-148.
- Canestrelli, D., Zampiglia, M. and Nascetti, G., 2013.** Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in contemporary and historical samples of the endangered *Bombina pachypus* along the Italian peninsula, *Plos One*, e63349.
- Collins, J.P., 2010.** Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn, *Diseases of Aquatic Organisms* 92, 93-99.
- Collins, J.P. and Crump, M.L., 2009.** Extinction in our times: global amphibian decline. New York: Oxford University Press.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E. and Speare, R., 1999.** Emerging infectious diseases and amphibian population declines, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 735-748.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. and Hyatt, A.D., 2000.** Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443–449.
- Demirsoy, A., 1997.** Yaşamın Temel Kuralları (Omurgalılar/Anamniyota). Cilt III Kısım I, III. Baskı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 684.
- Demirsoy, A., 1998.** Yaşamın Temel Kuralları, Amfibiler, Meteksan A.Ş., Ankara.
- Erismiş, U.C., Konuk, M., Yoldas, T., Agyar, P., Yumuk, D. and Korcan, S.E., 2014.** Survey of Turkey's endemic amphibians for chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 111, 153-157.
- Fisher, M.P., Garner, T.W.J. and Walker, S.F., 2009.** Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host, *Annual Review of Microbiology*, 63, 291-310.
- Franzen, M., 1999.** *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876) - Kaukasus-Salamander. In: Grossenbacher, K. & B. Thiesmeier (eds.): *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. Band 4/1. Schwanzlurche (Urodela) 1, 329-366.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. and Hyatt, A.D., 2009.** Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18, 4757-4774.
- Göçmen, B., Veith, M., Iğci, N., Akman, B., Godmann, O. and 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, 51-55.

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. and Colling, A., 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*, Diseases of Aquatic Organisms, 73,175-192.

IUCN, 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. <http://www.iucnredlist.org>. Son erişim tarihi 7 Mart 2019.

Johnson, M.L., Berger, L., Philips, L. and Speare, R., 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms, 57, 255-260.

Kaya U., Tuniyev, B., Ananjeva, N., Orlov, N., Papenfuss, T., Kuzmin, S., Tarkhnishvili, D., Tuniyev, S., Sparreboom, M., Ugurtas, I. and Anderson, S., 2009. *Mertensiella caucasica*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2009 e.T13198A3418986. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T13198A3418986.en>. Downloaded on 17 February 2019.

Kebeish, R. M. and Ashraf, S.E.S., 2012. Morphological and molecular characterization of L-methioninase producing *Aspergillus* species. African Journal of Biotechnology, 11, 15280-15290.

Kruger, K.M., Hero, J.M. and Ashton, K. J., 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. Diseases of Aquatic Organisms, 71, 149–154.

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

Kuru, M., 1999. Omurgalı Hayvanlar, Palme Yayıncılık, Ankara.

Laking, A.E., Ngo, H.N., Pasmans, F., Martel, A. and Nguyen, T.T., 2017. *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. Scientific reports, 7, 44443.

Lauder, G.V. and Reilly S.M., 1994. Amphibian feeding behavior: comparative biomechanics and evolution. Advances comparative and environmental physiology, 18, 163-195.

Livo, L.J., 2004. Methods for obtaining *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) samples for PCR testing. <http://wildlife.state.co.us/NR/rdonlyres/710BBC95-2DCF-4CF9-8443-D4561DBC3B69/0/PCRsampling2004.pdf>. Son erişim tarihi: 10 Ocak 2016.

- Longcore, J.E., Pessier, A.P. and Nichols, D.K., 1999.** *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians, *Mycologia*, 91, 219-227.
- Longo, A.V., Rodriguez, D., da Silva Leite, D., Toledo, L.F., Almeralla, C.M., Burrowes, P.A. and Zamudio, K.R., 2013.** ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR estimates of infection intensity from field-collected amphibian skin swabs. *PLoS One*, 8, e59499.
- Marantelli, G., Berger, L., Speare, R. and Keegan, L., 2004.** Changes in distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development leading to high mortality after metamorphosis. *Pacific Conservation Biology*, 10, 173–179.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. and Pasmans, F., 2013.** *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 15325-15329.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E. and Speranza, G., 2003.** Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade, *Emerging Infectious Diseases*, 9, 995-998.
- Mutschmann, F., Berger, L., Zwart, P. and Gaedicke, C., 2000.** Chytridiomycosis in amphibians-first report in Europe, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 113, 380-383.
- Özeti, N. ve Yılmaz, İ., 1994.** Türkiye Amfibileri, Ege Üniversitesi Basımevi, yayın no: 151, 2. Baskı, ISBN: 975-483-236-6 221 s., 13.
- Parker, J.M., Mikaelian, I., Hahn, N. and Diggs, H.E., 2002.** Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*), *Comparative Medicine*, 52, 265-268.
- Parrott, J. C., Shepack, A., Burkart, D., LaBumbard, B., Scimè, P., Baruch, E. and Catenazzi, A., 2017.** Survey of pathogenic chytrid fungi (*Batrachochytrium dendrobatidis* and *B. salamandrivorans*) in salamanders from three mountain ranges in Europe and the Americas. *EcoHealth*, 14, 296-302.
- Pessier, A.P., Nichols, D.K., Longcore, J.E. and Fuller, M.S., 1999.** Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*), *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 194-199.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., J. Morgan, A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker J.M. and Briggs, C.J., 2006.** Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, 87, 1671–1683.

- Sabino-Pinto, J., Veith, M., Vences, M. and Steinfartz, S., 2018.** Asymptomatic infection of the fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in captivity. *Scientific reports*, 8, 11767.
- Satoh, N., Rokhsar, D. and Nishikawa, T., 2014.** Chordate evolution and the three-phylum system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20141729.
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., ... and De la Riva, I., 2019.** Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363, 1459-1463.
- Schultschik, G., 1994a.** Zur Fortpflanzungsbiologie von *Mertensiella caucasica* (Waga, 1876) (Urodela: Salamandridae). *Abh. Ber. Naturk. Magdeburg*, 17, 163-175.
- Schultschik, G., 1994b.** *Mertensiella caucasica*: Haltung, Nachzucht und Freilandbeobachtungen. *Salamandra*, 30, 161-173.
- Seimon, T. A., Seimon, A., Daszak, P., Halloy, S. R. P., Schloegel, L. M., Aguilar, C. A., Sowell, P., Hyatt, A. D., Konecky, B. and Simmons, J.E., 2006.** Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation, *Global Change Biology*, 12, 1-12.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K. R., Phillott, A.D., Hines, H.B. and Kenyon, N., 2007.** Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs, *EcoHealth*, 4, 125-134.
- Stuart, S., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A.S.L., Fishman, D. L. and Waller, R.W., 2004.** Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306, 1783-1786
- Spitzen-vanderSluijs, A., Spikmans, F., Bosman, W., DeZeeuw, M., Vander Meij, T., Goverse, E., Kik, M., Pasmans, F. and Martel, A., 2013.** Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands, *Amphibia-Reptilia*, 34, 233-239.
- Tarkhnishvili, D.N. and Gokhelashvili, R.K., 1994.** Preliminary data of the age structure of a *Mertensiella caucasica* population. *Mertensiella*, 4, 327-334.
- Tarkhnishvili, D.N. and Gokhelashvili, R.K., 1999.** The amphibians of the Caucasus. *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*, 1-229.
- Tarkhnishvili, D., and Kaya, U., 2009.** Status and conservation of the Caucasian salamander (*Mertensiella caucasica*). *Status and Protection of Globally Threatened Species in the Caucasus*. Tbilisi: CEPF, WWF. Contour Ltd, 157-164.

URL-1. <http://www.bd-maps.net> (10 May 18 2019).

URL-2. <http://www.salamanderfungus.org/resources/maps/> (28 Mayıs 2019)

URL-3. <http://www.savethefrogs.com/d/threats/index.html> (8 Nisan 2019)

Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R. and Skerratt, L.F., 2007. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis, *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 113-118.

Whittaker, K. and Vredenburg, V., 2011. An overview of chytridiomycosis. *Amphibiaweb*, May, 17.

Yoldaş, T., 2014. Işıklı Gölde, Real – Time Pcr Tekniği İle İki Amfibi Patojeni (*Batrachochytrium Dendrobatidis* ve Ranavirus (*Iridoviridae*))’Nin Yaygınlığının İlk Kez Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, Türkiye, 67s., 1-3.

Yumuk, D., 2014. Real-Time PCR kullanılarak Eğirdir Gölü ve Çevresinde İki Amfibi Patojeninin (*Batrachochytrium dendrobatidis* ve Ranavirus) Yaygınlığının İlk Kez Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, Türkiye, 56s., 27-29.

ÖZGEÇMİŞ

Sümeyye ALTUNIŞIK, 01/01/1991 tarihinde Samsun'un Ayvacık ilçesinde dünyaya geldi. İlköğrenimi 2004 yılında Çarşamba Merkez İlköğretim okulunda, ortaöğretimini ise 2007 yılında Çarşamba Lisesi'nde tamamladı. 2016 yılının Ocak ayında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2016 yılı Ağustos ayında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimine halen devam ettirmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.

