



Sivas'ta Kuşburnu (*Rosa canina* L.)'nda Zarar Yapan *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen 1895) (Hymenoptera: Cynipoidea)'un Parazitoitleri ve Parazitoitlik Durumlarının Belirlenmesi

Lütfiye GENÇER^{1*}, Merve GÜL²

¹Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 58140, Sivas / TÜRKİYE

²Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, 58140, Sivas / TÜRKİYE

Received: 25.05.2017; Accepted: 30.10.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/csj.362657>

Özet: Bu çalışma kuşburnu bitkisinde gal oluşturan *Diplolepis fructuum*' un (Hymenoptera: Cynipoidea)'un parazitoitleri ve bu parazitoitlerin, parazitoitlik durumlarını belirlemek için yapılmıştır. Çalışma sonucu parazitoit olarak Chalcidoidea (Hymenoptera) üstfamilyasına ait 13 tür tespit edilmiştir. Parazitoitlerin teşhis edilmesinde iki yol izlenmiştir. Bunlardan ilki ergin ve larva üzerinden morfolojik incelemelerle yapılan teşhistir. İkincisi morfolojik olarak değerlendirilen ergin ve larvalarının genomik DNA izolasyonu yapılarak çekirdek (ITS2) ve mitokondri (COI) genomlarına ait belirteçler dizilenerek dizi bilgileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca açılan gallerin incelenmesi sonucu parazitoitlerin tamamının ektoparazitoit yaşam stratejisine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Diplolepis fructuum*, ITS2, Parazitoit, *Rosa canina*, Total çekirdek genomu

Determination of Parasitoids and its Parasitoids Life of *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen) (Hymenoptera: Cynipoidea) as Pest of Rosehip (*Rosa canina*) in Sivas

Abstract: This study was made to determine parasitoids and their parasitoids life of *D. fructuum* which are gall-inducing on *Rosa canina*. In the results of the study, as parasitoids were recorded thirteen species belong to Chalcidoidea superfamily. Identification of parasitoids were observed in two ways. The first of these, made by morphological examination of adult and larva. Second, it was done by genomic DNA isolation of adult and larva evaluated morphologically and was compared by sequencing of nuclear (ITS2) and mitochondrial (COI) genome. In addition, examination of opened gall were determined as ectoparasitoid of life strategy of all parasitoids.

Keywords: *Diplolepis fructuum*, ITS2, Parasitoids, *Rosa canina*, Total Core Genome

1. GİRİŞ

Kuşburnu (*Rosa canina*) Avrupa, Asya, Orta Doğu ve Kuzey Amerika'ya kadar geniş bir alanda yaygın olarak bulunmaktadır [1] Çok sayıda sinonime sahip olan *Rosa canina*'nın Türkiye'de bir çok

yöresel ismi vardır. Kuşburnu bitkisi ekolojik koşullara dirençli yapısıyla kayalık alanlarda, meyilli yerlerde, fakir topraklarda ve kurak bölgelerde yetişmektedir [2]. Sağlıklı ve doğal gıdalara talebin arttığı günümüzde tüketilen gıdalardaki doğallık ve biyoyararlılık aranan en

önemli özelliğidir [3]. Kuşburnu insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle binlerce yıldan beri bir çok ülke tarafından kullanılmaktadır [4, 5]. Aynı zamanda kuşburnu meyve ve sebzeler arasında en yüksek C vitamini içeriğine sahip bir meyve türü olarak bilinmektedir. Günümüzde kuşburnu üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda önemli bir besin kaynağı olduğu ve ayrıca vitamin, mineral ve fitokimyasal maddelerce zengin bir içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir [6-8]. Ekonomik önemi gittikçe artan kuşburnu bitkisinin çeşitli zararlıları bulunmaktadır. Bu zararlılardan biride böceklerin neden olduğu gallerdir. Gal yapan böceklerden Cynipoidae familyasına ait *Diplolepis* cinsi türleri güllerde oluşturduğu galler yanında özellikle kuşburnu bitkisinde de görülmektedir. *Diplolepis* cinsinin çok sayıda türü bulunmaktadır ve bu türlerden 5 tanesi kuşburnu bitkisinde gal oluşturur. Bu türler içerisinde yaygın olarak bulunan tür *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) dur. *D. fructuum*'un dişileri yumurtalarını kuşburnu bitkisinin çiçek tomurcuklarına ve genç sürgünlerinin içerisine bırakarak gal oluşumuna neden olur. Gal gelişimi larvalar yumurtadan çıktıktan sonra başlamaktadır. Galler iklim ve bölgeye göre değişmekle beraber genellikle Haziran sonu ve Temmuz başlarında görülmeye başlamakta, sonbaharda gerçek büyüklüklerini almaktadır ancak iklim koşullara bağlı olarak süreler değişebilmektedir. Doğada parazitlenme büyük olasılıkla Ağustos ve Eylül aylarında olmaktadır.

Parazitoitler, genellikle diğer böcek gruplarının popülasyonlarını sınırlayan canlılardır [9]. Parazitoitlerin büyük bir kısmı, konak özgülüğüne sahip oldukları için zararlılarla mücadelede biyolojik kontrol ajanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [10]. Aynı galden değişik parazitoidler çıkabilmektedir [11]. Gal oluşturan böceklerdeki besin zinciri çeşitlilik gösterir. Bu zincirde inquilin, endoparazitoit, ektoparazitoit ve predatörler görülür. Parazitoitler gal yapıcıların parazitoidleri olduğu gibi parazitoidlerin parazitoidleri de olabilir. Aynı zamanda endoparazitoit, ektoparazitoit, primer ve sekonder parazitoid olabilirler [12]. *D. fructuum*'un galleri

çok odacıklı galler olduğu için her bir odacıktaki parazitoidler farklılık gösterebilir.

Böcek sistematğinde kullanılan moleküler belirteçler, DNA ve protein belirteçleri olarak ikiye ayrılabilir. DNA belirteçlerinin genetik farklılığın ölçümünde yaygın hale gelmesi DNA örneklerinin proteinlere göre daha stabil olmasındandır [13]-[15]. Biyolojik araştırmalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adı verilen teknik hızlı bir şekilde yerini almıştır [16-19]. Tür bazında filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde mitokondrial DNA verileri son zamanlarda en yaygın kullanılan verilerdir. Böceklerde mitokondrial DNA çalışmalarında en fazla DNA dizisi çıkarılmış genler sitokrom oksidaz I ve II, 12 S ve 16 S genleridir [20-22]. Ribozomal RNA sistematik çalışmalarda kullanılan bir diğer bölgedir. Ribozomal RNA'lar türler arasındaki ilişkileri açıklamak için kullanılırlar çünkü korunmuş ve değişken bölgelere sahiptirler [23]. Ribozomal RNA üzerinde tekrar dizileri yer alır Bunlara tekrarlanan transkripsiyon birimleri de denir. Bunlar NTS (non transcribed spacer region), ITS (internal noncoding transcribed spacer region) ve ETS (external transcribed spacer) gibi bölgelerdir. Bu bölgelerde yüksek oranda polimorfizm bulunduğu için sistematik çalışmalarda çok sık tercih edilirler [24]. Ribozomal RNA ile ilgili yapılmış çalışmalar incelendiğinde en fazla 28 S, ITS 1 ve ITS 2 bölgelerinin kullanıldığı gözlenmiştir [20]. Bu sebepten dolayı bizim çalışmamızda da moleküler belirteç olarak COI ve ITS2 gen bölgeleri kullanılmıştır. Gerek ülkemiz dışında yapılan çalışmalar [25-28] gerekse ülkemizde yapılan çalışmalar [29-32]. incelendiğinde yapılan tüm çalışmaların *D. fructuum*'un parazitoidleri; morfolojik tanımları, dağılımı ve fenolojileriyle ilgili olduğu görülmektedir. Parazitoitlik ilişkisi ve parazitoidlik durumları ile ilgili çalışmalar cins bazında oldukça sınırlı [27, 33] olmakla birlikte *D. fructuum* için hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle *D. fructuum*'un parazitoidleri ve bu parazitoidlerin parazitoidlik durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bütün çalışmaların morfolojik olması nedeni ile moleküler çalışma

yapılarak larva ve erginlerin teşhisi teyit edilmek istenmiştir.

2. MATERYAL VE METHOD

Sivas ilinin çeşitli bölgelerinde bulunan kuşburnu bitkisinde gal oluşturan *D. fructuum*'un gal parazitoitleri ve parazitoitlik durumlarını tanımlamak amacıyla yapılan bu çalışma arazi ve laboratuvar olmak üzere 2 aşamada yürütülmüştür.

Tablo 1. Arazi bölgeleri ve lokaliteler

NO	LOKALİTE	N	E
1	Divriği-Karabel Geçidi	39° 36' 54."	37° 45' 14."
2	Suşehri	40° 10' 15"	38° 7' 6"
3	Zara-Akdoğan Köyü	39° 78' 49"	37° 79' 56"
4	Şarkışla-Karagöl	39° 13' 55"	36° 7' 45"
5	Sızır	39° 17' 11"	35° 57' 12"
6	Karaçayır	39° 47' 31"	36° 59' 25"
7	Gürün-Dörteylül	39° 44' 22"	36° 59' 47"

Laboratuvar Çalışmaları

Kuşburnu ağaçlarından elle toplanan gal örnekleri iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan ilk grubu ergin çıkışı sağlamak için cam kavanozlara koyularak ağızları tülbentle kapatılıp uygun sıcaklık ve nem oranı sağlanmıştır (oda sıcaklığı, %70 nem). Bu kavanozlar ikişer gün ara ile kontrol edilerek çıkan erginler teşhisleri yapılmak için, toplanıp etiketlenerek müze materyali haline getirilmiştir.

Ayrılan diğer grup galler ise stereo mikroskop (Nikon SMZ 1500) altında, bir gal kümesindeki odacık, bir odacıktaki parazitoitlerin sayısı ve parazitoitlik durumlarının belirlenmesi gibi bilgilerin elde edilebilmesi için incelemeye alınmıştır. Gal içinden çıkan *D. fructuum* ve *D. fructuum*'un parazitoitleri, etiket bilgileri yazılarak mutlak etanole koyularak buzdolabına kaldırılmıştır.

Gallerden çıkan erginlerin ve parazitoit larvalarının teşhisleri çeşitli teşhis anahtarlarından [26, 27], [33-38] yararlanılarak stereomikroskop (Nikon SMZ 1500) kullanılarak yapılmıştır.

Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları, türün yayılış modeli ve enlemsel farklılıklardan kaynaklanan erginleşme dönemlerindeki farklılıklar da dikkate alınarak Sivas ilinde 2014 yılı Eylül- Ekim ayları arasında yapılmıştır. Tablo.1' de verilen 7 farklı lokaliteden galler elle toplanmıştır.

Diğer bir laboratuvar çalışması ise etanole koyularak buzdolabında saklanılmış örneklerden yapılan DNA analiz çalışmalarıdır.

Alkolde saklanan *D. fructuum* parazitoitleri erginlerinden bir tane ve teşhisleri yapılan larvalardan alınan üç tane bireyi DNA izolasyonları tüm birey kullanılarak yapılmıştır. DNA tuzla çöktürülmüş ve COI ve ITS2 gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması için

COI s1859 5'GGAACIGGATGAACWGTTTAYCCICC 3'

COI a2590 5'GCTCCTATTGATARWACATARTGRAAAATG 3'

CAS5p8sFt 5'ATGAACATCGACATTTGCAACGCATAT 3'

CAS28sB1d 5'TTCTTTTCTCCGCTTAGTAATATGCTTAA3'

primer dizisi kullanılmıştır. PZR reaksiyonları 50 µl son hacimde hazırlanmıştır. 50 µl'lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,15 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hanover, MD), 5 µl 10× reaksiyon tampon (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), 1,5 mM MgCl₂, primerlerin her birinden 10 pmol, 0,25 mM her bir dNTP (MBI Fermentas) ve 200 ng kalıp DNA eklenmiştir.

PCR reaksiyonları bir DNA Techne TC-512 aletinde aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir:

COI:

Başlangıç denatürasyonu : 95 °C, 5 dakika

Denatürasyon : 94 °C, 30saniye

Primer bağlanma (Annealing) : 51 °C, 1 dakika 35 döngü

Uzama-Sentez (Extension) : 72 °C, 1 dakika

Son Uzama (Final Extension) : 72 °C, 10 dakika

ITS2:

Başlangıç denatürasyonu : 95 °C, 5 dakika

Denatürasyon : 94 °C, 1 dakika

Primer bağlanma (Annealing) : 51 °C, 1 dakika 35 döngü

Uzama-Sentez (Extension) : 72 °C, 1 dakika

Son Uzama (Final Extension) : 72 °C, 10 dakika

Agaroz jelden izole edilen saf DNA fragmanlarının dizileme işlemleri ticari bir biyoinformatik şirketi olan Macrogen (908 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) firmasına yaptırılmıştır. Her tür için birer tane bireyin DNA verisi kullanılmıştır. Dizileme reaksiyonları PCR uygulamasındaki primer çiftleri kullanılarak iki yönlü gerçekleştirilmiştir. Forward ve reverse nükleotid sekansları CodonCode Aligner 3.5.6 [39] programı kullanılarak gözle hizalanmıştır. Konsensüs dizilerinin hizalanması ve uzaklık analizlerinde ise Mega 6.1 programına başvurulmuştur. Uzaklık analizleri yapılırken aynı topolojiyi verdiği için Maksimum Likelihood algoritması seçilmiştir.

3. BULGULAR

Yapılan çalışmada parazitoitlerin tespit edilmesi ve parazitoitlik durumlarının belirlenmesi ile birlikte konukçu *D. fructuum* 'un gelişimide incelenmiş ve resmedilmiştir (Şekil 1). Kuşburnu bitkisi içerisinde bulunan çekirdeklerin parazitlenmesiyle

gal oluşumu başlar. Yapılan incelemelerde meyve şekli normal boyutundan büyük veya şekil değişikliği gösteriyorsa çekirdek mutlaka parazitlenmiştir. Hafif sertleşmiş ve renkleri solmuş meyve çekirdekleri incelendiğinde çekirdekle beraber bir veya birkaç tane gal odacığıda gözlenmiştir. Parazitlenmenin başladığı meyvelerde olgunlaşmamış çekirdek sayısı oldukça fazladır. Gal büyüklükleri her bir lokalite de farklılık göstermektedir. Bazı bölgelerin (6. ve 7. bölge) galleri daha büyüktür. Gal tane sayıları da her bir galde farklı olmakla beraber ortalama 10-15 tanedir. Tane olarak nitelendirdiğimiz gal birimleri içinde eğer makroskopik olarakta gal veya taneleri büyükse birden fazla odacıktan oluştuğu tespit edilmiştir. Yaklaşık 100 tane gal kümesi açılıp incelenmiş ve gal oluşturan *D. fructuum* ve parazitoitler incelenerek parazitoitlik durumları belirlenmiştir. Ayrıca yapılan incelemede açılan gallerdeki parazitoitlere daha sonra teşhislerde kullanılmak üzere numaralar verilmiştir. Böylece ergin teşhisleri ile larval teşhisleri doğrulanarak parazitoitlik durumları hakkında net bilgiler elde edilmiştir



(a)



(b)



(c)



Şekil 1. *D. fructuum* gelişimi a) Parazitenmiş kuşburnu bitkisi, b) Gal kümesi, c) Gal içinde larva odacığı ve larvalar, d) Larva gelişimi, e) Ergin *D. fructuum*.

İlk morfolojik gözlemlere dayalı olarak hemen her bir bölgede aynı tipte parazitoidlere rastlanmıştır. Çalışmamızda *D. fructuum* 'un gallerinden çıkan parazitoidler ve ait oldukları familyalar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. *D. fructuum* gallerinden çıkan parazitoidler ve ait oldukları familyalar.

FAMİLYA	TÜR
Eulophidae	<i>Hyssopus nigrutilus</i>
	<i>Stepanovia eurytomae</i>
Eupelmidae	<i>Eupelmus urozonus</i>
	<i>Eurytoma rosae</i>
Eurytomidae	<i>Eurytoma pistaciae</i>
	<i>Eurytoma sp.</i>
	<i>Eurytoma sp.</i>
	<i>Sycophila biguttata</i>
Pteromalidae	<i>Mesopolobus sericeus</i>
	<i>Pteromalus bedeguaris</i>
Torymidae	<i>Glyphomerus stigma</i>
	<i>Megastismus rosae</i>
	<i>Torymus bedeguaris</i>
	<i>Torymus rubi</i>

Genellikle parazitoit türleri aynı olmakla birlikte parazitoit yoğunlukları farklılık göstermektedir. *D. fructuum* üzerinde bulunan soliter parazitoitler gregarious parazitoitlere oranla daha fazladır. Parazitoitlerin ergin zamanları yaklaştıkça *D. fructuum* sayısı azalmakta ve gal içlerinde boş odacıklara rastlanmaktadır. Gal içerisinde yapılan bu gözlemler sonucu parazitoitlerin, koinobiont olduğu yorumlanabilir. *D. fructuum* gallerinden elde edilen parazitoitlerden *Pteromalus bedeguaris*, *Torymus rubi* ve *Eurytoma rosae* populasyon yoğunlukları en fazla olan türler olarak belirlenmiştir. Ayrıca yapılan incelemeler sonucunda parazitoit türlerin hepsi ektoparazitoit olarak tanımlanmıştır ve idiobiont olduğu tesbit edilen *Stepanovia eurytomae* hariç diğer parazitoitlerin koinobiont parazitoitler olarak

gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Açılan gallerde görülen *Diplolepis fructuum* larvasına parazitoitler genellikle baş kısmından zarar vermeye başlamış, ergin olmalarına izin vermemişlerdir. Üzerinde parazitoit bulunan larvalar diğerlerine göre daha az hareket etmekte ve parazitoitsiz larvalar çok hareketlidirler. Üzerinde parazitoit olan larvaların renkleri diğerlerine göre daha koyulaşmıştır. Parazitoitlerin parazitoitlik durumlarının belirlenmesi için ve stereomikroskop altında yapmış olduğumuz teşhisleri doğrulamak için Tablo 3'te gösterilen örneklere ait ergin ve larvalarının genomik DNA izolasyonu yapıp, çekirdek (ITS2) ve mitokondri (COI) genomlarına ait belirteçler dizilerek dizi bilgileri karşılaştırılarak parazitoit türlerin teşhisleri doğrulanmıştır.

Tablo 3. Moleküler çalışmanın yapıldığı türlerin adlandırılması ve familyaları.

ADLANDIRMA	TÜR	FAMİLYA
1E	<i>Eurytoma rosae</i>	
2E	<i>Eurytoma pistaciae</i>	Eurytomidae
3E	<i>Sycophila biguttata</i>	
4E	<i>Pteromalus bedeguaris</i>	Pteromalidae
5E	<i>Mesopolobus sericeus</i>	
6E	<i>Torymus bedeguaris</i>	
7E	<i>Torymus rubi</i>	Torymidae
8E	<i>Glyphomerus stigma</i>	
10E	<i>Megastismus rosae</i>	
11E	<i>Eupelmus urozonus</i>	Eupelmidae
12E	<i>Stepanovia eurytomae</i>	Eulophidae
13E	<i>Hyssopus nigrutilus</i>	
14E	<i>Eurytoma sp.</i>	Eurytomidae
15E	<i>Eurytoma sp.</i>	
16E	<i>Diplolepis fructuum</i>	Cynipidae

Diplolepis fructuum ve parazitoitlerinin uzaklık analizleri Mega 6.1. programı ile yapılmıştır. Bu program sonucu elde edilen uzaklık analizleri Tablo.4 (COI) ve Tablo.5 (ITS2) 'de gösterilmiştir.

Tablo 4. COI gen bölgesine göre uzaklık analiz verileri

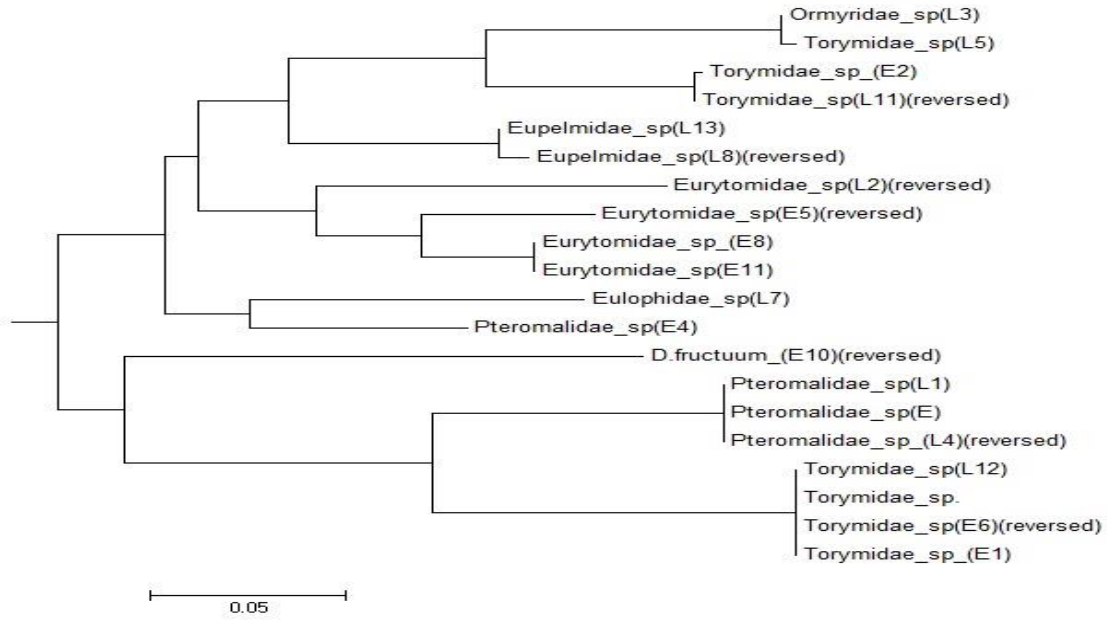
	<i>D.fructuum</i>	(E6)	(E1)	(L12)	<i>Torymidae</i> sp.	(L4)	(L1)	<i>Pteromalidae</i> e sp	(L7)	(L13)	(L8)	(L3)	(L5)	(E2)	(L11)	(E8)	(E11)	(E5)	(L2)	(E4)
<i>D.fructuum</i> _(E10)(reversed)																				
<i>Torymidae</i> sp. (E6)(reversed)	0,288																			
<i>Torymidae</i> sp. (E1)	0,288	0,000																		
<i>Torymidae</i> sp. (L12)	0,288	0,000	0,000																	
<i>Torymidae</i> sp.	0,288	0,000	0,000	0,000																
<i>Pteromalidae</i> sp. (L4)(reversed)	0,273	0,168	0,168	0,168	0,168															
<i>Pteromalidae</i> sp. (L1)	0,273	0,168	0,168	0,168	0,168	0,000														
<i>Pteromalidae</i> sp. (E)	0,273	0,168	0,168	0,168	0,168	0,000	0,000													
<i>Eulophidae</i> sp. (L7)	0,256	0,230	0,230	0,230	0,230	0,233	0,233	0,233												
<i>Eupelmidae</i> sp. (L13)	0,229	0,253	0,253	0,253	0,253	0,244	0,244	0,244	0,144											
<i>Eupelmidae</i> sp. (L8)(reversed)	0,234	0,258	0,258	0,258	0,258	0,244	0,244	0,244	0,140	0,007										
<i>Orymyidae</i> sp. (L3)	0,269	0,296	0,296	0,296	0,296	0,275	0,275	0,275	0,174	0,153	0,151									
<i>Torymidae</i> sp. (L5)	0,269	0,299	0,299	0,299	0,299	0,281	0,281	0,281	0,179	0,157	0,155	0,004								
<i>Torymidae</i> sp. (E2)	0,230	0,248	0,248	0,248	0,248	0,265	0,265	0,265	0,169	0,146	0,148	0,128	0,130							
<i>Torymidae</i> sp. (L11)(reversed)	0,227	0,246	0,246	0,246	0,246	0,265	0,265	0,265	0,167	0,148	0,151	0,126	0,128	0,002						
<i>Eurytomidae</i> sp. (E8)	0,240	0,272	0,272	0,272	0,272	0,255	0,255	0,255	0,155	0,146	0,148	0,181	0,181	0,162	0,160					
<i>Eurytomidae</i> sp. (E11)	0,240	0,272	0,272	0,272	0,272	0,255	0,255	0,255	0,155	0,146	0,148	0,181	0,181	0,162	0,160	####				
<i>Eurytomidae</i> sp. (E5)(reversed)	0,239	0,272	0,272	0,272	0,272	0,260	0,260	0,260	0,167	0,162	0,167	0,197	0,195	0,171	0,168	####	0,072			
<i>Eurytomidae</i> sp. (L2)(reversed)	0,260	0,258	0,258	0,258	0,258	0,264	0,264	0,264	0,192	0,159	0,159	0,191	0,196	0,173	0,173	####	0,136	0,154		
<i>Pteromalidae</i> sp. (E4)	0,219	0,258	0,258	0,258	0,258	0,235	0,235	0,235	0,135	0,150	0,146	0,188	0,190	0,174	0,171	####	0,144	0,148	0,164	

Tablo 5. ITS2 gen bölgesine göre uzaklık analiz verileri

	<i>D.fructuum</i>	(E7)	(L6)	(L2)	(E11)	(E5)	(E9)	(L3)	(E4)	(L1)	<i>Pteromalidae</i> sp. (E3)	(L4)	<i>Torymidae</i> sp. (E)	(L11)	(L12)	(L5)
<i>D.fructuum</i> (E10)																
<i>Eulophidae</i> sp. (E7)	0,120															
<i>Eupelmidae</i> sp. (L6)	0,324	0,970														
<i>Eurytomidae</i> sp. (L2)(reversed)	0,110	0,872	0,907													
<i>Eurytomidae</i> sp. (E11)(reversed)	0,242	0,786	0,860	0,258												
<i>Eurytomidae</i> sp. (E5)(reversed)	0,242	0,786	0,860	0,258	0,000											
<i>Eurytomidae</i> sp. (E9)	0,242	0,786	0,860	0,258	0,000	0,000										
<i>Orymyidae</i> sp. (L3)	0,572	0,101	0,931	0,764	0,787	0,787	0,787									
<i>Pteromalidae</i> sp. (E4)	0,969	0,832	0,883	0,773	0,833	0,833	0,833	0,925								
<i>Pteromalidae</i> sp. (L1)(reversed)	0,442	0,116	0,383	0,254	0,229	0,229	0,229	0,327	0,511							
<i>Pteromalidae</i> sp. (E3)(reversed)	0,442	0,116	0,383	0,254	0,229	0,229	0,229	0,327	0,511	0,000						
<i>Pteromalidae</i> sp. (L4)	0,442	0,116	0,383	0,254	0,229	0,229	0,229	0,327	0,511	0,000	0,000					
<i>Torymidae</i> sp. (E)	0,324	0,970	0,000	0,907	0,860	0,860	0,860	0,931	0,883	0,383	0,383	0,383				
<i>Torymidae</i> sp. (L11)	0,357	0,872	0,893	0,762	0,775	0,775	0,775	0,186	0,894	0,124	0,124	0,124	0,893			
<i>Torymidae</i> sp. (L12)	0,418	0,859	0,907	0,757	0,758	0,758	0,758	0,174	0,881	0,123	0,123	0,123	0,907	0,014		
<i>Torymidae</i> sp. (L5)	0,572	0,510	0,931	0,764	0,787	0,787	0,787	0,000	0,925	0,327	0,327	0,327	0,931	0,186	0,174	

COI gen bölgesine ait yapılan Maksimum Likelihood uzaklık analiz metoduna göre Şekil 2’de *Pteromalidae* (E) ergininin (L1), (L4) larvalarıyla eşleştiği; *Eupelmidae* (L13), (L8) larvaları; *Torymidae* (E2) ergininin, L (11) larvasıyla eşleştiği; *Eurytomidae* (E5) ergininin, (L2) larvasıyla eşleşerek benzer olduğu görülmektedir. *Torymidae* (L12), larvası *Torymidae* (E6), *Torymidae* (E1),

Torymidae (E) erginleri ile benzerdir. *Eulophidae* (L7) larvasının *Pteromalidae* (E4) erginiyle eşleştiği; *Orymyidae* (L3), *Torymidae* (L5) larvalarının aynı olduğu gözlenmektedir ve *Eulophidae* larvasının ve *Orymyidae* larvalarının yanlış teşhis yapıldığını ve *D. fructuum*’ un da ayrı bir kolda olduğunu analiz sonuçları göstermektedir.



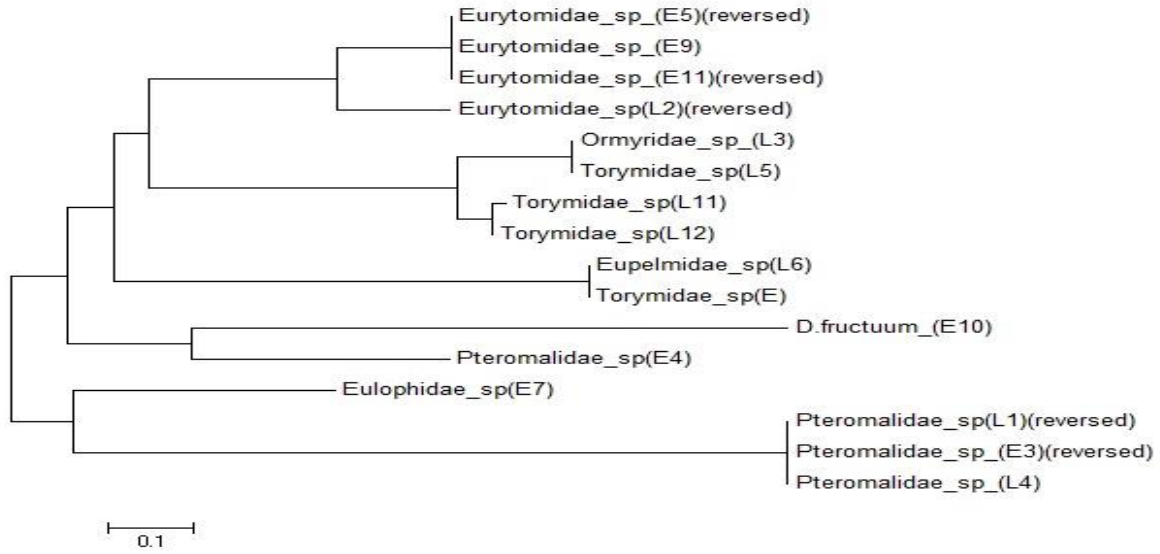
Şekil 2. COI gen bölgesine göre uzaklık ağacı.

ITS2 gen bölgesine ait yapılan Maksimum Likelihood uzaklık analiz metoduna göre ise şekil 3' de Pteromalidae (E3) ergini, (L1), (L4) larvaları ile; Eurytomidae (L2) larvası (E11), (E5), (E9) erginleriyle; Torymidae (L11), (L12) larvaları birlikte eşleşmiştir ve benzerlik göstermektedir. Eupelmidae (L6) larvası ile Torymidae (E) ergini; Ormyridae (L3), Torymidae (L5) larvaları aynı kolda bulunarak benzerlik göstermektedirler ancak Eupelmidae, Ormyridae larvaları yanlış teşhis yapılmıştır. Eulophidae (E7), Pteromalidae (E4) ve *D. fructuum*'da ayrı ayrı kollarda yer almaktadır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

D. fructuum'un parazitöitleri ile ilgili gerek Türkiye gerekse diğer ülkelerde yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır [11, 31, 32, 40, 41]. *D. fructuum*'un parazitöitleri olarak daha çok Chalcidoidea üstfamilyasına ait türler olmakla birlikte Ichneumonoidea üstfamilyasına ait türlerde belirlenmiştir. Çalışmamızda hem ergin hemde larval olarak hiç Ichneumonid türüne rastlanmamıştır. Bu durum bölgede daha önce yapılan çalışmalar ile uygunluk göstermektedir [32]. Çalışmada *D. fructuum*'da tespit edilen

Chalcidoidea türleri verilmiştir. Populasyon yoğunlukları olarak çalışmamızda ilk sırada yer alan *Pteromalus bedeguaris*, *Torymus rubi*, ve *Eurytoma rosae* türleri diğer çalışmalarda ilk sırada yer almaktadır [11, 40, 41]. Bu türlerin *D. fructuum*' un populasyonunu kontrol altına almada önemli türler olabileceği belirtilmiş olmasına rağmen parazitöitlerin parazitöit- konukçu ilişkisine dair hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yapılan bu çalışma ile parazitöit-konukçu ilişkisi, parazitlenme zamanları hakkında bilgiler elde edilmiştir. Galler içindeki *D. fructuum* larvaları kışı larva döneminde geçirecek ilkbaharda pupa olmaktadır. Klimatik nedenlere bağlı olarak, Nisan sonu ve Mayıs başlarında da ilk ergin çıkışları gözlenmektedir. Parazitlenme de büyük olasılıkla Ağustos-Eylül aylarında olmaktadır [42]. Çalışmamızda toplanılarak açılan gallerdeki parazitöitlerin larvaları ve ergin çıkışları arasındaki süreye bakıldığında bu zamanın parazitlenme için uygun bir zaman dilimi olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 3. ITS2 gen bölgesine göre uzaklık ağacı.

Gal oluşturan böceklerdeki besin zinciri çeşitlilik gösterir. Bu zincirde inquilin, parazitoit, predatör gibi yaşam stratejileri görülebilir. Açılan gallerde gözlenen duruma göre parazitoitlerin ergin zamanları yaklaştıkça *D. fructuum* sayısı azalmakta ve gal içlerinde boş odacıklara rastlanmaktadır. Gal içerisinde yapılan bu gözlemler sonucu *Stepanovia eurytomae* hariç hepsinin koinobiont ektoparazitoit olduğu gözlemlenmiştir. *Stepanovia eurytomae*'nin gregarious yaşam gösterdiği ve yumurta-larval parazitoit olduğu, konukçuyu erken dönemde tüketen idiobiont parazitoit olduğu gözlenmiştir. Diğer odacıklardaki *D. fructuum* parazitoitlerinin gelişmelerinde larva deri kalıntularına rastlanırken *Stepanovia eurytomae*'nin bulunduğu odacıklarda bu kalıntılara rastlanmamıştır.

Açılan gallerdeki parazitoit larvaların, morfolojik olarak teşhisleri yapıldıktan sonra moleküler çalışmaları yapılmıştır. Teşhisleri yapılan larva ve erginler için DNA analizleri yapılarak larva ve erginlere ait DNA dizileri eşlenerek larvalarda doğru teşhis yapılması sağlanmış ve larval karakterlerinde teşhiste kullanılması için anahtar karakterleri belirlenmiştir. *D. fructuum* ile ilgili yapılan bütün çalışmaların [25, 31, 32, 40, 41, 43-

47] ya *D. fructuum*'un gelişimi yada parazitoit komünitelerini belirlemek için olduğu düşünülürse çalışmanın önemi açığa çıkmaktadır. [27, 33, 38] gal arılarının parazitoitlerinin larval morfolojilerini çalışmakla birlikte bu türler arasında *D. fructuum*'a rastlanılmamıştır. Araştırmacıların çalıştığı türler içinde *Diplolepis* cinsine ait *D. mayri*, *D. rosae*, *D. nervosa*, *D. eglanteriae* ve *D. spinosissima* türlerinin parazitoitleri kullanılmıştır. *D. fructuum*'un çalışılmamış olması aslında *D. mayri* ile karıştırıldığı için çalışılmadığı anlamını taşımamaktadır. *D. mayri* ile *D. fructuum*'un karıştırılmasından dolayı *D. mayri*'nin parazitoitleri olarak verilen çalışmaların *D. fructuum* parazitoitleri olma olasılığını akılda tutmayı gerektirir. Bu türlerin larvalarının teşhislerinde kullanılan karakterler çalışmamızda da kullanılmış olup teşhislerde yararlanılmıştır.

Açılan gal odacıklarında parazitoitlerin *Stepanovia eurytomae* hariç larval parazitoit olduğu ve larvanın gelişimine bir süre daha izin vererek gelişimini tamamlayan koinobiont parazitoitler olduğu tespit edilmiştir. Gregarious parazitoit olan *Stepanovia eurytomae* dışında bütün parazitoitlerin soliter parazitoit olduğu görülmüş olup bu durum

literatür verileri ilede uygunluk göstermektedir [48, 49]. Aynı zamanda *Stepanovia eurytomae* yumurta-larval parazitoit olduğu görülmesi nedeni ile yumurta gelişimine izin vermediği gözlenmiştir.

Çalışmamızda parazitoit dışında predatör, inqulin vs gibi yaşam stratejilerine sahip türlere rastlanılmaması bölgede daha önce yapılan çalışma [32] ile uygunluk göstermektedir. Bu uygunluğa rağmen çalışmanın laboratuvar koşullarından başka arazi koşullarında da kafesleme vs. yöntemleri ile desteklenerek bu açığın kapatılmasının uygun olacağı yorumuna varılmıştır.

Larvaların tür düzeyinde teşhis edilmesinin sonucu olarak ve morfolojik olarak tanımlanan, ön teşhisleri yapılan *D. fructuum* parazitoitlerinin teşhisleri ve parazitoitlik durumları moleküler çalışmalarla desteklenmiş ve biyolojik mücadele çalışmaları için ön bir bilgi sunulmuştur.

Özellikle çok sayıda odacıklı bir gal oluşturan *D. fructuum*'ün parazitoitlerinin hepsinin ektoparazitoit olması yapılacak mücadele çalışmalarında kolaylık sağlayacaktır. Bilindiği üzere biyolojik mücadele çalışmalarının oluşturulmaları mücadele edilecek organizmanın karmaşık durumlarını belirlemede zor olması nedeni ile bu durum bertaraf edilmiş olacaktır.

TEŞEKKÜR

Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-406 nolu proje kapsamında desteklenen bu çalışma için Cumhuriyet Üniversitesine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1]. Nilsson O., Rosa Davis P.H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1997; 4: 106-128.
- [2]. Ercişli S. A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evaluation*, 2004; 51: 419-435.
- [3]. Ercişli S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa ssp.*) species. *Food Chem.*, 2007; 104: 1379-1384.

- [4]. Tapiero H., Tew K.D., Ba G.N., Mathe G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2002; 56: 200-207.
- [5]. Nakamura Y., Watanabe S., Miyake N., Kohno H., Osawa T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2003; 51: 3309-3312.
- [6]. Chai J.T., Ding Z.H. Nutrients composition of *Rosa laevigata* fruits. *Science Technology in Food Industry*, 1995; 3: 26-29.
- [7]. Uggla M., Gao X., Werlemark G. Variation among and within dog rose taxa (*Rosa sect. caninae*) in fruit weight, percentages of fruit flesh and dry matter, and vitamin C content. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B, Soil and Plant Science* 2003; 53: 147-155.
- [8]. Uggla M., Gustavsson K.E., Olsson M.E., Nybom H. Changes in colour and sugar content in rose hips (*Rosa dumalis* L. and *Rosa rubiginosa* L.) during ripening. *The Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology*, 2005; 80(2); 204-208.
- [9]. LaSalle J. North American genera of Tetrastichinae (Hymenoptera Eulophidae). *Journal of Natural History* 1994; 28: 109-236.
- [10]. Gauld I., Barry B. The Hymenoptera. Oxford University Press in association with British Museum (Natural History), 1988.
- [11]. Zerova M.D., Djakontshuk L.A. 'Gall wasp *Diplolepis mayri* Schlecht. and its parasites from the superfamily Chalcidoidea of the fauna of the USSR. *Entomological review* 1976; 55(1): 181-183.
- [12]. Godfray H.C.J. Parasitoids behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, New Jersey, 1994, ISBN 0-691-00047-6
- [13]. Loxdale H.D., Lushai, G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 1998; 88: 577-600.
- [14]. Heckel D.G. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 2003; 48: 235-260.
- [15]. Avise, J.C., Molecular Markers, Natural History, and Evolution, pp. 684. Sinauer

- Associates, Sunderland, Massachusetts. 2004; pp.684
- [16].Saiki, R. Scharf, S. Faloona, F. Mullis, K. Horn, G. ve Erlich, H., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-54.
- [17].Mullis, K. Faloona, F. Scharf, S. Saiki, R. Horn, G. ve Erlich, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51: 263-73.
- [18].Mullis, K. ve Faloona, F., 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- [19].Mullis, K., 1990, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4): 56-65.
- [20].Caterino, M.S. Cho, S. ve Sperling, F.A.H., 2000, The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*, 45: 1-54.
- [21].Hebert, P.D.N. Cywinska, A. Ball, S.L. ve deWaard J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270 (1512): 313-321
- [22].Shokralla, S. ve Ark., 2011, Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, 6 (7): e21252.
- [23].Hillis, D.M. ve Dixon, M.T., 1991, Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.*, 66:411-454.
- [24].Hoy, M.A. , 2003, Insect Molecular Genetics, edition two, *Academic Press/Elsevier*, San Diego. 560 pp
- [25].Pujade-Villar, J. ve Plantard, O., 2002, About the validity of *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen) and some new synonyms in *Diplolepis nervosa* (Curtis) (Hymenoptera: Cynipidae: Diplolepidini). En: *Parasitic Wasps: Evolution, Systematics, Biodiversity and Biological Control*. Agroinform. Budapest: 135-142.
- [26].Lotfalizadeh, H. Jean-Yves, R. ve Gérard. D., 2007), Rose gall wasps and their associated fauna (Hymenoptera) in Iran. *Redia* 89, 73-85.
- [27].Lotfalizadeh, H. Mojtaba, R. ve Seyed Massoud, M., 2012, Parasitoid community of *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen) (Hym.: Cynipidae) in Kerman Province, with checklist of associated Hymenoptera fauna in Iran. *North-Western Journal of Zoology* 8.(1), 125-131.
- [28].Gómez, J.F. José Luis, N.A. ve Nieves, M.H., 2012, Comparative morphology, biology and phylogeny of terminal-instar larvae of the European species of Toryminae (Hym., Chalcidoidea, Torymidae) parasitoids of gall wasps (Hym. Cynipidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 154.(4), 676-721.
- [29].Güçlü, S. ve Ark. , 2008, Gall-inducing wasps of the genus *Diplolepis* (Hymenoptera: Cynipidae) on shrub roses of Turkey. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 110(1), 204-217.
- [30].Katılmış, Y. ve Kiyak, S., 2010, Distribution, Phenology and Effects of *Diplolepis spp.*(Hymenoptera: Cynipidae) on *Rosa canina* in the Inland Western Anatolian. *J. Entomol. Res. Soc* 12.(2), 31-36.
- [31].Mete Ö. ve Mergen Y.O., 2016, The community members associated with rose gall wasp *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) (Hymenoptera: Cynipidae) in Tokat Province of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 40.
- [32].Gençer, L., 2003, Sivas' ta Kuşburnu (*Rosa canina*)'nda zarar yapan *Diplolepis mayri* Schld.(Hymenoptera: Cynipidae)'nin Chalcidoid parasitoidleri. *Turkish Journal of Entomology* 27.2.
- [33].Gómez, J.F. José Luis, N.A. ve Nieves, M.H., 2007, Comparative Morphology, Biology and Phylogeny of Terminal-Instar Larvae of the European Species of Toryminae (Hym., Chalcidoidea, Torymidae) Parasitoids of Gall Wasps (Hym. Cynipidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154: 676-721.
- [34].Grissell, E.E., 1995, Toryminae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Torymidae) A Redefinition. Generic Classification, and Annotated World Catalog of species. *Memoirs*

- on Entomology. International. Associated Publisher. Gainesville: 470 pp.
- [35]. Noyes J.S. Interactive Catalogue of Word Chalcidoidea 2001, Compact disk. Taxapod, Vancouver, Canada 2002.
- [36]. Tormos J. ve Ark., Descriptions of the Final instar of *Eurytoma nodularis* and *E. heriadi* (Hymenoptera: Eurytomidae)'. *Florida Entomologist* 2004; 87(3): 278-282.
- [37]. Viggiani G., Nugnes F. Description of the larval stages of *Dryokosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), with notes on their phenology. *Journal of Entomological and Acarological Research* 2010; 42.(1): 39-45.
- [38]. Gómez, J.F., Jose Luis N.A. Notes on the larval morphology of Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) species parasitoids of gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) in Europe. *Zootaxa* 2012; 3189: 39-55.
- [39]. Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Gren P. Department of Molecular Biotechnology, University of Washington, Seattle, 1998 Washington USA.
- [40]. Kılincer N., Ankara'da Gül Gal Arıları (*Rhodites spp.*)'nin (Hym: Cynipidae) Parazitleri Üzerine Araştırmalar. *Türk. Bitki Kor. Bült.*, 1983; 23(1): 1-10.
- [41]. Ozbek H., Güçlü Ş., Tozlu G., Erzurum'da Kuşburnu (*Rosa canina* L.)'nda Zarar Yapan *Diplolepis mayri* Schld.(Hymenoptera: Cynipidae)'nin Biyolojisi ve Doğal Düşmanları, *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 1999; 23(1): 39-50.
- [42]. Ozbek H., Güçlü Ş., Tozlu, G. *Oltu ve Çevre İlçelerde Kuşburnu ve Önemli Zararlıları. Geçmişten Geleceğe Oltu ve Çevresi Sempozyumu*, 1-3 Temmuz, Oltu (Erzurum), 1998; 567-576.
- [43]. Vårdal, H., 2004, From Parasitoids to Gall Inducers and Inquilines: Morphological Evolution in Cynipoid Wasps. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 932. 41 pp. Uppsala. ISBN 91-554-5861-0.
- [44]. Daneshvar S., Ali T., Yaghoob F. The wasps associated with seeds and galls of *Rosa canina* in Iran. *Advances in Environmental Biology*. 2009; 3(1): 61-68.
- [45]. Lotfalizadeh H. Reyhaneh E.T., Ashkan M.Y. *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen)(Hym.: Cynipidae) a new host for *Exeristes roborator* (Fabricius)(Hym.: Ichneumonidae) in Iran. *North-Western Journal of Zoology* 2009; 3.(2): 171.
- [46]. Katılmış Y., Kıyak S. Further Study on *Perichstus Brandtu* (Ratzeburg, 1831) (Hymenoptera, Cynipidae) From Turkey. *Entomological News* 2012; 122.(1): 51-54.
- [47]. Mete Ö., Demirsoy A. A preliminary study on the gallwasp fauna of Kemaliye (Erzincan, Turkey) and a new record for Turkey. *Hacettepe J Biol Chem Special Issue* 2012; 351-363.
- [48]. Graham M.W.R., de V. Gijswijt M.J. Revisin of European species of *Torymus Dalman* (s. Lat) (Hymenoptera: Torymidae). *Zoologische Verhandelingen*, 1998; 317: 1-202.
- [49]. Noyes J.S., Chapter 11 Hymenoptera (wasps). 11.5. Encyrtidae (Chalcidoidea)'. The Greenland Entomofauna: An Identification Manual of Insects, Spiders and their Allies, 2015, 170-176 (Eds: Böcher, J.; Kristensen, N.P.; Pape, T.; Vilhelmsen, L.) Brill, Leiden and Boston.