

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**TATLISU KEREVİTİNDEKİ (*Astacus leptodactylus*) SİYAH SOLUNGAÇ
HASTALIĞI ETKENİ MANTAR *Fusarium oxysporum*'un PCR YÖNTEMİ İLE
TEŞHİSİ**

Yiğit TAŞTAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**TATLISU KEREVİTİNDEKİ (*Astacus leptodactylus*) SİYAH SOLUNGAÇ
HASTALIĞI ETKENİ MANTAR *Fusarium oxysporum*'un PCR YÖNTEMİ İLE
TEŞHİSİ**

Yiğit TAŞTAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TATLISU KEREVİTİNDEKİ (*Astacus leptodactylus*) SİYAH SOLUNGAÇ
HASTALIĞI ETKENİ MANTAR *Fusarium oxysporum*'un PCR YÖNTEMİ
İLE TEŞHİSİ**

Yiğit TAŞTAN

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

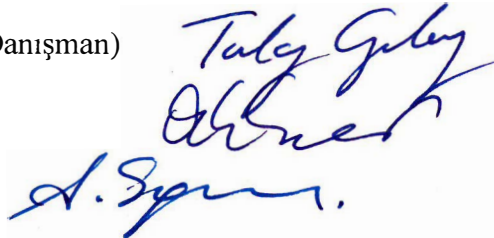
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 13/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir

Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY (Danışman)

Prof. Dr. Süleyman AKHAN

Prof. Dr. Aysun ERGENE



ÖZET

TATLISU KEREVİTİNDEKİ (*Astacus leptodactylus*) SİYAH SOLUNGAÇ HASTALIĞI ETKENİ MANTAR *Fusarium oxysporum*'un PCR YÖNTEMİ İLE TEŞHİSİ

Yiğit TAŞTAN

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

Haziran 2018; 50 Sayfa

Bu çalışmada Türkiye'deki nehir, göl, gölet gibi su kaynaklarında doğal olarak dağılım gösteren kerevit (*Astacus leptodactylus*) popülasyonlarında siyah solungaç hastalığı araştırılmıştır.

Siyah solungaç hastalığı etkeni mantar *Fusarium oxysporum*'un teşhisi için 6 farklı istasyondan kerevit örnekleri toplanmıştır. Laboratuvara getirilen kerevit örneklerinin klinik muayeneleri gerçekleştirilmiş, siyah solungaç hastalığı belirtileri gösteren bireylerden doku örnekleri alınarak PDA besi yerine ekimi yapılmıştır. Petri kaplarında üreyen mantarlardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonu yapılan DNA'lerden *Fusarium oxysporum*'un tür tayininde kullanılan primerler yardımıyla istenilen gen bölgesi PCR uygulaması ile çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında Beyşehir Gölü, Gölhisar Gölü, Karaidemir Baraj Gölü, Karataş Gölü, Manyas Gölü, Taşkısığı Gölü kerevit popülasyonlarında siyah solungaç hastalığı tespit edilmiş, *Fusarium oxysporum* tür bazında tanımlanmış ve gen dizileri gen bankasına girilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Astacus leptodactylus*, *Fusarium oxysporum*, PCR, Siyah Solungaç Hastalığı

JÜRİ: Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

Prof. Dr. Süleyman AKHAN

Prof. Dr. Aysun ERGENE

ABSTRACT

PCR IDENTIFICATION OF BLACK GILL DISEASE CAUSATIVE FUNGUS *Fusarium oxysporum* ISOLATED FROM CRAYFISH (*Astacus leptodactylus*)

Yiğit TAŞTAN

MSc. Thesis in Department of Fisheries

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

June 2018; 50 Pages

In this study, black gill disease in widely distributed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations in Turkey's ponds, rivers and lakes was researched.

Crayfish samples were collected from 6 different locations for identification of fungus *Fusarium oxysporum* associated with black gill disease. Samples were brought to laboratory and examined, tissue samples were taken and cultured on PDA medium from crayfish that showed black gill disease symptoms. DNAs were extracted from the isolates of fungi grew on petri dishes. Target gene part was amplified by PCR with primers used for identification of *Fusarium oxysporum* and then amplicons were sequenced.

As a result black gill disease was detected in crayfish populations of Beyşehir lake, Gölhisar lake, Karaidemir dam lake, Karataş lake, Manyas lake and Taşkısığı lake, and *Fusarium oxysporum* was identified.

KEYWORDS: *Astacus leptodactylus*, Black Gill Disease, *Fusarium oxysporum*, PCR

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

Prof. Dr. Süleyman AKHAN

Prof. Dr. Aysun ERGENE

ÖNSÖZ

Fusarium türleri morfolojik teşhisi zor, çoğu zaman ayırt edebilmek için uzun süren çalışmalar gerektiren bir takson grubudur. Bu sebeple birçok araştırmacı kerevitlerde Fusarium cinsini çalışmış olmasına rağmen bugüne kadar tür bazında moleküler teşhisi yapılmamıştır.

Son yıllarda hastalık teşhisi alanında -özellikle mikrobiyal organizmalarda-konvensiyonel yöntemlere nazaran hızlı ve etkili sonuç veren moleküler bir yöntem olan PCR daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Bu tez çalışmasında morfolojik olarak ayırımı zor olan *Fusarium oxysporum* türünü tespit edebilmek amacıyla PCR yöntemi kullanılmıştır. Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımın tamamında yanımda olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY'a göstermiş olduğu ilgi ve özenden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince imkanlarından faydalandığım Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Başkanlığı'na, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman AKHAN'a, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamasında yardımlarını gördüğüm Su Ürünleri Mühendisi Tuba ÇATLI, Su Ürünleri Mühendisi Büşra ARLI'ya ve eğitim öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Kerevit Üretimi.....	3
2.2. Kerevitin Biyolojisi.....	3
2.2.1. Kerevitin sistematığı.....	3
2.2.2. Kerevitin morfolojisi.....	4
2.3. Kerevitlerde Görülen Bazı Önemli Hastalıklar.....	5
2.3.1. Kerevit vebası.....	5
2.3.2. Beyaz benek sendromu virüsü.....	6
2.4. Siyah Solungaç Hastalığı (<i>Fusarium oxysporum</i>).....	7
2.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	7
2.4.1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un sistematığı.....	7
2.4.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un morfolojisi.....	8
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan ekipmanlar.....	10
3.1.2. Kerevit materyali.....	10
3.1.3. Mantar materyali.....	12
3.2. Metot.....	12
3.2.1. Kerevit örneklerinin toplanması ve laboratuvara getirilmesi.....	12
3.2.2. Mantar üretiminde kullanılacak olan besi yerinin hazırlanması.....	13
3.2.3. Mantarın üretilmesi.....	14
3.2.4. Mantarın morfolojik teşhisi.....	16
3.2.5. Mantarın saklanması.....	16
3.2.6. DNA izolasyonu.....	17

3.2.7. PCR optimizasyonu	17
3.2.8. Jel elektroforezi.....	19
3.2.9. DNA dizi analizi	19
3.2.10 DNA dizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve tür tayini.....	19
4. BULGULAR	20
4.1. Klinik Muayene Bulguları	20
4.2. Mantar Bulguları	21
4.3. DNA Bulguları	24
4.4. PCR Bulguları	25
4.5. Dizi Analizi Bulguları	25
4.6. Blast Bulguları.....	27
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR	31
7. KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Tatlısu Kerevitindeki (*Astacus leptodactylus*) Siyah Solungaç Hastalığı Etkeni Mantar *Fusarium oxysporum*'un PCR Yöntemi ile Teşhisi” adlı bu çalışmanın akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Yiğit TAŞTAN

13/06/2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

- ~ : Yaklaşık değer
- μm : Mikrometre
- μl : Mikrolitre
- $\text{u}/\mu\text{l}$: Birim bölü mikrolitre
- $\mu\text{g}/\text{ml}$: Mikrogram bölü mililitre
- ml : Mililitre
- mm : Milimetre
- mM : Milimolar
- $^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
- mg : Miligram
- g : Gram
- mg/l : Miligram bölü litre
- s : Saniye
- dk : Dakika
- pH : Hidrojen potansiyeli
- A : Adenin
- G : Guanin
- C : Sitozin
- T : Timin
- pmol : Pikomol
- dH_2O : Saf su
- MgCl_2 : Magnezyum klorür
- CaCO_3 : Kalsiyum karbonat

Kısaltmalar

bç : Baz çifti

rpm : Döngü sayısı

DNA : Deoksiribonükleik asit

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PDA : Potato dextrose agar

FAO : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

RAPD : Rastgele amplifiye olmuş polimorfik DNA

RFLP : Restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmi

AFLP : Amplifiye olmuş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi

UVTK : Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi

Taq : *Thermus aquaticus*

dNTP : Deoksiribonükleotid trifosfat

EPA : Eikosapentaeonik asit

DHA : Dekosaheksaenoik asit

nrDNA: Nükleer ribozomal DNA

PBS : Phosphate buffered saline solüsyonu

Bu tezde ondalık yazım olarak “,” noktalama işareti kullanılmıştır.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kerevitin morfolojik yapısı, üstten görünüm (Koning 1994).....	4
Şekil 2.2. Kerevitin morfolojik yapısı, alttan görünüm (Koning 1994).....	5
Şekil 2.3. <i>F.oxysporum</i> 'un petri kabındaki görüntüleri (Çolak ve Biçici 2013).....	8
Şekil 3.1. Örnekleme yapılan istasyonların harita üzerindeki görünümü.....	11
Şekil 3.2. Kerevit örneklerinin avlanması	12
Şekil 3.3. Avlanan kerevit örnekleri	13
Şekil 3.4. Strafor kutularda laboratuvara getirilen kerevit örnekleri	13
Şekil 3.5. Kerevit örneklerinin muayenesi.....	14
Şekil 3.6. Diseksiyon işlemi	15
Şekil 3.7. Alınan doku örneğinin besi yerine ekimi	15
Şekil 3.8. Mantarların inkübasyonu	16
Şekil 3.9. Gliserol-pepton sıvı besi yerinde saklanan <i>Fusarium oxysporum</i> mantarı.....	17
Şekil 4.1. Kerevitin sefalotoraks bölgesinde <i>F.oxysporum</i> kaynaklı lezyon	20
Şekil 4.2. Kerevitin abdomen bölgesinde <i>F.oxysporum</i> kaynaklı lezyonlar.....	20
Şekil 4.3. Kerevitin solungaç dokusunda <i>F.oxysporum</i> kaynaklı kararma (nekroz)	21
Şekil 4.4. <i>F.oxysporum</i> 'un PDA besi yerindeki üreme görüntüsü (1).....	21
Şekil 4.5. <i>F.oxysporum</i> 'un PDA besi yerindeki üreme görüntüsü (2).....	22
Şekil 4.6. <i>F.oxysporum</i> 'un hifası ve konidyoforlar	22
Şekil 4.7. <i>F.oxysporum</i> 'un sporları (mikrokonidiler ve makrokonidi).....	23
Şekil 4.8. Konidyofordan üretilmek üzere olan mikrokonidi	23
Şekil 4.9. Sporların (mikrokonidiler) kümelenmiş vaziyetteki görüntüsü.....	24
Şekil 4.10. DNA izolasyon bulguları; 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karaidemir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü	24
Şekil 4.11. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü; İzolatların elde edildiği istasyonlar: 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karaidemir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü	25

Şekil 4.12. Dizi analizleri; 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karaidemir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yıllara göre Dünya su ürünleri üretimi (FAO 2017).	1
Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye su ürünleri üretimi (TÜİK 2017).	1
Çizelge 1.3. Yıllık ortalama tatlısu ürünleri üretim miktarları (TÜİK 2017).	1
Çizelge 2.1. Kerevitin (<i>Astacus leptodactylus</i> , Eschscholtz 1823) sistematığı	3
Çizelge 2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> (Schlechtendal, 1824)'un sistematığı	8
Çizelge 3.1. Örnekleme yapılan istasyon bilgileri	10
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri (Mishra vd. 2003)	17
Çizelge 3.3. PCR için hazırlanan karışımın içeriği	18
Çizelge 3.4. PCR protokolü	18
Çizelge 4.1. Blast bulguları.....	27

1. GİRİŞ

Su ürünleri, gerek yüksek protein oranına sahip bir besin kaynağı olması gerekse içerdiği bol miktarda vitamin, mineral ve çoklu doymamış yağ asitleri sebebiyle insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Su ürünleri sektörü 1984'ten bu yana yıllık ortalama %11'den fazla büyüme göstererek en hızlı büyüyen ve gelişen gıda sektörü ünvanını almıştır (Çavdar 2009).

Dünya genelinde avcılık ve yetiştiricilikten elde edilen toplam su ürünleri üretimi 2015 yılında 169,2 milyon ton olarak kayıtlara geçmiştir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Yıllara göre Dünya su ürünleri üretimi (FAO 2017).

Yıllar	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Üretim Miktarı (Milyon ton)	146,8	153,9	155,8	160,7	164,8	169,2

Türkiye'de ise toplam su ürünleri üretimi 2015 yılında bir önceki yıla oranla %25,1 artış göstererek 672,2 bin tona ulaşmıştır (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye su ürünleri üretimi (TÜİK 2017).

Yıllar	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Üretim Miktarı (Bin Ton)	653	703,5	644,8	607,5	537,3	672,2

Ülkemizde kerevit üretimi ise yalnızca avcılık yoluyla yapılmakta ve tamamına yakını ihraç edilmektedir (Harlıoğlu 2004; Erol vd. 2010). İlk defa Uluabat ve Manyas göllerinde, 1960'lı yıllarda avlanarak ihraç edilen kerevit, artan talep doğrultusunda başta Eğirdir, Işıklı, Beyşehir, Akşehir, Eber ve Hotamış gölleri olmak üzere bütün kerevit stoklarımızın olduğu bölgelerden avlanmıştır (Özgen 2015). 2009-2015 yılları arasında yıllık ortalama 644 ton kerevit yakalanmıştır. Bu miktar yıllık ortalama 36 bin 863 ton olan tatlısu ürünlerinin %1,7'lik kısmını oluşturmaktadır. 1985'ten sonra büyük bir salgın haline gelen kerevit vebası hastalığından önce, 1979-1985 yılları arasında ise kerevit üretimi, avlanan toplam tatlısu ürünlerinin %18'ini oluşturmakta ve büyük bir ekonomik girdi sağlamaktaydı (Çizelge 1.3.).

Çizelge 1.3. Yıllık ortalama tatlısu ürünleri üretim miktarları (TÜİK 2017).

Avlanan miktar (ton)	1979-1985	2009-2015
Toplam içsu ürünleri	35791	36863
Kerevit	6500	644

Bu bağlamda kerevit stoklarının yenilenmesi ve üretimin tekrar arttırılması için kerevit hastalıklarının araştırılması ve önlenmesi ekonomik açıdan büyük önem arz etmektedir.

Mikrobiyolojik hastalıkların teşhisi konvensiyonel yöntemlerle yapılmasına karşın etkili ve hızlı yöntem olmadığından modern ve yeni moleküler genetik metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde fungal sistematikte yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerden bazıları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA (RAPD), Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) olarak listelenebilir. Bu yöntemler türe ait genomik DNA'yı çoğaltarak aranılan hedef genin gen dizisinin belirlenmesine dayanmaktadır. DNA ile yapılan araştırmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlamaktadır (Taylor vd. 2000).

PCR yöntemi ile birkaç hücreden bile çok fazla sayıda spesifik DNA parçası kopyalanabilmektedir. Bu sebeple PCR, moleküler biyoloji alanında kullanılmaya başlandığından beri çok önemli etki yaratmıştır (Erlich 1989).

Bu amaçla araştırma kapsamında farklı istasyonlardan hasta kerevit örnekleri toplanmış ve siyah solungaç hastalığı belirtileri gösteren bireylerden mantar izole edilmiştir. İzole edilen mantarlar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak teşhis edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kerevit Üretimi

Astacus leptodactylus 10 ülke (Türkiye, Ukrayna, Güneybatı Rusya, İran, Kazakistan, Belarus, Slovakya, Bulgaristan, Romanya ve Macaristan) sularında doğal olarak yayılım göstermektedir. Günümüzde 27 ülkede mevcuttur. Ayrıca 14 ülkeye (Çek Cumhuriyeti, Polonya, Almanya, Finlandiya, Danimarka, Hollanda, İngiltere, Litvanya, Letonya, Fransa, İsviçre, Avusturya, İspanya ve İtalya) aşılanmıştır (Kawai vd. 2015). Anadolu'nun birçok göl, baraj gölü ve akarsularında doğal olarak bulunan bu tür, 1968 yılından 1990'lı yıllara kadar iyi bir gelir kaynağı olmuştur (Alpbaz 2005).

Astacus leptodactylus türü ekonomik önemi nedeniyle yeni populasyonların oluşturulması ve kerevit ve basından etkilenen stokların yenilenmesi için Türkiye'de de birçok tatlısu kaynağına bırakılmıştır. Bu aşılama sonucunda Türkiye'de kerevit avcılığı yapılan 33 tatlısu kaynağı ortaya çıkmıştır (Harlıoğlu 2004).

2.2. Kerevitin Biyolojisi

2.2.1. Kerevitin sistematigi

Araştırmada materyal olarak kullanılan kerevitin sistematik bilgisi Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

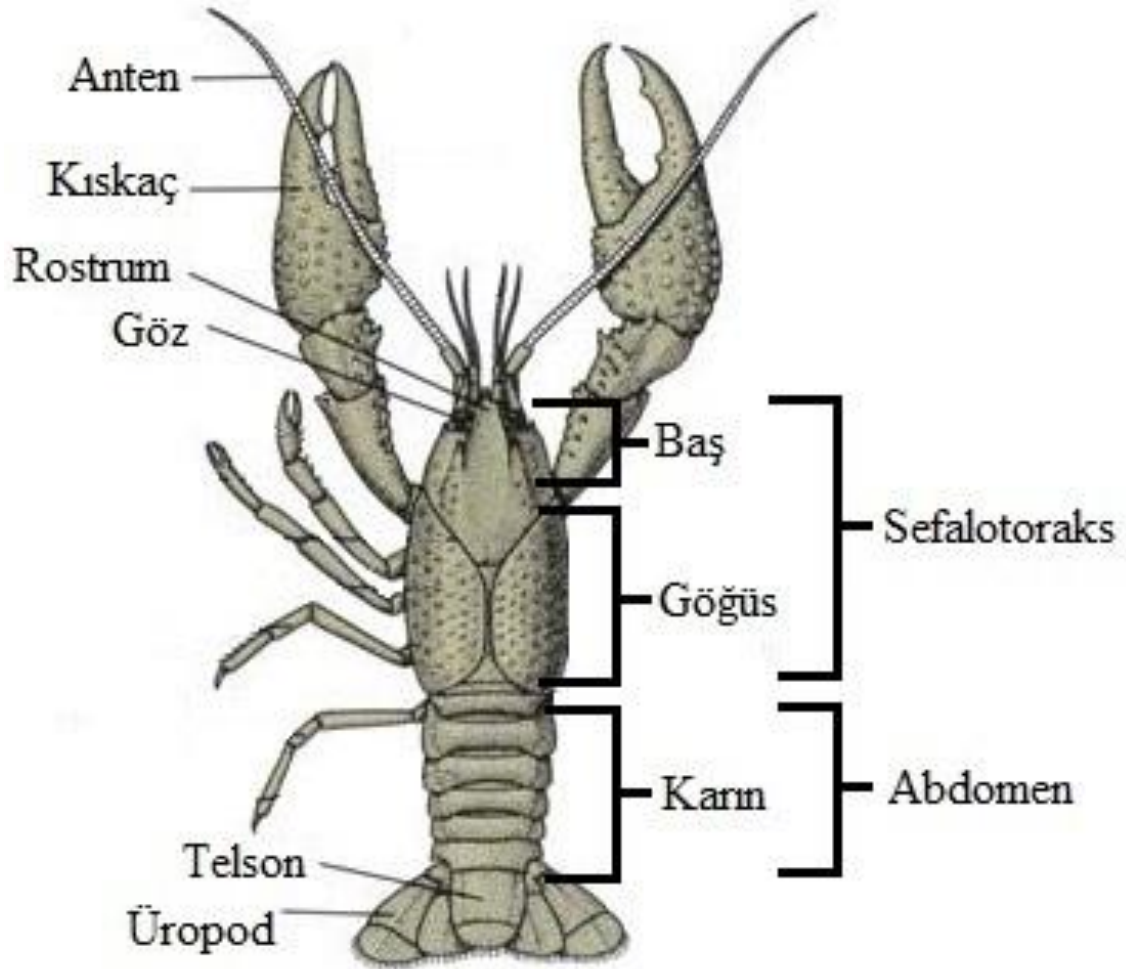
Çizelge 2.1. Kerevitin (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz 1823) sistematigi

Alem:	Animalia
Şube:	Arthropoda
Alt şube:	Crustacea
Sınıf:	Malacostraca
Takım:	Decapoda
Alt takım:	Pleocyemata
İnfra takım:	Astacidea
Üst familya:	Astacoidea
Familya:	Astacidae
Cins:	<i>Astacus</i>
Tür:	<i>Astacus leptodactylus</i>

2.2.2. Kerevitin morfolojisi

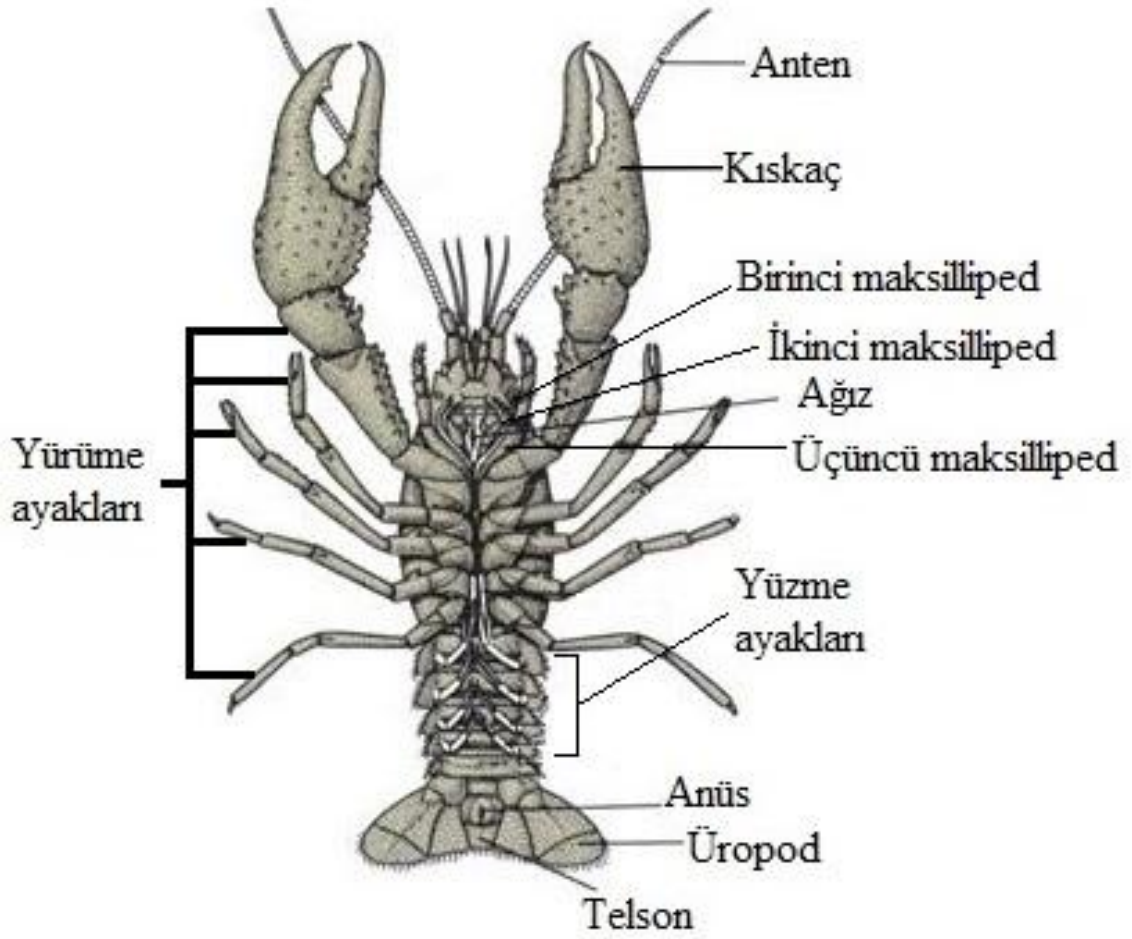
Baş bölgesinde gözler hariç 5 çift ekstremitte vardır. Bunlardan bir çifti kısa antenler, bir çifti de uzun antenlerdir. Diğer 3 çift ekstremitte ise, ağız parçalarıdır. Bir çifti mandibül, bir çifti birinci çeneler, bir çifti de ikinci çeneler olarak adlandırılırlar (Avsever 2008).

Göğüs (Toraks) bölgesi sekiz segmentten oluşmaktadır. İlk üç segmentte çene ayaklarıyla bilinen maksillipedler bulunur. Sonraki 5 segment üzerinde ise yürüme bacakları (pereipodlar) bulunur. Birinci çifti oluşturan bacaklar daha kuvvetli gelişerek pens olarak adlandırılan chelipedleri (kıskaçları) oluşturmuşlardır. İkinci ve üçüncü çiftlerin uçlarında da zayıf gelişmiş küçük pensler bulunmaktadır (Avsever 2008).



Şekil 2.1. Kerevitin morfolojik yapısı, üstten görünüm (Koning 1994)

Abdomen veya karn bölgesi olarak adlandırılan vücudun posterior kısmı çok belirgin bir şekilde segmentlidir. Bu bölge, birbirleri üzerinde hareket eden 6 segmentten oluşmaktadır. Son kısmında telson (kuyruk bölgesi) bulunur ve telsonun ventralinde anüs yer almaktadır. Bununla beraber abdomen bölgesine bağlı olarak yüzme ayakları ve üropodlar bulunmaktadır (Avsever 2008).



Şekil 2.2. Kerevitin morfolojik yapısı, alttan görünüm (Koning 1994)

2.3. Kerevitlerde Görülen Bazı Önemli Hastalıklar

2.3.1. Kerevit vebası

Veba; kerevitleri etkileyen en yüksek tehlikeye sahip, enfekte olan bireyde %100 mortalite ile sonuçlanan bulaşıcı bir mantar hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan *Aphanomyces astaci*; Avrupa, Asya ve Avustralya türlerine karşı patojenik olmasına karşın Amerika kerevit türlerinde etkisi yoktur ya da çok az bir etkiye sahiptir (Unestam ve Weiss 1970; Unestam 1972, 1975).

Hastalığın ilk olarak 1860 yılları civarında Avrupa'ya Kuzey Amerika'dan taşındığı tahmin edilmektedir (Cornalia 1860; Alderman 1996). O zamandan beri Avrupa'nın tamamına yayılmış, özellikle geçmiş 35 yılda birçok ülkede (1981'de İngiltere, 1985'de Türkiye, 1987'de İrlanda) tespit edilmiştir. (Alderman vd. 1984; Baran ve Soylu 1989; Rahe ve Soylu 1989; Reynolds 1988).

Şu an en büyük tehlike İsveç'te olmakla beraber buradaki yerli kerevit popülasyonlarının %90'ının bu hastalık sebebiyle öldüğü tahmin edilmektedir (Edsman 2000). Bununla beraber *Aphanomyces astaci*'nin ömrü ve taşınma yolu bilgileri 140 yıldır bilinmektedir (Oidtmann vd. 2002).

Aphanomyces astaci Oomycete sınıfına ait Saprolegniales takımında yer alır. Oomycete sınıfı (yaygın olarak “water moulds” ismi ile anılır. Aynı zamanda kahverengi algilere ve diyatomlara, gerçek mantarlar olan Eumycota’dan daha yakın akrabalardır) taksonomik olarak gerçek mantar kabul edilmezler. *Aphanomyces astaci* Oomycota şubesinde Saprolegniaceae familyasında yer alır (Stephens 2005; Bower 2012).

Patolojisi incelendiğinde *Aphanomyces astaci*’nin hifalarının kerevit kütikülünün yumuşak ve CaCO₃ kısımlarına yerleştiği görülmektedir. Dirençli kerevitlerde ise yalnızca kütikül tabakası ile sınırlıdır. Hifalar aynı zamanda ventral sinirlerde ve beyin gangliyonunda da gelişebilir. Ancak bu büyüme seyrek olabilir ve histolojik muayenede farkedilmeyebilir. Organlarda ise hifalar, çoğunlukla gözde, çok nadir olarak da diğer organlarda görünür ve hastalık çok fazla ilerlemediği sürece kaslara ulaşmazlar (Stephens 2005).

Söz konusu hastalığın teşhisinde klinik muayene belirtileri farklılık gösterebilir, bazı kerevitlerde ise belirtiler gözle görünmeyebilir. Avrupa’daki kerevit türlerinde en belirgin belirti beyaz abdomendir. Bazı vakalarda kütikülde ve kas dokusunda kahverengileşme (melanizasyon) ve bu bölgede hifalar görünebilir. Moleküler olarak da PCR yöntemi ile teşhis edilmektedir.

Bu hastalığın henüz bilinen bir tedavisi yoktur. Hastalığın etki ettiği türler: *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Astacopsis gouldi*, *Austropotamobius pallipes*, *Austropotamobius torrentium*, *Cambaroides japonicus*, *Cherax quadricarinatus*, *Cherax destructor*, *Cherax papuanus* olarak listelenebilir. Bununla beraber, *Orconectes limosus*, *Pacifasticus leniusculus*, *Procambarus clarkii* türleri Kuzey Amerika’ya özgü türler olup *Aphanomyces astaci*’nin taşıyıcılarıdır ve yoğun kültür dışında hastalık belirtisi göstermezler (Longshaw 2011).

2.3.2. Beyaz benek sendromu virüsü

Beyaz benek hastalığı kerevitlerde görülen en ölümcül hastalıklardan birisidir. Mortalitesi genellikle çok yüksek ve 3 ile 10 gün arasında kümülatif mortalitesinin %100 e ulaştığı kesin olarak belirtilmiştir (Chou vd. 1995; Wongteerasupaya vd. 1995).

Beyaz leke hastalığı 1990’lı yılların başında birçok Asya ülkesinden (Inouye vd. 1994; Chou vd. 1995; Wongteerasupaya vd. 1995; Wang vd. 2000) yakın zamanda ise genellikle Güney Amerika ve ABD’nin güneydoğu kıyısından (Lightner vd. 1997; Wang vd. 2000) rapor edilmiştir.

Beyaz leke hastalığı virüsü geniş coğrafik dağılım gösteren çubuk şeklindeki bir kabuklu virüsüdür (Wang vd. 2000). Bu virüs Baltimore Sınıflandırma sistemine göre birinci grupta yer alan çift sarmallı bir DNA virüsüdür. UVTK Sınıflandırma sistemine göre ise Nimaviridae familyasına aittir. Çoğunlukla canlıların suyu yutmasıyla ve suda taşınmasıyla yatay olarak, kuluçkahanelerde enfekte olan anneden dikey olarak bulaşır.

Patolojisine bakıldığında, konakta bu virüsün ektodermal ve mezodermal kökenli birçok hücreyi enfekte ettiği bildirilmiştir. Histolojik değişimler solungaç epiteli, mide kesesi, hematopoetik doku, sinir dokusu, bağ dokusu ve intestinal epitel dokuda

görülmektedir (Wongteerasupaya vd. 1995). Beyaz lekeler enfekte kerevitin kabuğunda 0,3-3 mm çapında elips şeklinde görülür.

Klinik teşhisi yukarıda belirtildiği gibi oluşan beyaz lekelerin görülmesiyle, moleküler teşhisi ise nested ya da kantitatif PCR kullanılarak hızlı ve spesifik bir şekilde yapılmaktadır.

Bu hastalığın henüz bilinen bir tedavisi yoktur. *Astacus astacus*, *Cherax destructor albidus*, *Cherax quadricarinatus*, *Pasifastacus leniusculus* ve *Procambarus clarkii* kerevitleri hastalığın etki ettiği başlıca türlerdir.

2.4. Siyah Solungaç Hastalığı (*Fusarium oxysporum*)

Siyah solungaç hastalığı yalnızca kerevitlerde değil; ıstakoz, karides gibi birçok sucul kabuklu organizmada da görülebilen bir hastalıktır (Alderman ve Polglase 1985).

Fusarium oxysporum kaynaklı bu hastalık bugüne dek kerevitlerden bir kez rapor edilmiştir. Hastalığın semptomları; İstila edilen bölgede lezyonlar, solungaçlarda yapısal bozukluk ve kararma olarak görülmektedir. *Fusarium oxysporum* enfekte ettiği kerevitin fizyolojisinin bozulmasına, hemolenf sıvısında sodyum ve klor konantrasyonlarının düşmesine ve ozmotik basıncın azalmasına sebebiyet vermektedir.

Histolojik patojenite çalışmalarında *Fusarium oxysporum*'un kerevit dokusunu penetre edemediği gözlemlenmiştir. Bu yüzden siyah solungaç hastalığı yalnızca yaralı veya hasta kerevitlerde ikincil enfeksiyon olarak görülmektedir.

Bu hastalık kerevit stoklarının regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Maestracci ve Vey 1979).

2.4.1. *Fusarium oxysporum*

Toprak kaynaklı bir fungus olan *Fusarium oxysporum* dünya genelinde oldukça yaygındır. Birçok ticari bitki türü için (Patlıcan, patates, domates, marul, çilek, muz vb.) patojendir. Günümüzde 120'den fazla alt türü olduğu bilinmektedir ve her alt tür bir bitki türüne spesifiktir.

Sporları çoğu zaman 30 yıla yakın süreyle toprakta pasif olarak kalabilir; Su ve tarım aletleri yardımıyla bitkilere taşınabilir. Bu özellikler *Fusarium oxysporum*'u tarım alanları için oldukça büyük bir tehdit haline dönüştürmektedir (Longshaw 2011).

2.4.1.1. *Fusarium oxysporum*'un sistematığı

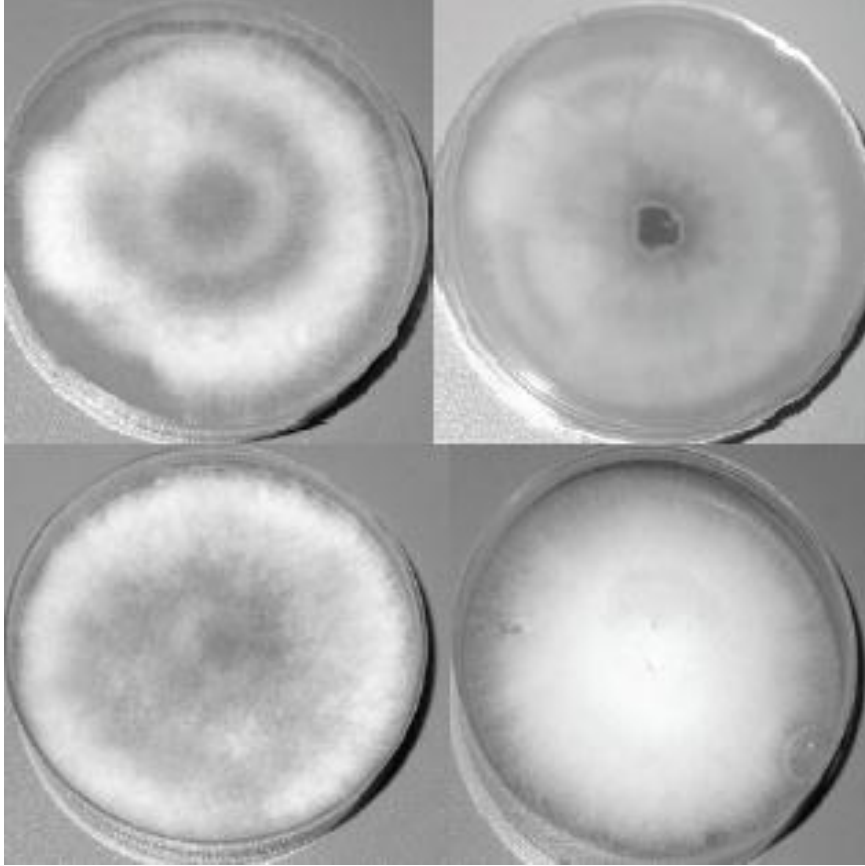
Araştırmada materyal olarak kullanılan mantarın sistematik bilgisi Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Fusarium oxysporum* (Schlechtendal, 1824)'un sistematığı

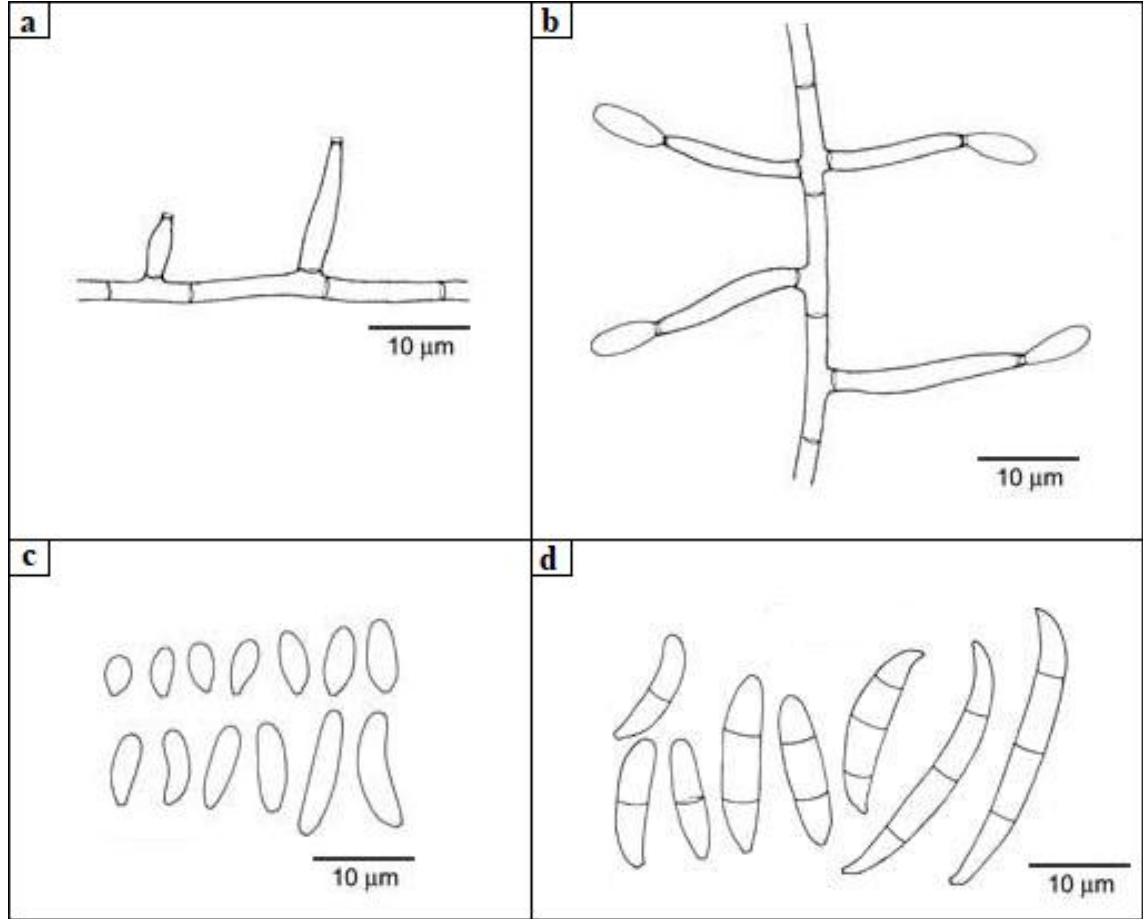
Alem:	Fungi
Şube:	Ascomycota
Alt Şube:	Pezizomycotina
Sınıf:	Sordariomycetes
Takım:	Hypocreales
Familya:	Nectriaceae
Cins:	<i>Fusarium</i>
Tür:	<i>Fusarium oxysporum</i>

2.4.1.2. *Fusarium oxysporum*'un morfolojisi

Petri kabında çoğu zaman yalnızca beyaz, bazen de pembe veya mor renkli hifaları görünür. Pamuksu bir yapısı vardır. Dairesel olarak gelişir (Şekil 2.3.).

**Şekil 2.3.** *F.oxysporum*'un petri kabındaki görüntüleri (Çolak ve Biçici 2013)

F.oxysporum'un mikroskopik çizimi Şekil 2.4.'de verilmiştir. Hifaları şeffaf, granülsüz ve septalıdır. Konidyoforlar hifalara göre daha kısa ve genelde septasızdır. Bu konidyoforlar miselyumdan farklılaşarak tek tek oluşum gösterirler. Mikrokonidiler genellikle septasız, oval, çoğunlukla düz bazen de hafif kıvrımlı görünürler. Mikrokonidiler her zaman tek tek üretilirler, asla zincirleme şekilde art arda görünmezler. Makrokonidiler iğ şeklindedir ve uçlarında çok az bir kıvrım vardır (Bu kıvrım fazlalaşırsa bazen kano, orak veya muz şeklinde görünebilir). Genellikle 3-5 segmentten oluşur (Smith ve Smedley 2011).



Şekil 2.4. *F.oxysporum*'un mikroskopik çizimi (Anonymous 1); **a)** Hifa ve dallanmış boş konidyoforlar **b)** Hifa ve dallanmış mikrokonidi üretimi gerçekleştiren konidyoforlar **c)** Mikrokonidiler **d)** Makrokonidiler

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer ve kullanılan ekipmanlar

Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

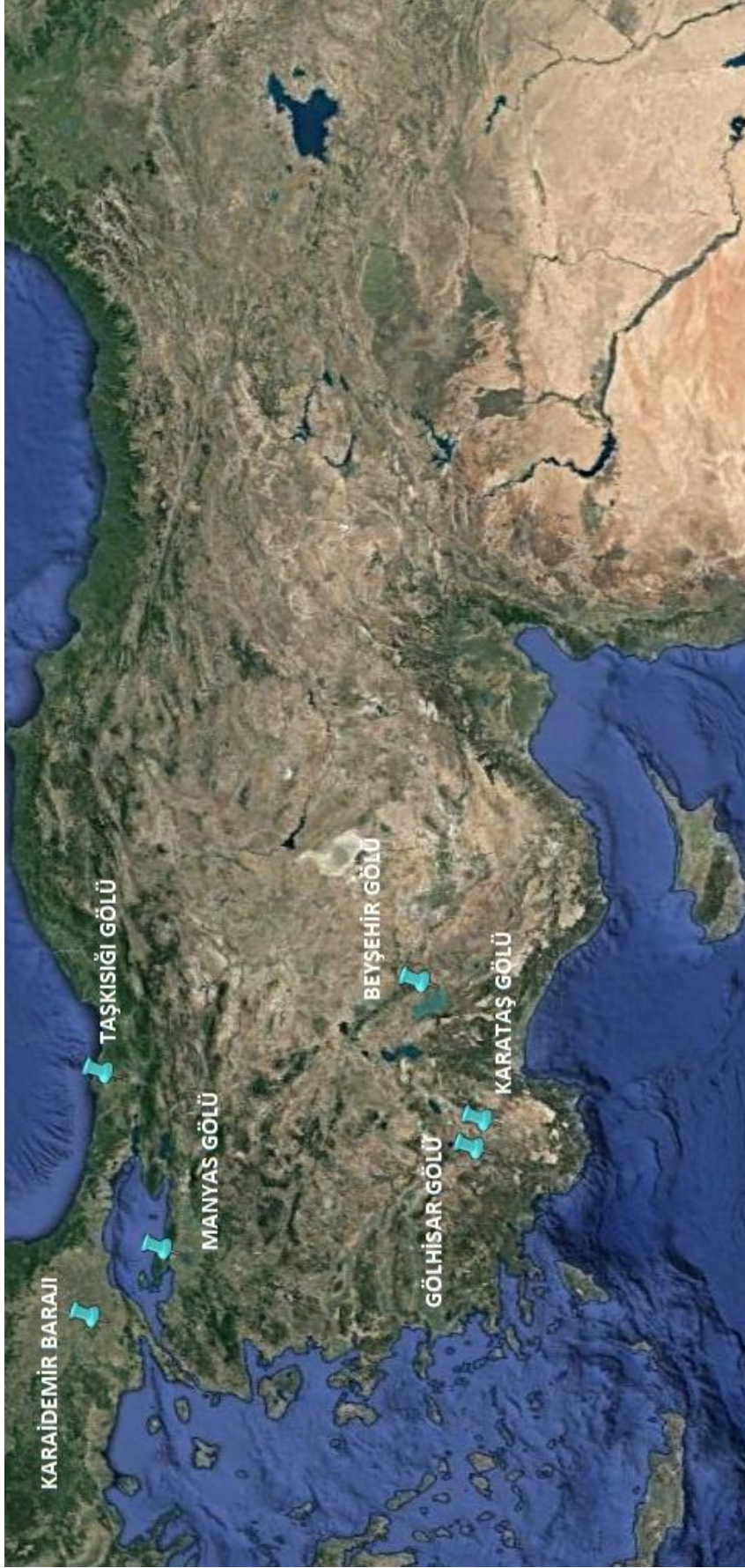
Laboratuvarda mevcut olan ve bu çalışmada kullanılan demirbaşlar şunlardır; PCR cihazı, buzdolabı, derin dondurucu, termal karıştırıcı, mikrodalga fırın, mikroskop, etüv, otoklav, vorteks, santrifüj, otomatik pipetler, elektroforez tankları, güç kaynağı, biyo-görüntüleme cihazı.

3.1.2. Kerevit materyali

Kullanılan kerevit materyalleri (*Astacus leptodactylus*), Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde yürütülen 1140368 numaralı TÜBİTAK projesinden temin edilmiştir. Bu çalışmada 6 farklı istasyondan elde edilen kerevit materyalleri kullanılmıştır. Örnekleme yapılan istasyonlar Şekil 3.1.'de ve Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Örnekleme yapılan istasyon bilgileri

İstasyon numarası	İstasyon adı	İl	Koordinatları	Örnekleme tarihi
1	Taşkısığı Gölü	Sakarya	40°52'07.00"K 30°24'12.00"D	14.08.2015 10.10.2016
2	Beyşehir Gölü	Konya	37°46'20.64"K 31°31'16.36"D	11.11.2016
3	Karaidemir Baraj Gölü	Tekirdağ	40°57'21.47"K 27° 00'38.23"D	08.08.2015
4	Karataş Gölü	Burdur	37°23'11.35"K 29°58'05.78"D	03.09.2015
5	Manyas Gölü	Balıkesir	40°12'10.56"K 27°56'53.99"D	14.08.2015 31.08.2016
6	Göhlisar Gölü	Burdur	37°06'51.19"K 29°36'02.34"D	16.03.2016 19.04.2016



Şekil 3.1. Örnekleme yapılan istasyonların harita üzerindeki görünümü

3.1.3. Mantar materyali

Çalışmada, Taşkısığı Gölü (Sakarya), Beyşehir Gölü (Konya), Karaidemir Baraj Gölü (Tekirdağ), Karataş Gölü (Burdur), Manyas Gölü (Balıkesir) ve Gölhisar Gölü (Burdur) su kaynaklarında bulunan ve siyah solungaç hastalığı belirtisi gösteren kerevit örneklerinden PDA besi yerine ekim yapılarak üretilen *Fusarium oxysporum* izolatları kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kerevit örneklerinin toplanması ve laboratuvara getirilmesi

Bazı istasyonlardan pinterler aracılığıyla yakalanan, bazı istasyonlardan ise balıkçı vasıtasıyla temin edilen *Astacus leptodactylus* türü kerevitler canlı olarak strafor kutularda laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.2., 3.3., 3.4.)



Şekil 3.2. Kerevit örneklerinin avlanması



Şekil 3.3. Avlanan kerevit örnekleri



Şekil 3.4. Strafor kutularda laboratuvara getirilen kerevit örnekleri

3.2.2. Mantar üretiminde kullanılacak olan besi yerinin hazırlanması

Fusarium oxysporum izolatlarının üreyebilmesi için besi yeri olarak PDA (Potato Dextrose Agar) kullanılmıştır. Hazır PDA karışımından (Lab M, İngiltere) 39 g tartılarak üzerine 1000 ml saf su eklenmiş ve otoklavlanarak steril edilmiştir. Sıcaklığı 40 °C'ye düştükten sonra istenmeyen mikroorganizmaların üremesini engellemek amacıyla 10 mg/l Oksolinik asit ve 100 mg/l Penisilin G solüsyonu eklenmiştir.

Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcı vasıtasıyla homojenize edildikten sonra petrilere dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

3.2.3. Mantarın üretilmesi

Klinik bulgularda Siyah Solungaç Hastalığı belirtileri görülen kerevit (*Astacus leptodactylus*) bireylerinden steril diseksiyon aletleri yardımı ile doku örnekleri alınmıştır (Şekil 3.5., 3.6.).

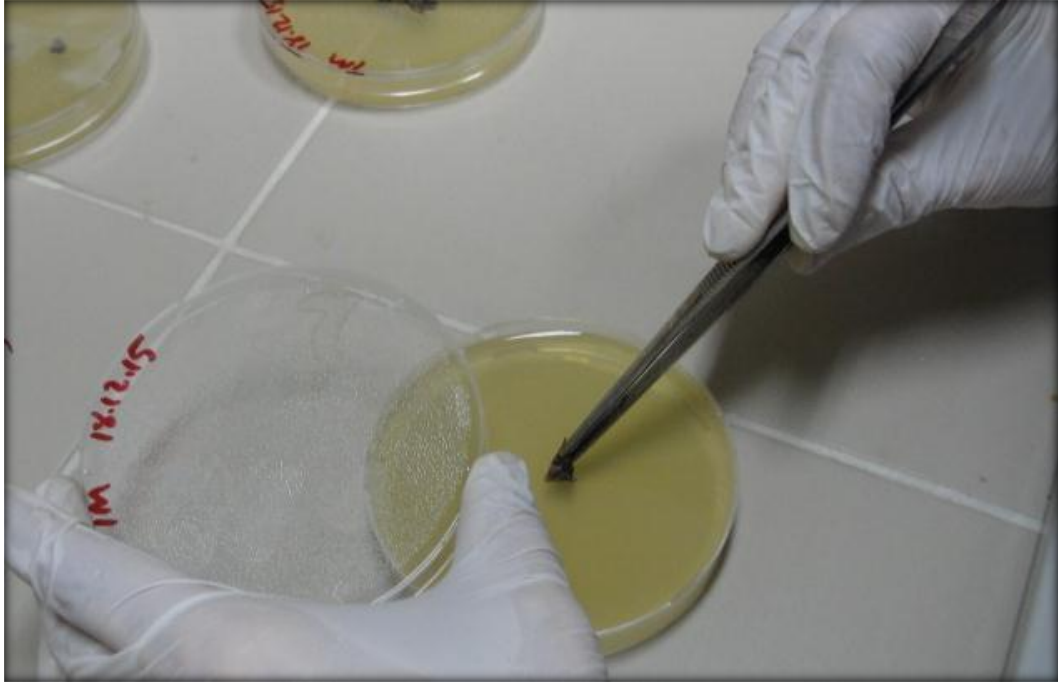


Şekil 3.5. Kerevit örneklerinin muayenesi

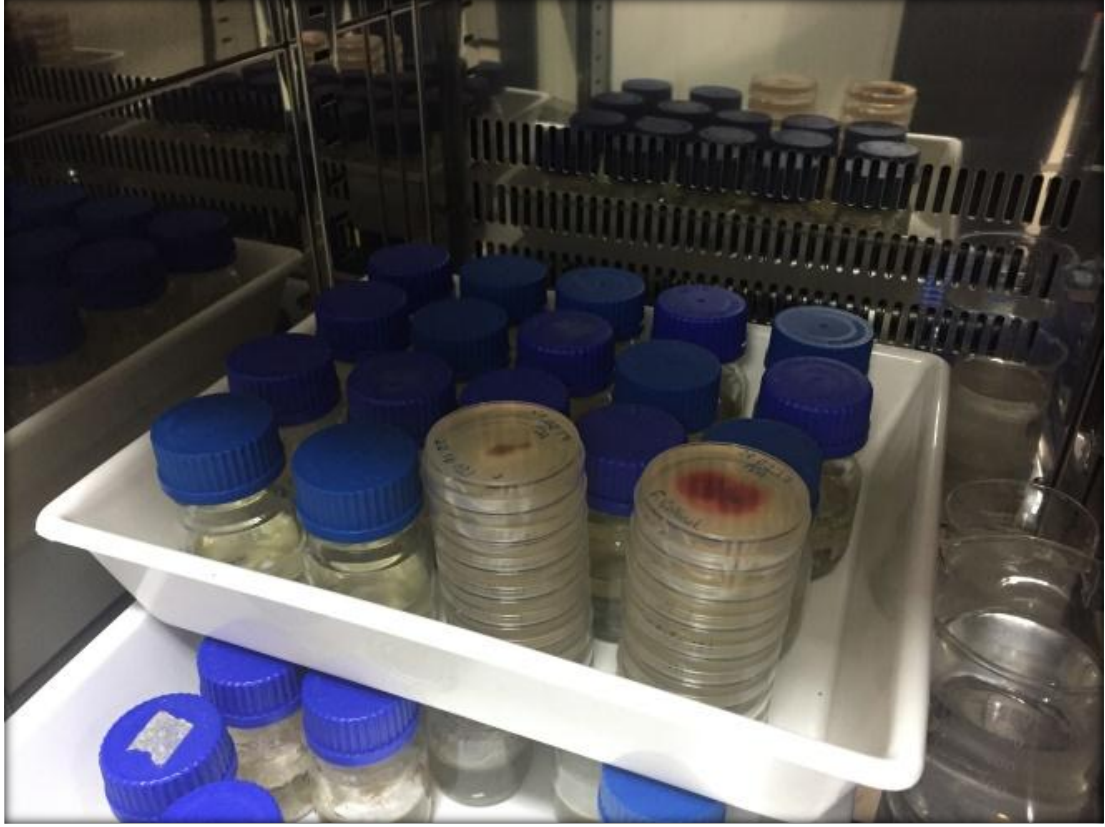


Şekil 3.6. Diseksiyon işlemi

Alınan doku örnekleri distile su ile yıkandıktan sonra PDA besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 25 °C'de 10 gün (Çolak ve Bıçıcı 2013) inkübe edilmiştir (Şekil 3.7., 3.8.).



Şekil 3.7. Alınan doku örneğinin besi yerine ekimi



Şekil 3.8. Mantarların inkübasyonu

3.2.4. Mantarın morfolojik teşhisi

İnkübe edilen mantarlar düzenli olarak her gün mikroskop altında incelenmiştir. Üreme görülen ve morfolojik yapısı *Fusarium oxysporum* olarak teşhis edilen mantar örnekleri petrilerden 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak saf su içerisinde sporulasyona tabi tutulmuştur. 24 saatlik sporulasyon sürecinden sonra tekrar mikroskop altında incelenmiş ve spor kümeleri gözlemlenmiştir.

3.2.5. Mantarın saklanması

Fusarium oxysporum olarak teşhis edilen organizmalar gerekli analizlerin yapımında kullanılmak üzere etrafi parafillenerek +4 °C'de buzdolabında ve daha sonraki analizler için gliserol-pepton (1:1) sıvı besiyerinde dondurularak saklanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Gliserol-pepton sıvı besi yerinde saklanan *Fusarium oxysporum* mantarı

3.2.6. DNA izolasyonu

DNA ekstraksiyonu için petri kabından hasat edilen mantarlardan ticari izolasyon kiti (Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit) kullanılarak DNA'ler elde edilmiştir. Hasat edilen mantarlar 1000 µl etanol yardımıyla havanda ezilmiştir. Ezme işleminden sonra 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alınan mantarlar, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip çöktürülmüştür. Çöktürülen mantarlar distile su ile 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek iki defa yıkanmıştır. Daha sonra üretici firmanın belirttiği talimatlar izlenerek DNA hazır hale getirilmiştir.

3.2.7. PCR optimizasyonu

DNA'ler elde edildikten sonra hastalığa neden olan etkenin teşhisi için FOF1 ve FOR1 primerleri (Mishra vd. 2003) kullanılarak PCR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin baz dizimleri (Mishra vd. 2003)

Primer	Baz dizilimi
FOF1	5'-ACATACCACTTGTTGCCTCG-3'
FOR1	5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3'

Tür tayininde kullanılan nrDNA'nın ITS bölgesini kopyalamak amacıyla gerçekleştirilen PCR amplifikasyonunda kullanılan karışım; 10 x PCR Tamponu, 20 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 1 ünite Taq DNA Polimeraz, her primerden 100 pmol ve 2

μ l DNA kullanılarak her bir PCR tüpünde toplam 50 μ l hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. PCR için hazırlanan karışımın içeriği

Kimyasallar	Konsantrasyon	Miktarı (μ l)
dH ₂ O	-	29,75
10X PCR Tamponu	-	10
MgCl ₂	20 mM	4
dNTP Karışımı	10 mM	2
Forward Primer	100 pmol	1
Reverse Primer	100 pmol	1
Taq DNA Polimeraz	5 u/ μ l	0,25
Kalıp DNA	-	2
Toplam	-	50

PCR için uygulanan protokolün başlangıcında 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, sonrasında 25 döngü 94 °C’de 1 dakika ayrılma, 58 °C’de 30 saniye bağlanma, 72 °C’de 1 dakika uzama ve en sonunda 72 °C’de 7 dakika son uzama aşamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca negatif kontrol için DNA konulmamış karışım tüpü kullanılmıştır (Çizelge 3.4.)

Çizelge 3.4. PCR protokolü

İşlem basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü
Denatürasyon	94	1	1
Ayrılma	94	1	25
Bağlanma	58	0,5	25
Uzama	72	1	25
Son uzama	72	1	1

3.2.8. Jel elektroforezi

DNA izolasyonu ve PCR işlemi sonucunda elde edilen ürünler 0,5 µg/ml ethidium bromid içeren %2'lik agaroz jelde 140 volt elektrik verilerek 60 dakika yürütüldükten sonra kontrol edilmiştir. Jel, biyogörüntüleme cihazında görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilip kaydedilmiştir. Pozitif sonuç alınamayan numuneler için PCR protokolü tekrar gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. DNA dizi analizi

Çoğaltılan ~340 baz çifti uzunluğundaki hedef gen bölgesi agaroz jelde yürütülüp kontrol edildikten sonra ticari bir firmaya gönderilerek dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 DNA dizi sonuçlarının değerlendirilmesi ve tür tayini

Elde edilen gen dizilerinin hizalanmasında “Bioedit” programı kullanılmıştır. Hizalanan baz dizilimlerinin hangi türe ait olduğunu tespit etmek amacıyla Gen Bank'ta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) blast yapılarak doğruluğu ve geçerliliği kontrol edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Muayene Bulguları

Siyah solungaç hastalığının teşhisi için muayene edilen kerevit örneklerinden elde edilen bulgular Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Kerevitin sefalotoraks bölgesinde *F.oxysporum* kaynaklı lezyon



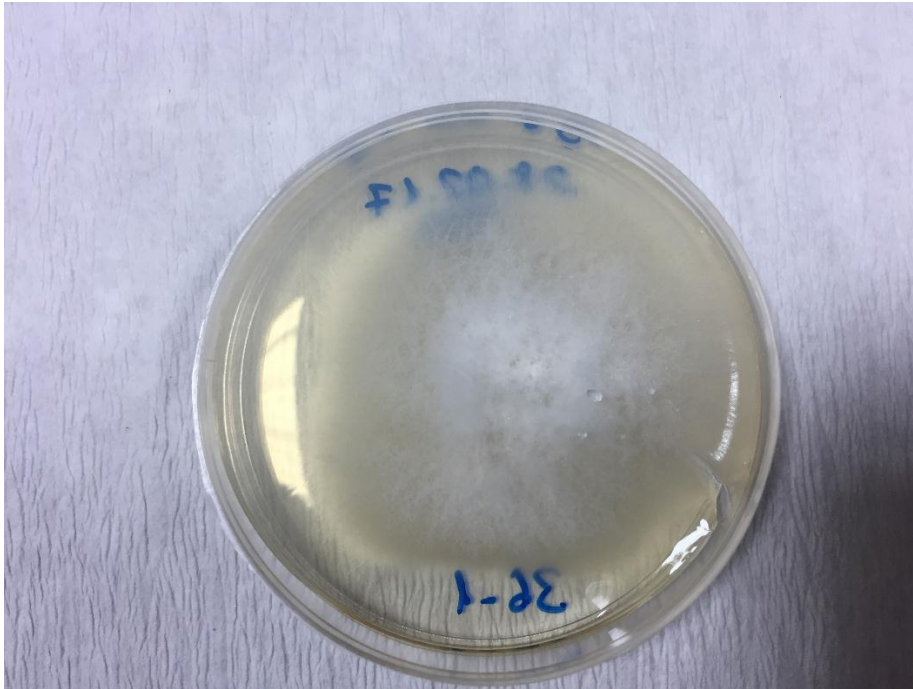
Şekil 4.2. Kerevitin abdomen bölgesinde *F.oxysporum* kaynaklı lezyonlar



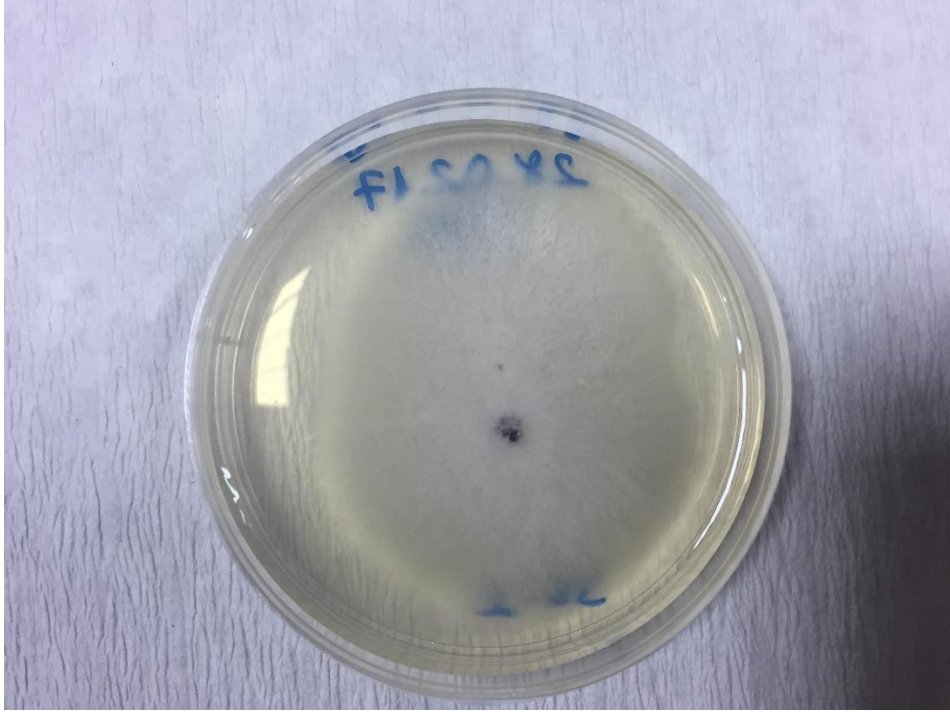
Şekil 4.3. Kerevitin solungaç dokusunda *F.oxysporum* kaynaklı kararma (nekroz)

4.2. Mantar Bulguları

Petrilerde ürediği gözlemlenen mantarların görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.

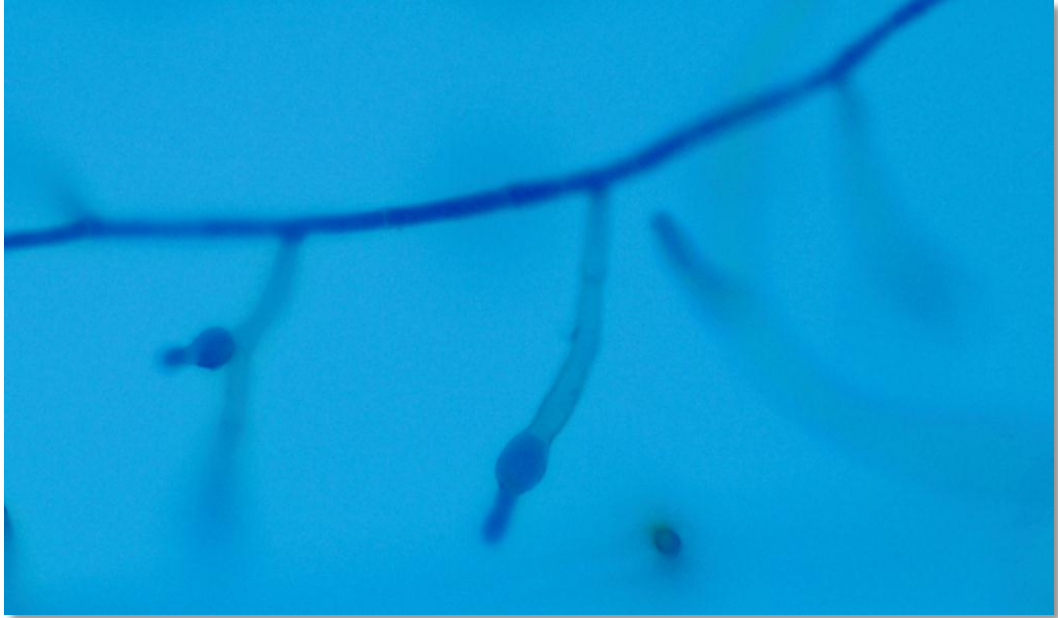


Şekil 4.4. *F.oxysporum*'un PDA besi yerindeki üreme görüntüsü (1)

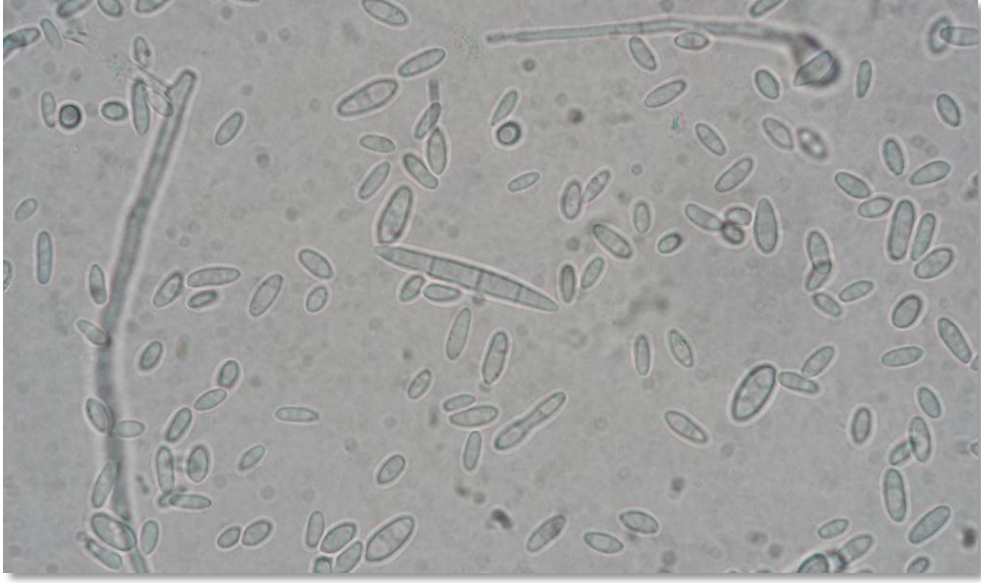


Şekil 4.5. *F.oxysporum*'un PDA besi yerindeki üreme görüntüsü (2)

İnkübasyon sürecinin akabinde üreyen mantarların mikroskop altında gözlemlenen morfolojik görüntüleri Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., ve Şekil 4.9'daki gibidir.



Şekil 4.6. *F.oxysporum*'un hifası ve konidyoforlar



Şekil 4.7. *F.oxysporum*'un sporları (mikrokonidiler ve makrokonidi)



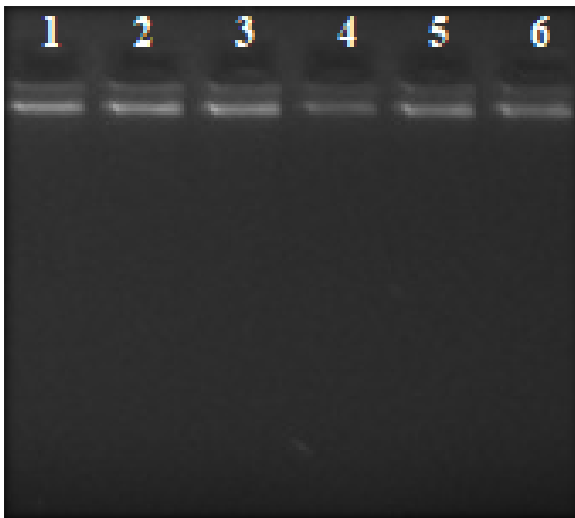
Şekil 4.8. Konidyofordan üretilmek üzere olan mikrokonidi



Şekil 4.9. Sporların (mikrokonidiler) kümelenmiş vaziyetteki görüntüsü

4.3. DNA Bulguları

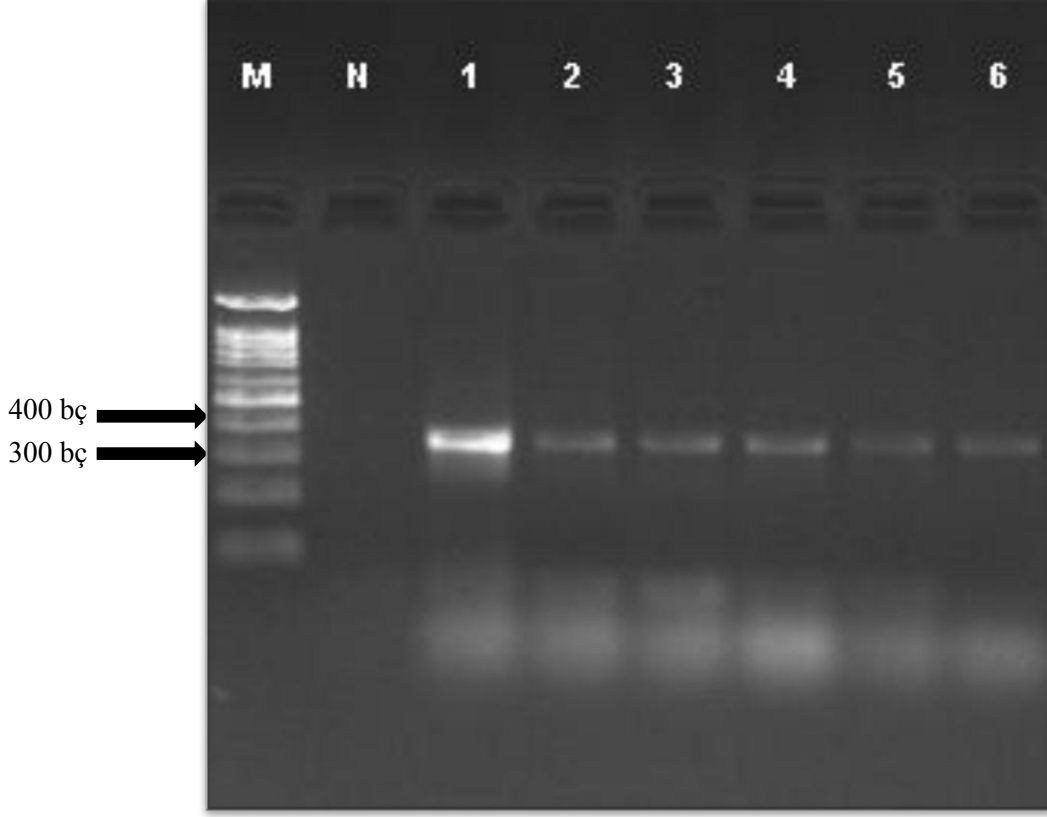
Her istasyondan birer adet mantar izole edilmiş ve DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon bulguları Şekil 4.10'daki gibidir.



Şekil 4.10. DNA izolasyon bulguları; 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karaidemir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü

4.4. PCR Bulguları

PCR uygulaması sonucu her izolattan beklenen uzunlukta (~340 bç) ürün gözlemlenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü; İzolatların elde edildiği istasyonlar: 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karaidemir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü

4.5. Dizi Analizi Bulguları

Dizi analizleri sonucunda elde edilen bulgulara göre PCR ürünlerinin baz dizilimleri ve izolatlar arasındaki baz farklılıkları Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.

111	111	111	122	222	222	333	333	444	444	455	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999
123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345
1	ACG	GCC	CAG	AGG	ACC	CCT	CTA	AAC	TCT	GTT	TCT	ATA	TGT	AAC	TTC	TGA	ATA	CAA	TTT	CAA	CAA	CGG	ATC	TCT
2	G..AC
3
4A
5AC
6AC
111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
000	000	001	111	111	112	222	222	222	333	333	333	333	344	444	444	445	555	555	666	666	666	666	666	666
012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	
1	TGG	CAT	CGA	TGA	AGA	ACG	CAG	CAA	AAT	GCG	ATA	AGT	AAT	GTG	AAT	TGC	AGA	ATC	GAA	TCT	TTG	AAC	GCA	CAT
2
3
4
5
6
122	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222
900	000	001	111	111	111	222	222	222	233	333	333	334	444	444	444	555	555	566	666	666	666	667	777	777
901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	
1	TCT	GGC	GGG	CAT	GCC	TGT	TCG	AGC	GTC	ATT	TCA	ACC	CTC	AAG	CAC	AGC	TTG	GGA	CTC	GCG	TTA	ATT	CGC	
2
3
4
5
6

Şekil 4.12. Dizi analizleri; 1) Taşkısığı Gölü 2) Beyşehir Gölü 3) Karademiir Baraj Gölü 4) Karataş Gölü 5) Manyas Gölü 6) Gölhisar Gölü

4.6. Blast Bulguları

Dizilerin Genbank'taki verilerle (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) karşılaştırılması sonucu elde edilen bulgular Çizelge 4.1.'deki gibidir.

Çizelge 4.1. Blast bulguları

Çalışmada elde edilen			Karşılaştırılan		
İzolat No.	İzolat Adı	Genbank Katılım No.	Tür	Benzerlik	Genbank Katılım No.
1	TASK	MH329362	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1
2	BEYS	MH329363	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1
3	KDMR	MH329364	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1
4	KRTS	MH329365	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1
5	MNYS	MH329366	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1
6	GHSR	MH329367	<i>Fusarium oxysporum</i>	%99	MG571643.1

5. TARTIŞMA

Su ürünleri tüketimi, insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle balıklarda bol miktarda bulunan EPA (eikosapentaenik asit) ve DHA (dokosaheksaenik asit) yağ asitlerinin insan sağlığı açısından önemi yaygın olarak bilinmektedir. EPA ve DHA yağ asitlerinin; fetüs gelişimi (retinal, nöronsal ve bağışıklık sistemi ile ilgili), kardiyovasküler işlevler (yangı, periferik arter hastalığı, kalp krizi, pıhtı) ve Alzheimer hastalığı üzerine etkileri mevcuttur (Swanson vd. 2012). Söz konusu yağ asitleri vücut tarafından sentezlenemez ve dışardan alınması zaruridir (Kaya vd. 2004)

Günümüz koşullarında bilgi ve teknolojinin kullanılması ve yayılmasındaki hızlı artış, buna paralel olarak insanların su ürünlerinin faydaları bakımından bilinçlenmesi ve su ürünleri avcılığı ve yetiştiriciliğinin ileri teknolojiler ile geliştirilmesi sayesinde su ürünleri sektörü çok hızlı bir gelişme kaydetmiş ve önemli bir gıda sektörü haline gelmiştir.

Su ürünleri sektörü aynı zamanda hızla artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacının karşılanması için ayrı bir önem arz etmektedir. Balık ve kerevit gibi yüksek oranda protein ihtiva eden ürünlerin yetiştirilmesi, korunması ve sürdürülebilirliği için hastalıkların doğru ve hızlı teşhisi, önlenmesi ve tedavisi hassasiyetle üzerinde durulması gereken konulardır.

Tatlısu istakozu ismiyle de bilinen kerevit, karın ve kısıkaçları gıda olarak tüketilen düşük kalorili bir protein kaynağıdır. Her ne kadar ülkemizde resmi kaynaklara göre tüketimi olmasa dahi birçok ülkede sevilerek tüketilmekte ve her geçen gün ekonomik değeri artmaktadır. Kerevit, Astacoidea ve Parastacoidea üst familyalarına ait on ayaklı kabuklu su ürünlerinin genel adıdır. Nehir, göl, gölet gibi su kaynaklarında doğal olarak yayılım gösterir.

Başta kerevit vebası ve beyaz benek sendromu hastalığı olmak üzere kerevit hastalıkları, kerevitlerde bireysel veya toplu ölümlere yol açmakta ve büyük ölçüde ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir. Bu hastalıkların yanısıra uygun koşullar meydana geldiğinde siyah solungaç hastalığı gibi ikincil enfeksiyonlar da ortaya çıkmakta, hastalanan bireylerin veya popülasyonların yaşam kalitesini ve su kaynağındaki ekolojik dengeyi bozmaktadır.

Bu tez çalışmasında Taşkısıği, Beyşehir, Karaidemir, Karataş, Manyas ve Gölhisar göllerinden avlanan kerevit bireylerinden üretilen 6 farklı mantar izolatu elde edilmiştir. Her izolattan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedef türün tespiti için nrDNA (Nükleer ribozomal DNA) ITS bölgesini (340 bç) çoğaltmak amaçlı tasarlanan FOF1 ve FOR1 primerleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Mishra vd. 2003).

PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş ve beklenen uzunlukta (340 bç) amplikonlar elde edilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünlerinin dizi analizleri yapılmış ve dizi sonuçları “Bioedit” programı kullanılarak hizalanmıştır. Hizalama sonucu oluşturulan veriler Macrogen firmasından gelen ham verilerle karşılaştırılıp doğruluğu kontrol edilmiştir. Elde edilen bulgular Genbank’ta (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) “Nucleotide BLAST” seçeneği kullanılarak önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu

çalışmada üretilen 6 izolatın da Amrutha ve Vijayaraghavan (2017)'a göre *Fusarium oxysporum* CRI-1 izolatıyla %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Ebble Nehri (Wiltshire, İngiltere)'nden elde ettikleri kerevit bireyi (*Astropotamobius pallipes*) üzerine olan 27 günlük gözlemlerini aktaran Alderman ve Polglase (1985), kereviti laboratuvara getirdiklerinde kabuk değişimi safhasında olduğunu, kabuk değişiminin normalden uzun sürerek 20 günde tamamlandığını aktarmışlardır. Kabuk değişiminin hatalı gerçekleşmesinden kaynaklanmış olabileceğini belirterek posterior solungaç filamentlerinin her iki yanda da kabuk dışında kaldığını ve solungaç dokusunda birçok (2 mm çapında) kahverengi-siyah enkapsülasyonlar gördüklerini ifade etmişlerdir. 18 °C'lik su sıcaklığına sahip tankta gözlemlerini sürdüren Alderman ve Polglase (1985) kerevit bireyinin genel durumunun zamanla kötüleştiğini, epibiyontlar tarafından tamamen sarıldığını ve 27. günün sonunda öldüğünü rapor etmişlerdir. Bu zaman zarfında kerevitin başta yürüme ayaklarının eklem noktalarında olmak üzere dış iskeletin çeşitli yerlerinde ilave melanizasyon ve enkapsülasyonlar tespit etmişlerdir. Solungaçlardaki enkapsülasyonları ışık mikroskopu altında inceleyen Alderman ve Polglase, pek çok sayıda hifa tarafından nüfuz edilmiş melanize olmuş yekpare bir matriks gördüklerini belirtmişlerdir. Ayrıca matriks dışında da az sayıda hifa tespit etmişler ve hem matriks içinde hem de dışındaki hifaların septalı olduğunu gözlemlemişlerdir. Solungaç enkapsülasyonlarından besi yerine ekim yaptıktan sonra 16 °C'de inkübasyona tabi tuttuklarında besi yerinde gelişen organizmanın *Fusarium tabacinum* türü olarak tespit edildiğini rapor etmişlerdir.

Alderman ve Polglase'nin bulgularına karşın bu çalışmada küçük çaplı enkapsülasyonlar veya solungaçların kabuk dışında kalması gibi bir bulguya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında incelenen hasta kerevit bireylerinin solungaçlarında deformasyon (dış iskeletinde), melanizasyon ve solungaç dokusunda nekrozlar gözlemlenmiştir. Buna karşın, Alderman ve Polglase'nin araştırmalarında belirttikleri gibi dış iskeletin çeşitli kısımlarında melanizasyonlar görülmüştür ancak bu melanizasyonlar kerevit vebasası (*Aphanomyces astaci*) kaynaklı olabilir.

Fusarium oxysporum türünün kerevitlerden moleküler olarak ilk defa tespit edildiği bu çalışmada ise 6 farklı istasyondan (her istasyon için birden fazla birey) elde edilen kerevit örneklerinden izole edilen mantarların her biri *Fusarium oxysporum* türü olarak teşhis edilmiştir. Alderman ve Polglase'nin bulguları ve sonuçları ile bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ve sonuçlar arasındaki farklılık; hastalığa sahip kerevit bireylerinin farklı türe ait olması, Alderman ve Polglase'nin tek bir kerevit bireyini (halihazırda genel durumu kötü ve ayrıca hatalı sonuçlanan bir kabuk değişimi safhası geçirmiş) gözlemlemiş olması, mantarın teşhisinde kullanılan yöntemlerin farklılığı gibi nedenlerle açıklanabilir. Bilindiği üzere PCR tekniği morfolojik tayini zor olan türlerin teşhis edilmesinde bilinen en etkili ve kesin sonuç veren yöntemdir. Bununla beraber daha sağlıklı bir tartışma yapılabilmesi için *Astacus leptodactylus* türü kerevitlerde de bu hastalık ile ilişkili histopatolojik incelemeler gerçekleştirilmelidir.

Kerevitte *Fusarium oxysporum* kaynaklı enfeksiyon bugüne dek yalnızca Maestracci ve Vey (1979) tarafından bildirilmiştir. Maestracci ve Vey çalışmalarında *Astacus leptodactylus* ve *Austropotamobius pallipes* türlerinde siyah solungaç hastalığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular *Astacus leptodactylus* türünde meydana gelen siyah solungaç hastalığının etkeni olarak *Fusarium*

oxysporum'u göstermektedir. Türkiye'de ise kerevitte *Fusarium* enfeksiyonuna dair bildirim Timur vd. (2010) tarafından yapılmış ancak tür bazında tanımlanmamıştır.

İleride siyah solungaç hastalığının epidemiyoljisi, histopatolojisi, konak-parazit ilişkisi, patojenin kerevit üzerindeki etkisi ve tedavisi araştırılmalıdır. Buna ek olarak, hastalığın daha hızlı teşhisi için kerevitlerden alınan doku numunelerinden direkt PCR yöntemiyle de *Fusarium oxysporum* mantarının tespit edilebilirliği incelenmelidir.

Ülkemizde 1960'lı yıllardan 1990'lı yıllara kadar yapılan kerevit ihracatı önemli bir gelir kaynağı olmuştur. Hastalıkların araştırılması, tespit edilmesi, önlenmesi ve tedavi edilmesi halinde ise yeniden ekonomik girdi sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

6. SONUÇLAR

Sonuç olarak Beyşehir Gölü (Konya), Gölhisar Gölü (Burdur), Karaidemir Baraj Gölü (Tekirdağ), Karataş Gölü (Burdur), Manyas Gölü (Balıkesir) ve Taşkısığı Gölü (Sakarya) *Astacus leptodactylus* türü kerevit popülasyonlarında siyah solungaç hastalığının mevcudiyeti saptanmış, hastalık etkeninin *Fusarium oxysporum* türü olduğu tespit edilmiştir.

Siyah solungaç hastalığı belirtileri gösteren kerevit bireylerinden alınan doku örneklerinden mantarların üretilmesi sağlanmış, üretilen mantarların makroskopik ve mikroskopik teşhisi referans görüntülerle karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. PCR yöntemi ile mantarların ITS (nükleer ribozomal DNA) gen bölgesi çoğaltılmış ve Genbank'ta blast yapılarak daha önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında üretilen izolatların %99 benzerlikle *Fusarium oxysporum* türü olduğu meydana çıkmıştır.

Fusarium cinsine ait farklı türlerin birbirlerine çok benzer morfolojik özelliklere sahip olması ve teşhisinin geleneksel yöntemlerle yapılabilmesi için uzman gerektirmesi, bu nedenle yavaş ve zor teşhis edilmesi sebebiyle bilinen en hızlı ve etkili moleküler teşhisi sağlayan PCR yönteminden faydalanılmalıdır. Bu çalışma PCR yönteminin doğal kerevit popülasyonlarından izole edilen *Fusarium* türlerinin teşhisinde kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

Aynı zamanda bu tez çalışması *Fusarium oxysporum* türünün, Türkiye tatlı sularındaki kerevitlerde varlığını ve meydana getirdiği siyah solungaç hastalığını bildiren ilk çalışmadır.

7. KAYNAKLAR

- Alderman, D.J., Polglase, J.L., Frayling, M. and Hogger, J.B. 1984. Crayfish plague in Britain. *Journal of Fish Diseases*, 7: 401-405.
- Alderman, D.J. and Polglase, J. 1985. *Fusarium tabacinum* (Beyma) Gams, as a Gill Parasite in the Crayfish, *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. *Journal of Fish Diseases*, 8: 249-252.
- Alderman, D.J. 1996. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique et Technique- Office International des Épizooties*, 15(2): 603-632.
- Alpbaz, A. 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği. Alp yayınları, İzmir, 270 s.
- Anonymous 1: http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=218372 [Son erişim tarihi: 19.04.2018].
- Avsever, L. 2008. Kerevit vebasının ileri tanı yöntemleri ile araştırılması. Doktora tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 57s.
- Baran, I. and Soylu, E. 1989. Crayfish plague in Turkey. *Journal of Fish Diseases*, 12(2): 193-197.
- Bower, S.M. 2012. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/saprocy-eng.html>
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C. and Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 165-173.
- Cornalia, E. 1860. Sulla malattia dei gamberi. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali*, 2: 334-336.
- Çavdar, Y. 2009. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Desteklemeler. *Sümae-Yunus Araştırma Bülteni*, 9(1): 13-14.
- Çolak, A. and Biçici, M. 2013. PCR detection of *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis lycopersici* and races of *F. oxysporum f. sp. lycopersici* of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37: 457-467.
- Edsman, L. 2000. Crayfish conservation in Sweden, lessons to learn. In: Rogers, D. and Brickland, J. (Eds.), Crayfish Conference Leeds. Environment agency, Leeds, pp. 19-25.
- Erlich, H.A. 1989. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*, 9(6): 437-447.
- Erol, K.G., Özkök, R., Küçükkara, R. ve Çınar, Ş. 2010. Tatlısu Istakozu *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) yetiştiriciliğinde yavru dönemde muhtemel ölüm nedenleri. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 6(2): 23-30.
- FAO. 2017. FAO Global Capture Production. <http://www.fao.org/3/a-br186e.pdf> [Son erişim tarihi: 05.01.2018].

- Harlioğlu, M.M. 2004. The present situation of freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) in Turkey. *Aquaculture*, 230: 181–187.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K. and Hiraoka, M. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, 29: 149-158.
- Kawai, T., Faulkes, Z. and Scholtz, G. 2015. Freshwater Crayfish: A Global Overview. CRC Press, Boca Raton, 679 s.
- Kaya, Y., Duyar, H.A. ve Erdem, M.E. 2004. Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı İçin Önemi. *Su Ürünleri Dergisi*, 21(3-4): 365-370.
- Koning, R.E. 1994. Ethology of Crayfish. <http://plantphys.info/organismal/labhtml/Crayfish.html> [Son erişim tarihi: 25.05.2018].
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poulos, B.T., Nunan, L.M., Mari, J.L. and Hasson, K.W. 1997. Risk of Spread of Penaeid Shrimp Viruses in the Americas by the International Movement of Live and Frozen Shrimp. *Revue scientifique et technique*, 16(1): 146-160.
- Longshaw, M. 2011. Diseases of Crayfish: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 54-70.
- Maestracci, V. and Vey, A. 1987. Fungal infection of gills in crayfish: histological, cytological and physiopathological aspects of the disease. *Freshwater Crayfish*, 7: 187-194.
- Mishra, P.K., Fox, R.T. and Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters*, 218: 329-332.
- Oidtmann, B., Heitz, E., Rogers, D. and Hoffmann, R.W. 2002. Transmission of crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52: 159-167.
- Özgen, M. 2015. Türkiye'nin En Büyük Kapalidevre Kerevit Kuluçkahanesi Açıldı. <http://www.suurunleri.org.tr/turkiyenin-en-buyuk-kapalidevre-kerevit-kuluckahanesi-acildi/> [Son erişim tarihi: 20.03.2018].
- Rahe, R. and Soylu, E. 1989. Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 10-15.
- Reynolds, J.D. 1988. Crayfish extinctions and crayfish plague in Central Ireland. *Biological Conservation*, 45: 279-285.
- Smith, A. and Smedley, A. 2011. *Fusarium oxysporum*. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum [Son erişim tarihi: 15.03.2018]
- Stephens, F. 2005. Disease strategy: Crayfish plague. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, 63 s.
- Swanson, D., Block, R. and Mousa, S.A. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, 3(1): 1-7.

- Taylor, I.A., McIntosh, P.B., Pala, P., Treiber, M.K., Howell, S., Lane, A.N. and Smerdon, S.J. 2000. Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell-cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. *Biochemistry*, 39(14): 3943-3954.
- Timur, G., Timur, M. ve Diler, Ö. 2010. Türkiye’de Kerevit Vebası Hastalığının Bazı Göllerdeki Kerevit Stoklarına Etkisi. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 6(2): 31-38.
- TÜİK. 2017. Su ürünleri istatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005 [Son erişim tarihi: 05.01.2018].
- Unestam, T. and Weiss, D.W. 1970. The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *Journal of General Microbiology*, 60: 77-90.
- Unestam, T. 1972. On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Report: Institute of Freshwater Research, Drottningholm*, 52: 192–198.
- Unestam, T. 1975. Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 53: 349–359.
- Wang, Q., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Archives of Virology*. 145: 263-274.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995 A nonoccluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 69–77.

ÖZGEÇMİŞ

YİĞİT TAŞTAN
yigittastan@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-Devam Ediyor	Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2008-2014	Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Kastamonu Üniversitesi
2018-Devam Ediyor	Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Kastamonu

ESERLER

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Taştan Y., Çağatay İ.T., Akhan S., "Tatlısu Istakozundaki (*Astacus leptodactylus*) hastalık etkeni *Fusarium oxysporum*'un teşhisi", II. ULUSLARARASI TURİZM VE MİKROBİYAL GIDA GÜVENLİĞİ KONGRESİ, ANTALYA, TÜRKİYE, 13-14 Aralık 2017, pp.61-61.

2- Akhan S., Çağatay İ.T., Berber S., Arlı B., Taştan Y., Çatlı T., "Molecular identification of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) fungus in Turkish crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations by PCR and its current status.", 7th International

Conference on Aquaculture and Fisheries, ROMA, İTALYA, 19-21 Ekim 2017, vol.8, no.9, pp.44-44.

3- Akhan S., Çağatay İ.T., Berber S., Arlı B. , Taştan Y., Çatlı T., "Genotyping crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by RAPD from Turkey", 7th International Conference on Aquaculture and Fisheries, Roma, İTALYA, 19-21 Ekim 2017, vol.8, no.9, pp.54-54.

4- Akhan S., Çağatay İ.T., Berber S., Arlı B., Taştan Y., Çatlı T., "Detection of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) diseases in major Turkish crayfish (*Astacus leptodactylus*) population by PCR method and distribution of crayfish plague in Turkey", International Symposium on Animal Science (ISAS) 2017, Herceg Novi, KARADAĞ, 5-10 Haziran 2017, pp.41-41.