

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**KUZEYDOĞU ANADOLU YÖRESİNDE *SIMULIUM* TÜRLERİNİN DNA
BARKODLAMASI ve FİLOGENETİK KLASİFİKASYONLARI**

Proje No: TSA-2015-6011

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Zuhall ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD

Araştırmacının Adı Soyadı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Prof. Dr. Mükrem ÖZKAN ASLAN
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Doç. Dr. Barış SARI
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Yrd. Doç. Dr. Gencay Taşkın TAŞÇI
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Araş. Gör. Dr. Arif ÇİLOĞLU
ERÜ Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Araş. Gör. Nilgün PARMAKSIZOĞLU AYDIN
Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi/ Parazitoloji ABD
Prof. Dr. Peter H. ADLER
Clemson University/ Agricultural and Environmental Sciences

EKİM 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, bu çalışmaya TSA-2015-6011 kod numaralı proje ile maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
KAPAK	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ/AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Simulium</i> Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri.....	2
2.2. <i>Simulium</i> Türlerinin Morfolojisi	3
2.3. Yaşam Döngüsü	4
2.3.1. Yumurta.....	5
2.3.2. Larva	6
2.3.3. Pupa.....	7
2.3.4. Ergin.	8
2.4. Üreme	9
2.5. Beslenme	9
2.6. <i>Simulium</i> Türlerinin Vektörlük Roller ve Çevresel Önemleri	10
2.7. Türkiye’de Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Konvansiyonel Çalışmalar	11
2.8. Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar	12
2.8.1. Dünyadaki moleküler çalışmalar.....	12
2.8.2. Türkiye’deki Moleküler Çalışmalar.....	14
2.9. <i>Simulium</i> Türleri İle Mücadele	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Araştırma Yöresi ve Simuliid larva örneklerinin toplanması	16
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	18

3.2.1. Morfolojik İdentifikasyon.....	18
3.2.2. Kromozomal Analiz.....	18
3.2.3. Genomik DNA Ekstraksiyonu	18
3.2.4. Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi.....	19
3.2.5. Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu.....	19
3.2.6. Mt-COI Gen Bölgesinin Sekansı ve Filogenetik Analizi	23
4. BULGULAR	24
4.1. Morfolojik ve Kromozomal İdentifikasyon Sonuçları.....	24
4.1.1 Morfolojik Analiz.....	24
4.1.2 Kromozom analizi.....	27
4.2. Moleküler Analiz Sonuçları	28
4.2.1. Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	28
4.2.2. Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR.....	44

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Çalışma odakları ve GPS özellikleri	16
Tablo 4.1. Toplanan larvaların çalışma odaklarına göre dağılımları.....	24
Tablo 4.2. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik identifikasyon sonuçları.....	24
Tablo 4.3. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin kromozomal identifikasyon sonuçları.....	28
Tablo 4.4. Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları.....	30
Tablo 4.5. Mt-COI sekansları sağlanan <i>Simulium sp.</i> izolatlarının nükleotid kompozisyonları.....	31
Tablo 4.6. <i>Simulium sp.</i> izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları.....	34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	<i>Simulium</i> türlerinin sistematikteki yeri	3
Şekil 2.2.	<i>Simulium</i> sp. morfolojisi.	4
Şekil 2.3.	<i>Simulium</i> türlerinin hayat siklusu.....	5
Şekil 2.4.	<i>Simulium</i> sp. yumurtası	6
Şekil 2.5.	<i>Simulium</i> sp. larvası	7
Şekil 2.6.	<i>Simulium</i> sp. pupası	8
Şekil 2.7.	Ergin <i>Simulium</i> sp	9
Şekil 3.1.	Çalışma odakları	17
Şekil 3.2.	Aktaş ve Yumaklı Odağı (Tortum, Erzurum)	17
Şekil 3.3.	Balçesme ve Boğatepe Odağı (Göle-Ardahan, Kars).....	17
Şekil 3.4.	pJET1.2/bluntCloningVector.....	20
Şekil 3.5.	Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları.....	22
Şekil 4.1.	<i>Simulium</i> larvası.....	25
Şekil 4.2.	<i>Simulium</i> sp. pupa genel görünümü	26
Şekil 4.3.	<i>Simulium</i> larvalarının genel görünümü.....	26
Şekil 4.4.	<i>Simulium</i> sp. pupa genel görünümü.....	27
Şekil 4.5.	<i>Simulium</i> larva ve pupalarına ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü.....	28
Şekil 4.6.	Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü.....	29
Şekil 4.7.	LB katı besi yerinde üreyen 1. ve 2. inkübasyon basamakları sonucu oluşan koloniler.....	29
Şekil 4.8.	Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü.....	30
Şekil 4.9.	<i>Simulium</i> sp. türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....	33
Şekil 4.10.	<i>Simulium</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri.....	36

KUZEYDOĞU ANADOLU YÖRESİNDE *SIMULIUM* TÜRLERİNİN DNA BARKODLAMASI VE FİLOGENETİK KLASİFİKASYONLARI

ÖZET

Bu çalışma, Kuzeydoğu Anadolu yöresinde *Simulium* salgınları ve simulitoksikozis olgularının rapor edildiği odaklarda simuliid türlerinin moleküler karakterizasyonlarını ve filogenetik yapılanmalarını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Haziran-Eylül 2015 tarihleri arasında çeşitli akarsulardan toplam 150 adet simuliid larva ve pupa örnekleme yapılmıştır. Örneklerin morfolojik (pupa) ve kromozom (larva) analizleriyle tür identifikasyonları ABD Clemson Üniversitesi Entomoloji Departmanında gerçekleştirilmiştir. Larva ve pupalardan bireysel olarak genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur. Pozitif izolatlar ait ampliconların PCR primerleri ile klonlanıp plazmid pürifikasyonundan sonra sekans analizleri gerçekleştirilmiş ve filogenetik yapılanmaları araştırılmıştır. Elde edilen izolatlar GenBank veritabanına KX673578-603 ve KX689258-59 aksesyon numaraları ile kaydedilmiştir. Morfolojik ve kromozomal analizlerle *Simulium kiritshenkoi* kompleks, *S. venum*, *S. bergi*, *S. equinum* ve *S. paraequinum* türleri identifiye edilmiştir. Simuliid türler içerisinde analizlere dâhil edilen izolatlar ait nükleotid sekanslarında 25 farklı haplotipi ortaya koyan 159 polimorfik bölge saptanmıştır. *S. kiritshenkoi*, *S. venum*, *S. bergi*, *S. equinum*, *S. paraequinum* ve *S. bergi* türlerinin ayrımı için mt-COI barkodlamasının efektif bir marker olduğu belirlenmiştir. İlgili türlere ait izolatların dünyanın farklı bölgelerinden bildirilmiş homologlarıyla birlikte küme oluşturarak monofiletik karakterli oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez Kuzeydoğu Anadolu yöresinde pest karakteri gösteren *Simulium* türlerinin morfolojik, kromozomal ve genetik karakterizasyonları yapılarak moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Ayrıca çalışma ile *S. venum* türünün Türkiye'deki varlığı ilk kez moleküler düzeyde ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: *Simulium*, DNA barkodlama, Moleküler Klasifikasyon, Kuzeydoğu Anadolu Yöresi

DNA BARCODING AND PHYLOGENETIC CLASSIFICATIONS OF *SIMULIUM* SPECIES IN NORTHEASTERN ANATOLIA REGION

ABSTRACT

This study was conducted to reveal the molecular characterizations and phylogenetic structures of simuliid species at the foci where *Simulium* outbreaks and simuliotoxicosis cases are reported in North East Anatolia region. For this aim, a total of 150 simuliid larvae and pupae were sampled from various rivers between June and September 2015. Species identification by morphological (pupa) and chromosome (larva) analysis of samples was carried out in the Entomology Department of Clemson University, USA. Individual genomic DNA extraction from larvae and pupae was carried out and the obtained DNAs were performed to PCR analyzes with specific primers amplifying the partial mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) gene region. Amplicons from positive isolates were cloned with PCR primers and sequence analysis was performed after plasmid purification and phylogenetic constructs were investigated. The obtained isolates were recorded in the GenBank database with accession numbers KX673578-603 and KX689258-59. *Simulium kiritshenkoi* complex, *S. vernum*, *S. bergi*, *S. equinum* and *S. paraequinum* species from totally 100 larvae and 50 pupae samples were identified with morphological and chromosomal analysis. Within the simuliid species, 159 polymorphic regions revealed 25 different haplotypes in the nucleotide sequences of the isolates were detected. Mt-COI barcoding are effective markers in difference of *S. kiritshenkoi*, *S. vernum*, *S. bergi*, *S. equinum* and *S. paraequinum* species. It has been found that isolates are clustered together with their homologues reported from different regions of the world and are monophyletic.

In conclusion, molecular epidemiologic data with morphological, chromosomal and genetic characterization of *Simulium* species showing pest character in North Eastern Anatolia region were obtained for the first time with this study.

In addition, the study revealed that the presence of *S. vernum* in Turkey for the first time at the molecular level.

Key words: *Simulium*, DNA barcoding, Phylogenetic Classification, Northeastern Anatolia

1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM

Diptera dizisi, Nematocera dizi altı ve Simuliidae ailesinde yer alan karasinekler kanatlı ve evcil hayvanlar ile insan sağlığını tehdit etmelerinin yanında ekonomik ve ekolojik bakımdan da önemli insektlerdir (4). Simuliidae ailesindeki türlerin morfolojik identifikasyonları oldukça kompleks olup, beraberinde bir takım teşhis hatalarına yol açabilmektedir. Aynı zamanda birçok simuliid türünde görülebilen cryptic ve kardeş (sibling) türlerin belirlenmesi morfometrik analizlerle mümkün değildir. Bu açıdan simuliid türlerin identifikasyon ve klasifikasyonunun yanında cryptic ve sibling türlerin belirlenmesinde sitogenetik kromozomal analizler ve çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgelerinin filogenetik analiz çalışmaları bulunmaktadır.

Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi, Kars, Ardahan, Iğdır, Ağrı ve Erzurum nispeten de Gümüşhane, Bayburt ve Artvin'i içine alan bir bölgedir. Bölge dağlık olup hayvancılık için oldukça elverişlidir. Aynı zamanda bölgede bulunan Palandöken dağlarında kış sporlarının yapılması ve dünyanın hemen her bölgesinden birçok yabancı turistin bölgeye gelmesi bu sineklerin vektörlüğünü yaptığı çeşitli patojenler ve oluşturdıkları risk potansiyeli açısından oldukça önemlidir. Ergin dişi karasinekler yaşam döngülerini tamamlamak için insan, kanatlı ve memelilerden kan emmektedirler. Böylece insan ve diğer hayvanlar üzerinde sömürücü, toksik, travmatik ve irkiltici etkilerinin yanında çeşitli viral, bakteriyel ve paraziter bazı hastalıklara vektörlük etmektedirler. Simuliid karasinekler tarafından insanlara nakledilen en önemli parazitler *Onchocerca volvulus* ve *Mansonella ozzardi* türü nematodlar olup, kanatlılara ise *Leucocytozoon* enfeksiyonunu bulaştırmaktadırlar. Sayıca çoğalmaları durumunda ortaya çıkan salgınlar, insan ve hayvan sağlığını tehdit etmenin yanında, onların psikolojilerini bozmakta ve tarım başta olmak üzere turizmi de engelleyerek ciddi boyutlarda ekonomik kayıpların sebebi olmaktadır (95).

Bu projede Kuzeydoğu Anadolu yöresinde simulitoksikozis olgularının görüldüğü odaklar başta olmak üzere yaygınlık gösteren simuliid türlerinin larval identifikasyonları ve mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgesine göre barkodlamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenen tüm izolatlar ilgili gen bölgesi sekanslarına göre tür ve/veya haplotip bazında karakterize edilmiş ve GenBank veri tabanına kaydedilerek barkodlanmaları sağlanmıştır. Karakterizasyonları sağlanan *Simulium* soyuna ait izolatların GenBank veri tabanında Türkiye'de ve Dünyanın farklı bölgelerinden kayıtları sağlanmış homolog izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Simulium* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

Diptera dizisi içerisinde *Nematocera* dizi bölümünde yer alan ve dünyanın her bölgesinde görülebilen önemli ailelerden birisi de *Simuliidae* (Karasinekler, Blackflies) ailesidir. *Simuliidae* ailesinde 26 soy içerisinde (Şekil 1) bu güne kadar 2232'si yaşayan, 15'i ortadan kalkmış (fossil) toplam 2247 tür tarif edilmiş ve bunların 1842'si *Simulium* soyunda yer almıştır (4). Bu türlerin çoğunda dişilere dünyanın çeşitli bölgelerinde yerel halk tarafından değişik isimler [Buffalo Gnats (İngiltere), mawi (Afrika), pium veya borrachudos (Brezilya), potu (Hindistan), jejenes (Venezuela), bocones (Kosta Rika), rodadores (Küba), karasinek, kanbur sinek, mucuk veya üvez (Türkiye)] verilmiştir.

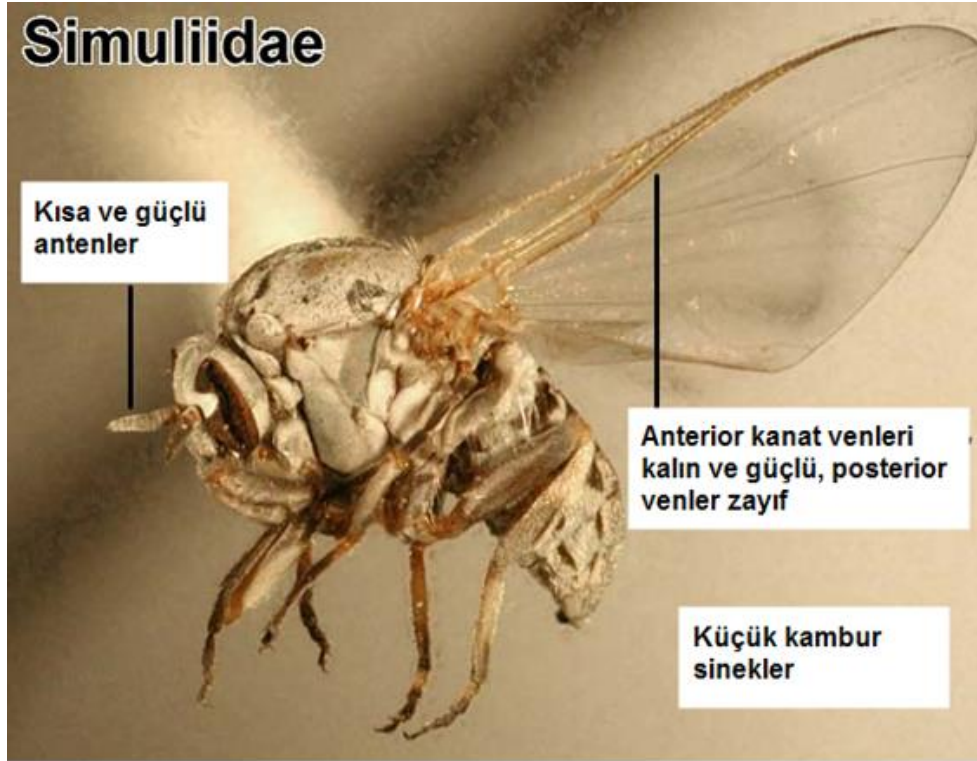


Şekil 2.1. *Simulium* türlerinin sistematikteki yeri (4).

2.2. *Simulium* Türlerinin Morfolojisi

Simuliidler; küçük, esmer, kalın vücutlu, kambur sırtlı nematocerlerdir. Simuliidler dışarıda yaşarlar (exophilic) ve dışarıda beslenirler (exophagic). Kanat uzunlukları 1,5-6 mm'dir ve genellikle gündüzcü sineklerdir. Dişilerde tek tek elementlerden oluşmuş (ommatidia) olan gözler küçük ve antenlerin dorsalinde ayrı olarak yer almıştır. Erkeklerde ise gözler daha geniş ve antenlerin dorsalinde bitişiktirler. Antenler her iki cinsten de aynıdır ve genellikle 11

segmentlidirler. Palpler 5 segmentli olup kısa olan hortumdan oldukça uzundurlar. Kanatlar kısa, geniş, pulsuz, beneksiz ve parlaktır. Ven dolaşımı kanadın ön kenarı boyunca uzanan iyi gelişmiş radial venlerle karakterizedir. Zayıf görünümüne rağmen kanatlar oldukça güçlüdürler. Bu sayede uzak mesafelere uçuş yeteneği kazanmışlardır. Durgun havalarda 100 km'den fazla uçabilirler. Etkin uçuş alanları 18 kilometrelik çap içerisinde (7, 66).



Şekil 2.2. *Simulium* sp. morfolojisi

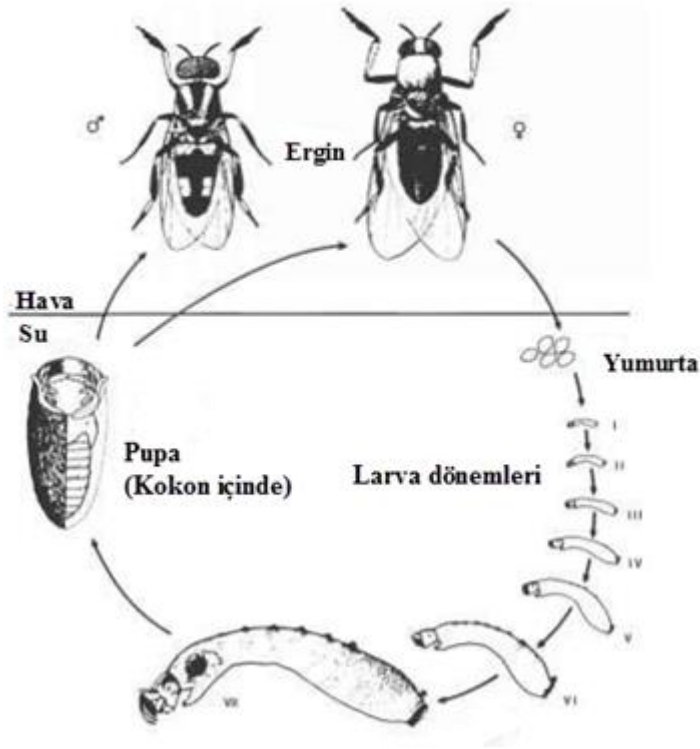
(<http://www.entomology.umn.edu/museum/links/coursefiles/Nematocera%20characters.html>)

2.3. Yaşam Döngüsü

Karasineklerin pek çok türünde yaşam siklusunda farklılıklar bulunmaktadır. Simuliidlerin larva dağılımına mevsim ve suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri etki etmektedir. Fiziksel özellikleri arasında suyun akıntı hızı, sıcaklık, bulanıklık ve su içinde bulunan maddeler, kimyasal özellikleri arasında ise suyun oksijen miktarı, pH'sı, elektriksel iletkenliği, azot ve fosfor miktarı yer almaktadır.

Yumurtalarını genellikle 30-800 arasında, ortalama 200-300'lük gruplar halinde akan suların kenarlarına ya da direkt olarak suyun içine bırakırlar (7, 34, 86).

Simulium türlerinin yaşam siklusu Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3. *Simulium* türlerinin hayat siklusu (14)

2.3.1. Yumurta

Ergin sinekler ovipardırlar. Yumurtalarını yavaş akan, oksijenden zengin hafif alkali sulara bırakırlar. Yumurtalar, önce krem-beyaz, sonra embriyonal gelişim ile birlikte siyaha yakın bir renge dönüşürler (Şekil 2.4). Yumurtalar, 100-400 µm uzunluğunda ve oval-elipsoid veya üç köşelidirler. Yüzeyleri düzdür. Gözle görülebilir yumurta kabuğu iç yumurta membranı ve endokoryondur ya da çok az koryonik plastron gelişmiştir (34, 86). Yumurtalarını oksijen basıncının yüksek olduğu akıntılı suların yüzeylerine toplu halde bırakırlar ve bırakılan yumurtalar da iyi gelişmiş bir plastrona gereksinim yoktur. Sonbaharın sonlarında bırakılan yumurtalardan takip eden baharda su sıcaklığı yükselene kadar larva çıkışı olmaz. Simuliid yumurtaları kuruluğa karşı hassastırlar. Uzun aylar nemli ortamlarda kalabilirler (7, 34, 86).

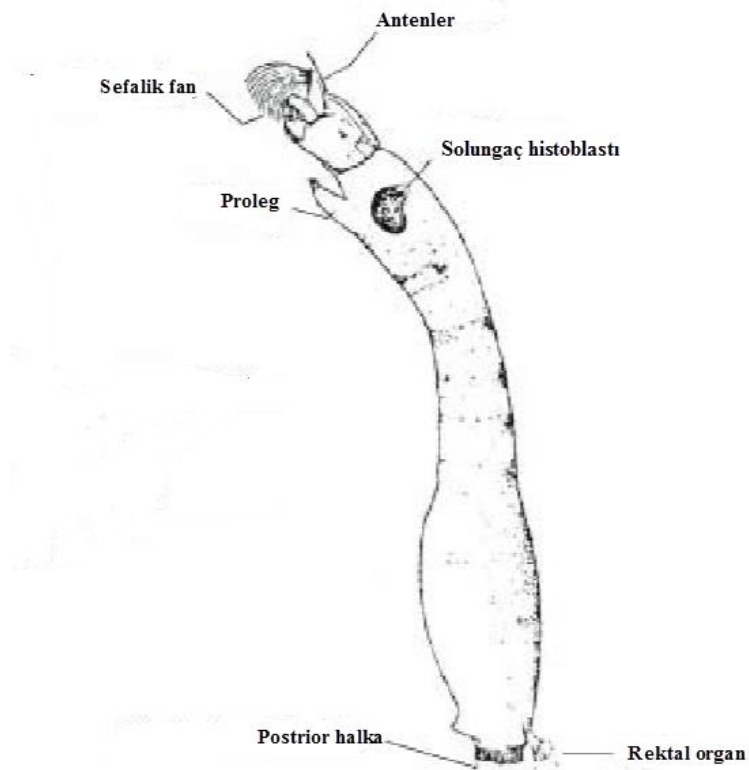


Şekil 2.4. *Simulium* sp. yumurtası (**Kaynak:** <http://cal.vet.upenn.edu/projects/paralab/labs/lab8.htm>)

2.3.2. Larva

Çevre ve suyun sıcaklığına bağlı olarak yumurtalardan 4-5 günde larvalar çıkar. Larvalar kurtçuk şeklinde silindirik yapıdadır (Şekil 2.5). Yumurtadan çıkan larva kuyruk emicisi (*sucker*) ile taş, kütük veya su bitkileri gibi herhangi bir objeye tutunur ve ipeksi ipliği ile ıslanmaktan korunur. Larvalarda bir çeşit filtre görevi yapan bir çift ağız fırçası (sefalik fan) bulunur.

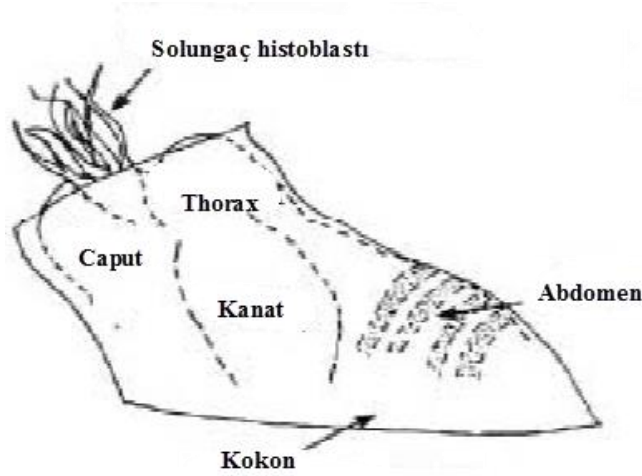
Larva, kendi yaşamını sürdürüp yerleşebileceği bir yer bulur ve orayı ipek bir ağ ile (zarla) örmeye devam eder. Aynı zamanda larvalar maddelere tutunmak için bol miktarda protein yapıştırıcı da üretirler. Larvalar su yüzeyine yakın kalırlar. Hızlı akımın olduğu çok büyük nehirlerde larvalar birkaç metre derinlikte bulunabilirler. Larvalar bir çift basit göz, sklerozite başı ve kum saati gibi uzamış vücuda sahiptir. Vücutları 90°-180° bükülme hareketi yapar. Baş kısmında yelpaze taşımaktadır. Larvalar genellikle 10-100 µm büyüklüğündeki organik besinlerle (mikroorganizmalar, Örn: Bakteriler) beslenirler. Bunlar su akımının hızlandığı yerlerde daha çok bulunmaktadır (7, 34, 86).



Şekil 2.5. *Simulium* sp. larvası (**Kaynak:** <http://dc347.4shared.com/doc/VFKoXT5t/preview.html>)

2.3.3. Pupa

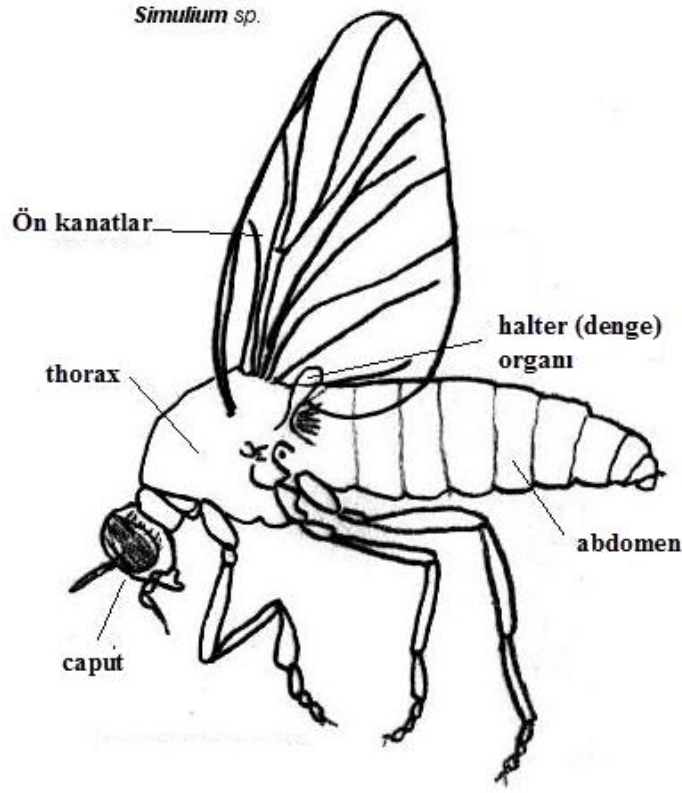
Son larva döneminden sonraki gelişim evresidir. Pupalarda çoğunlukla bir kokon içinde bulunur. Pupanın başı ve toraksı tek bir parça halinde yani sefalotoraks içinde birleşmiştir ve segmentli bir karın bulunmaktadır (Şekil 2.6). Toraks, dikenleri ve koza iplikleri ile ilgili kancaları oluşturur ve pupa yerinde kalır. Sefalotoraks kozanın akım yönüne doğru yer değiştiren bir çift uzamış dallara ayrılmış solungaçlar taşır. Genç pupalarda vücut rengi açık renkli iken pupa gelişimi ile birlikte renk koyulaşarak olgun pupalarda siyah bir renk alır. Beslenmeyen pupa, içinde yetişkin geliştiğinden gitgide kararır. Pupa kabukları dağıldığında yetişkin hava akımıyla sürüklenir ve hemen uçmaya başlar (7, 34, 86).



Şekil 2.6. *Simulium* sp. pupası (Kaynak: <http://dc347.4shared.com/doc/VFKoXT5t/preview.html>)

2.3.4. Ergin

Simulium erginleri tıknaz vücutlu, geniş kanatlara, kısa antenlere ve kısa bir proboscise sahiptir (Şekil 2.7). Pupadan ergin sineklerin çıkması, genellikle ve çoğunlukla ılık ve ısıya bağlı olarak gündüz olmaktadır. Pupadan erginlerin çıkışı, hava sıcaklığı 24-28 °C aralığında ve su sıcaklığı en düşük 8 °C iken olmakta ve 9.00-12.00 saatleri arasında pik seviyeye ulaşmaktadır (7, 34, 86). Simuliidae ailesinde bulunan sineklerin erkekleri bitki özsuları ile beslenirken dişileri uçmaları için gerekli olan enerjiyi bitki özsularından karşılamakta ve yumurtlama döngülerini tamamlamak için de insan ve sıcakkanlı hayvanlardan kan emmektedirler (14, 22).



Şekil 2.7. Ergin *Simulium* sp. (Kaynak: <http://www.bumblebee.org/invertebrates/DipteraA.htm>)

2.4. Üreme

Karasinekler hızlı akan sularda, barajlardan bırakılan sularda, özellikle hidro elektrik barajlarında tribünlerden çıkan sularda ve dağlardan nehlere akan su kesimlerinde üremektedirler. Simuliidae ailesi üyeleri holometabol gelişim gösterirler. Ergin sinekler üreme yerlerinde birbirlerine yaklaşırlar ve çiftleşme yerde şekillenir. Simuliidler ovipardırlar. Erkek simuliidler dişileri 50 cm uzaktan tanıyabilir ve çiftleşmek için onlara yönelirler. Döllenmiş dişiler sürüler halinde gün batımı ve karanlığın başladığı zaman aralığındaki kısa sürede yumurtalarını akışkan olan su üzerindeki otlara ve yaklaşık 30-800 kadar yumurta bırakırlar. Bazı türler ise cm^2 'ye 2000-3000 yumurta bırakabilmektedir. (7, 34, 86).

2.5. Beslenme

Simulium spp. dişileri gündüzleri konaklarından kan emmek için saldırırlar. Bazı türler, vücudun burun, kulak ve göz gibi organlarına girmek isterler. Bu özellikleri insanları ve evcil hayvanları rahatsız eder. Erkekleri ise bitki özsuğu ile beslenirler. Dişi simuliidler çoğu yumurtaların gelişimi için kan emmeye ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla insan ve birçok memeliden

kan emebilirler. Erkekler ise bitki nektarı ile beslenirler. Bu sinekler özellikle gündüz 9.⁰⁰ - 17.⁰⁰ saatleri arasında maksimum aktivite gösterirler. Kan emen dişilerin ömrü 30 güne kadar uzarken bitki özsuğu ile beslenen erkekler ortalama 10 gün yaşarlar (7, 34, 86).

2.6. *Simulium* Türlerinin Vektörlük Roller ve Çevresel Önemleri

Simuliidler bizzat kan emerek zarar vermeleri yanında, pek çok patojeni de naklederler. Bu şekilde patojenlere vektörlük yapmaları medikal ve veteriner önemlerini daha da artırmaktadır. Bu sinekler insan ve hayvanların ağız, burun delikleri, gözleri, kulakları başta olmak üzere vücudun değişik bölümlerine saldırarak rahatsızlık verirler. Çok az ses çıkarırlar ancak, aydınlanmış ortamlarda derhal derinin üzerine konarak kan emerler. Genellikle çok sayıda ortaya çıkarlar, kümes hayvanları ve diğer çiftlik hayvanlarına sürüler halinde saldırarak hayvanların solunum yollarını tıkayarak ve/veya toksinleri (similotoksikozis) ile ölümlere sebebiyet verebilirler. Bu sineklerin sokmaları oldukça irritatiftir. Vücudun açıkta kalan bölümlerini, özellikle yüz ve boyun bölgelerini sokarlar. Simuliid karasinekler tarafından insanlara nakledilen en önemli parazitler *Onchocerca volvulus* ve *Mansonella ozzardi* türü nematodlardır. Bu türler, dünyanın Afrotropikal ve Netropikal bölgelerinde yaklaşık 17 milyon insanın yakalandığı “onchocerciasis veya nehir körlüğü” olarak bilinen hastalıktan sorumludurlar. Bunun yanında kanatlılara *Leucocytozoon* enfeksiyonunu bulaştırırlar. Simuliidler kan emerek yaptıkları parazitliğin yanında *Onchocerca volvulus*, *O. gutturosa*, *O. cervipedis*, *O. dukei*, *O. lienalis*, *O. ochengi*, *O. ramachandrini*, *O. tarcicola*, *Dirofilaria ursi*, *Splendidofilaria fallisensis*, *Mansonella ozzardi*, *Trypanosoma avium*, *Try. confusum*, *Try. corvi*, *Try. numidae*, *Leucocytozoon anatis*, *L. smithi*, *L. caulleryi*, *Hemoproteus nettionis* türleri gibi parazitlerin yanında çeşitli viral (Arbovirus) ve bakteriyel patojenlerin de vektörlüğünü yaparlar (4, 7, 34, 86).

Tıbbi önemlerinin yanında, Simuliidler akarsu ekolojisinin temelini oluştururlar. Zira bu sineklerin aquatik gelişim evreleri (larva) bulundukları sudaki çözünmeyen organik maddelerin filtrasyonunu sağlayarak besin zincirinde suyun içilebilir hale gelmesine katkıda bulunurlar. Karasinekler, temiz su kaynaklarının çevre kirliliğine karşı düzenli kontrollerinde de çok önemlidirler. Çünkü aquatik gelişim evreleri nehirler gibi temiz su yataklarının organik ve inorganik kontaminantlara (örn., şeker fabrikası atıkları, çiftliklerden gelen hayvansal atıklar, tarıma açık ekilip biçilen alanlardan çevreye yayılan zirai mücadele ilacı insektisitler ve gübreler) karşı oldukça duyarlıdırlar. Karasinekler, ayrıca morfolojik olarak türlerin

oluşumunun ve retikulat evrimin anlaşılmasında korunumlu özel bir evrimsel öneme sahiptirler (4, 7, 34, 86).

Simuliidae, morfolojik olarak oldukça homojen bir ailedir. Bu sinekler, medikal ve veteriner önemleri oldukça yüksek olmasına karşın genellikle ihmal edilmişlerdir. Simuliidlerin taksonomisinde çeşitli problemler vardır. Öncelikle dünya üzerinde halen çeşitli bölgesel Simuliid faunalar hakkında bilgiler yetersizdir. Yeni bulunduğu alanlarda bunlarla ilgili olarak bio farklılık araştırmalarına ve revizyoner çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bunun yanında hali hazırda supraspesifik klasifikasyon stabil olmayıp problemlidir. Birçok tür veya tür grupları yanlış soylarda klasifiye edilmektedir (4, 7, 34, 86).

Çeşitli kan emici Diptera türlerinde beslenme için konak tercihi çeşitli enfeksiyözler için risk faktörlerinin ortaya konulmasında önemli olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla kanatlı, memeli ve diğer omurgalılara spesifik mitokondriyal gen bölgelerini çoğaltan primerler kullanılmaktadır (45, 56).

2.7. Türkiye’de Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Konvansiyonel Çalışmalar

Türkiye’de günümüze kadar simuliid sinekler ve onların etkileri üzerine yapılmış kapsamlı çalışmalar çok sınırlıdır. Bununla birlikte, 1994 yılı ilkbaharında Erzurum’un bazı ilçelerinde sığırların günün güneşli saatlerinde küçük karasinek saldırıları sonucu yaklaşık 100 hayvanın öldüğü vakada, sığırlara saldıran ve ölüme sebep olan küçük karasineklerin Almanya’da yapılan laboratuvar teşhisleri sonucu *Tetisimulium bezini* (Corti) (= *T. condici* Baranov) (Diptera, Simuliidae) olduğu ortaya konmuştur (67). Daha sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bir kadına ait idrar örneğinde *Simulium* sp. larvası bildirilmiştir (9). Arslan ve Temur (10) ise 2005 yılı Nisan ayı ortalarında Tortum İlçesi Aktaş ve Yumaklı Köylerinde sığırlarda sinek sokması sonucu, erkeklerin prepusyumlarının ve çene altlarının şiştiği, dişi hayvanlarda çene altı ödeme birlikte memelerde yaygın Peteşilerin olduğunu ve gebe olan bir ineğin yavru attığını rapor etmişlerdir. Türkiye’nin *Simulium* faunasına katkı sağlayacak sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiştir (11, 18, 23, 29, 30, 50-53, 67, 88, 95, 97). Bu çalışmalardan Kazancı ve Cleargue-Gazeau (50), Türkiye’de Simuliidae faunası üzerine ilk detaylı çalışmayı yapmışlar ve 22 tür (20’si yeni kayıt) rapor etmişlerdir. Takiben Cleargue-Gazeau ve Kazancı, (18) Türkiye’de 26 türü (7’si yeni kayıt) bildirmişlerdir. Balık ve ark., (11), Dikili-Ayvalık yöresinde Yelköprü mağarası ve civarının sucül faunasının tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada *Eusimulium angustitarse*’yi rapor etmişlerdir. Şirin ve Şahin (88), Sakarya Nehir Havzası’nda 23 türü (10’u yeni kayıt)

rapor etmişlerdir. Crosskey ve Zwick (23), Türkiye'nin Anadolu bölümünde 9 yeni türü tarif etmişlerdir. Yine Zwick (97), daha önce kaydedilmiş türlerin yeni istasyonlardan kayıtlarını vermiştir. Kazancı ve Ertunç (51), Türkiye Simuliidae faunasına ilişkin 19 türü (5'i yeni kayıt) ve bu türlerin bazı ekolojik özelliklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (52), Türkiye'nin kuzey, batı ve güneyinden topladıkları örneklerde 15 tür (5'i yeni kayıt) tanımlamışlardır. Ertunç ve ark., (30), Yedi Göller Milli Parkı'nda Simuliidae faunası üzerine yaptıkları araştırmada 7 tür tanımlamışlardır. Ertunç (29), Türkiye'nin batısındaki bazı akarsu sistemlerinin (Köyceğiz Gölü çevresi, Büyük Menderes Nehri çevresi ve Yedigöller Milli Parkı) Simuliidae faunası üzerine yaptığı çalışmada 1 alt familyaya ait 2 cins, 5 alt cins ve 17 tür saptamıştır. Kazancı ve Ertunç (53), Yeşilirmak Nehir Havzası'nın Simuliidae faunasını ve Simuliidae türlerinin su kalitesi ile ilişkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 10 tür (1'i Yeşilirmak Havzası için ilk kayıt) tanımlamışlardır. Diğer yandan Yılmaz ve ark., (95), Kayseri-Nevşehir arasında kalan Orta Kızılırmak alanında *Simulium* enfestasyonlarının afet boyutundaki artışını rapor etmişlerdir. Ayrıca Gazıyağcı (32), Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde Simuliid türlerinin yayılışı hakkında rapor vermişlerdir.

2.8. Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar

2.8.1. Dünyadaki moleküler çalışmalar

Simulidlerin taksonomik klasifikasyonu konvansiyonel olarak larvada kromozomal analiz, pupada morfoloji ve erginlerinde dış yapı morfolojisine dayanmaktadır. Tür ayrımı morfolojik ve sitolojik olarak çok zordur (7, 21, 49). Bunun yanında bu aile için geniş çaplı kladistik filogenetik çalışmalar sadece birkaç çalışma ile sınırlıdır (7, 64, 65). Karasineklerin taksonomisi ile ilgili DNA sekans çalışmaları 16S ribozomal RNA ve transfer RNA (74) gen bölgelerinin araştırılmasıyla başlamıştır. Daha sonra ise 16s rRNA ve NADH subunit 4 (ND4) gen bölgeleri kısmen kullanışlı olmuştur (41, 58). Son yıllarda ise *Simulium* türlerinin DNA tabanlı klasifikasyonunda ise ITS (Internal transcribed spacers) (69) ve COI (Cytochrome oxidase I) (19) gen bölgeleri polimorfik bölgeleri ve bu şekilde özgüllüğü yüksek moleküler klasifikasyon yapılmaya başlanmıştır.

16S rRNA ve ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) genlerinin mitokondriyal DNA sekanslarına bağlı olarak, Tang ve Unnasch, (90) Batı Afrika'daki *Simulium damnosum*'un 6 suşu ile olan filogenetik yakınlığını göstermişlerdir. Aynı gen bölgeleri hem Afrika hem de Güney Amerika'daki farklı *Simulium* türlerinin filogenetik akrabalıkları üzerinde de çalışılmıştır (89).

Krüger ve ark., (59), mitokondrial 16 S rRNA gen sekansı çalışmaları ile *S. damnosum*'un Doğu ve Batı Afrika suşlarının filogenetik akrabalığını ortaya koymuşlardır.

Higazi ve ark., (41), Sudan'ın farklı yerlerinden toplanan *Simulium* örneklerinin 16 S rRNA ve ND4 gen sekansları ile *S. damnosum* ve *S. sirbanum*'un filogenetik olarak birbirlerine yakın olduklarını göstermişlerdir.

Hebert ve ark., (38, 39), Simuliidae ailesindeki türlerin identifikasyonu için DNA'nın mitokondrial sitokrom oksidaz gen bölgesinin yaklaşık 658 bp bölgesini amplifiye etmişlerdir. 5 cinse (*Prosimulium*, *Twinnia*, *Stegopterna*, *Cnephia* ve *Simulium*) ait 15 Nearktik karasinek türünde nükleer rDNA'nın ITS1 gen bölgesi Simuliidler üzerindeki ilk sistematik çalışmalardır.

18S ve 5.8S arasında bulunan ITS1 gen bölgesi çok değişken bir bölgedir (61). Simuliidler' deki ITS1 gen bölgesi çalışmaları onchocerciasis'in taşıyıcılığını yapan *Simulium damnosum* üzerinde yoğunlaşmıştır. *Simulium* türlerinin ITS1 gen bölgesi 240 nükleotitten 400 nükleotide kadar değişik uzunluktadır (17, 58, 89).

Rivera ve ark., (78), mt-COI gen bölgesine göre nearctic simuliid türleri arasından morfolojik olarak farklı 65 tür ve kardeş tür içeren tür kompleksinde benzer türler arasında genetik varyasyonu ortalama %14,93 (%2,83-15,33), morfolojik farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise ortalama %0.72 (%0-3,84) olarak tespit etmişlerdir.

Pramual ve ark., (73), *Gomphostilbia* altsoyundaki 13 türden oriyental karasinekte (Oriental black fly) mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesi için yaptıkları moleküler araştırmada, intraspesifik genetik farklılığı ortalama %2,75 (%0-9.28), interspesifik genetik farklılığı ise %11,41 (%0,34-18.84) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar (73) mt-COI gen bölgesine göre DNA barkodlamasının taksonomiye kolaylaştırmada önemli olduğunu kaydetmişlerdir.

Pramual ve ark., (71), Güney Asya'da 3 bölgeden (Cameron Highlands, Malaysia, Puncak, Java, Indonesia) topladıkları *S. feuerborni* popülasyonlarında sitogenetik çalışmalar sonucu bu türün A, B, C ve D sitoformlarının olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar (71) *S. feuerborni*'nin mt-COI gen bölgesinin sekans çalışmaları sonucunda A,B ve C sitoformlarının genetik olarak birbirinden farklı olduğunu saptamışlardır.

2.8.2 Türkiye’deki Moleküler Çalışmalar

Türkiye’de Simuliid sineklerin moleküler identifikasyonu ve klasifikasyonu üzerine ilk moleküler tabanlı çalışmalar araştırma ekibimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüştür. Bu çalışmalarda (46, 47, 48, 93, 94) Orta Kızılırmak havzasında pest problemine yol açan *S. Wilhelmsia* altsoyunda bulunan simuliid türlerinin parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) ve ribosomal complete internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve parsiyel 28S gen bölgeleri karakterize edilmiş ve Dünyada ilk olarak genetik markerlar oluşturulmuştur ve bu türlerin moleküler taksonomiye geçirilmesi sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı yörede yayılım gösteren *S. Wilhelmsia* altsoyundaki *S. balcanicum*, *S. lineatum*, *S. turgaicum* türlerine ait larvaların kromozomal markerları ABD Clemson Üniversitesi’nden Prof. Dr. Peter H. Adler ile oluşturulan kolleberasyon ile ortaya çıkarılmıştır (2, 8). Bunun yanında Orta Kızılırmak Havzasında saptanan bu türlere bağlı meydana gelen simuliid enfestasyonunun hayvan ve insan sağlığına olumsuz etkileri sonucu ortaya çıkan ekonomik kayıplar da bilimsel verilerle ortaya konmuştur (33, 81).

Yine araştırma ekibimiz tarafından Erciyes Dağı akarsularından toplanan simuliid larva örneklerinin *S. bezzi* cyt2, *S. bezzi* cyt3, *S. velutinum* ve *S. ornatum* gruba dahil oldukları belirlenmiş ve tüm izolatların DNA barkodlaması yapılmıştır (27). Bu çalışma ile de *S. bezzii* Cyt 2 izolatının ribozomal ITS-2 gen bölgesine göre moleküler klasifikasyonu Dünya’da ilk olarak sağlanmış ve GenBank’a kaydı gerçekleştirilmiştir.

2.9. Simulium Türleri İle Mücadele

Simuliid sinekler Insecta sınıfında mücadelesi en zor olan arthropodlardandır. Bu sineklere karşı dünyanın çeşitli bölgelerinde mücadele programları uygulanmıştır. Özellikle sınır aşan nehirlerde, ülkeler arası işbirliği ile kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. Bu mücadelelerde Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından izin verilen larvicid etkili *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) kullanılmıştır. Kanada (76), Amerika Birleşik Devletleri (86), Brezilya (75), Arjantin (34), Hindistan (26), Türkiye (6) ve Afrika kıtasının birçok bölümünde Simuliidae mücadelesinde Bti sistematik şekilde kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Türkiye’de Orta Kızılırmak Havzasında 2007 yılında Yamula Baraj inşasından sonra afet boyutunda yaşanan simuliid enfestasyonuna karşı yürütülen mücadelede de BTİ kullanılmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (94, 95).

Bu proje önerisinde Kuzeydoğu Anadolu yöresinde yaşanan ve yaşanması muhtemel simuliid enfestasyonlarında pest karakteri gösteren *Simulium* türlerinin moleküler tekniklerle araştırılması ve moleküler epidemiyolojik verilerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

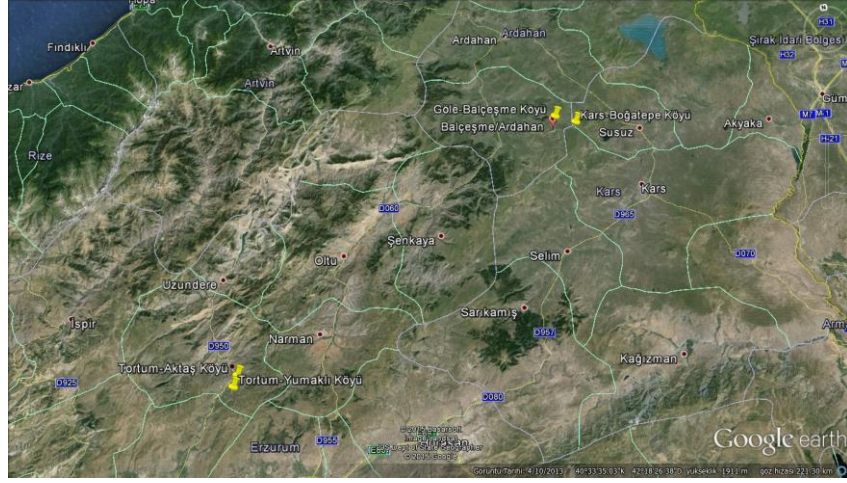
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yöresi ve Simuliid Larva Örneklerinin Toplanması

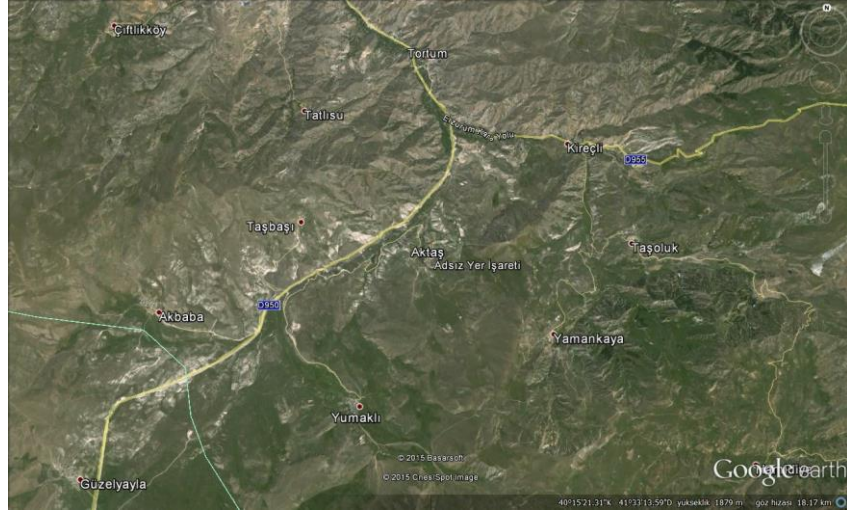
Bu çalışma Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde *Simulium* salgınları ve simulitoksikozis olgularının rapor edildiği Erzurum ile bu yöre ile benzer özellikleri taşıyan meraya sahip Ardahan ve Kars illerine bağlı odaklarda toplam 4 istasyonda yürütülmüştür (Tablo 3.1). Çalışma alanı seçiminde 1994 (67) ve 2005 (10) yıllarında Nisan-Mayıs aylarında meydana gelen *Simulium* salgınları ve görülen simulitoksikozis olguları göz önüne alınmıştır. Özbek ve ark., (67), 1994 yılı Mart ayında Erzurum'un Olur ilçesinde bir sinek türünün ölümlere yol açtığı iddiası üzerine, bu ilçe ve çevresindeki Şenkaya, Narman, Oltu ve Tortum'dan ergin sinek türleri toplamış ve bu sineğin morfometrik analizlerle *Tetisimulium bezzii* olduğunu bildirmişlerdir. Arslan ve Temur (10) ise 2005 yılı Nisan ayı ortalarında Tortum İlçesi Aktaş ve Yumaklı Köylerinde sığırlarda sinek sokması sonucu, erkeklerin prepusyumlarının ve çene altlarının şiştiği, dişi hayvanlarda çene altı ödemle birlikte memelerde yaygın peteşilerin olduğunu ve gebe olan bir ineğin yavru attığını rapor etmişlerdir. Bu raporlar ışığında bazı odakların ergin *Simulium* infestasyonları bakımından özellikle önemli olduğu görülmektedir. Sığırlarda klinik olarak salgının görüldüğü bu odaklar, Tortum İlçesine bağlı Aktaş ve Yumaklı köyleridir. Bu köyler coğrafi olarak Erzurum'un Kuzeyinde ve Kargapazarı dağları eteğindedir. Bu dağların devamı olan Allahuekber dağları ise Kars il sınırlarında sonlanmaktadır. Kargapazarı ve Allahuekber dağları mera hayvancılığı yönünden önemli otlak alanlarıdır. Bu nedenle çalışma odakları olarak Aktaş-Yumaklı Köyleri (Tortum-Erzurum) (Şekil 3.1-3.2) ile Balçesme-Boğatepe köyleri (Ardahan-Kars) (Şekil 3.2-3.3) seçilmiştir. Bu coğrafi bölge dağ yamaçlarından irili ufaklı çay veya derelere sahiptir. Özellikle ilkbahar mevsiminde karların erimesi ile de bu derelerde bol oksijenli su miktarı artmaktadır. Oldukça temiz ve hızlı akan bu sular meraların içinden geçmektedir. Bu akarsular, taşıdıkları özellikleriyle simuliid sinekler için ideal habitata sahiptirler.

Tablo 3.1. Çalışma odakları ve GPS özellikleri

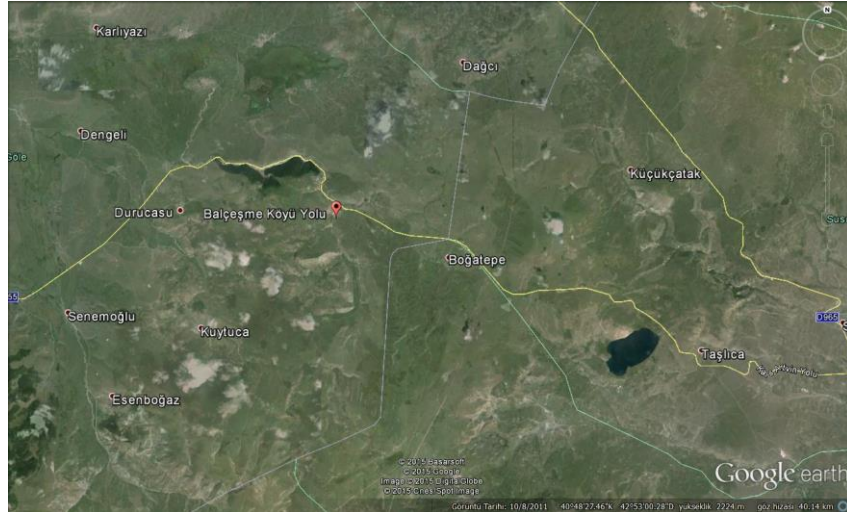
Çalışma Odağı	Bağlı Olduğu Merkez	Rakım	Koordinat
Aktaş	Tortum-Erzurum	1882	40°15'19.87''N, 41°33'14.00''E
Yumaklı	Tortum-Erzurum	2103	40°13'35.86''N, 41°32'09.32''E
Balçesme	Göle-Ardahan	2125	40°49'46.83''N, 42°49'28.84''E
Boğatepe	Merkez-Kars	2221	40°48'27.30''N, 42°53'37.21''E



Şekil 3.1. Çalışma odakları



Şekil 3.2. Aktaş ve Yumaklı Odağı (Tortum, Erzurum)



Şekil 3.3. Balçesme ve Boğatepe Odağı (Göle-Ardahan, Kars)

Bu istasyonlardan Haziran-Eylül 2015 tarihleri arasında simuliid larva örnekleme yapılmıştır. Larva örneklemeinde; istasyonların akıntılı ve durgun bölgeleri, farklı zemin yapısına sahip alanlar, gölgeli ve güneşli kısımlar ve kenar vejetasyon yapısının olup olmamasına göre numune alımına dikkat edilmiştir. Simuliid larvaları nehir yatağı içinde tutundukları taş ve/veya bitkilerden pens yardımı ile ağız vida kapaklı vialler içerisine alınmıştır. Preservatif olarak simuliid larvaları için özellikle kromozom analizinde önerilen Carnoy's solüsyonu kullanılmıştır (37). Solüsyonlar soğuk zincirde tutulmuş ve sahada her tüp için 10 dk ara ile 3 kez değiştirilmiştir. Laboratuvara ulaştırılan örnekler son kez solüsyonları değiştirilerek incelenene kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Morfolojik İdentifikasyon

Larva örneklerinin morfolojik identifikasyonları digital kameralı ve özel yazılıma sahip bilgisayar destekli stereo mikroskop altında ilgili teşhis anahtarlarına göre yapılmıştır (7, 62, 23, 29).

3.2.2. Kromozomal Analiz

Toplanan larvalardan morfolojik analizlere göre kategorize edilen örneklerden bazıları sitogenetik analiz ve kromozomal teşhis amacıyla ABD Clemson Üniversitesi Entomoloji bölümü öğretim üyesi ve simuliid uzmanı Prof. Dr. Peter Adler'e gönderilmiş, gerekli analiz ve teşhisler Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılmıştır. Kromozomal tür teşhisleri yapılan larva örnekleri, analizler sonrası kalan kısımları halinde bireysel moleküler analizler için tekrar Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına geri gönderilmiştir.

3.2.3. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Morfolojik ve kromozomal teşhisleri yapılmış simuliid larvaları tür veya haplotip bazında gruplandıktan sonra seçilen örneklerden bireysel olarak genomik DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Bireysel örneklerden DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (Bioneer Exiprep™ 16) ve genomik DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmış ve elde edilen DNA miktarları Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi

Elde edilen genomik DNA ekstraktları simuliidlerin mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) geninin 709 bp parsiyel kısmını amplifiye eden LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCA TAAAGATATTGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur (39). Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları; 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM her bir primer, 0.5 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polymerase ve 50ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 96 °C'de 1 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 55 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 1,5 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; pozitif kontrol olarak Anabilim Dalında standardize edilmiş referans simuliid genomik DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Elde edilen ampliconlardan sekans analizi ve barkodlama için ayrılanlar jel pürifiye edildikten sonra klonlama ve plazmid DNA eldesi için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu

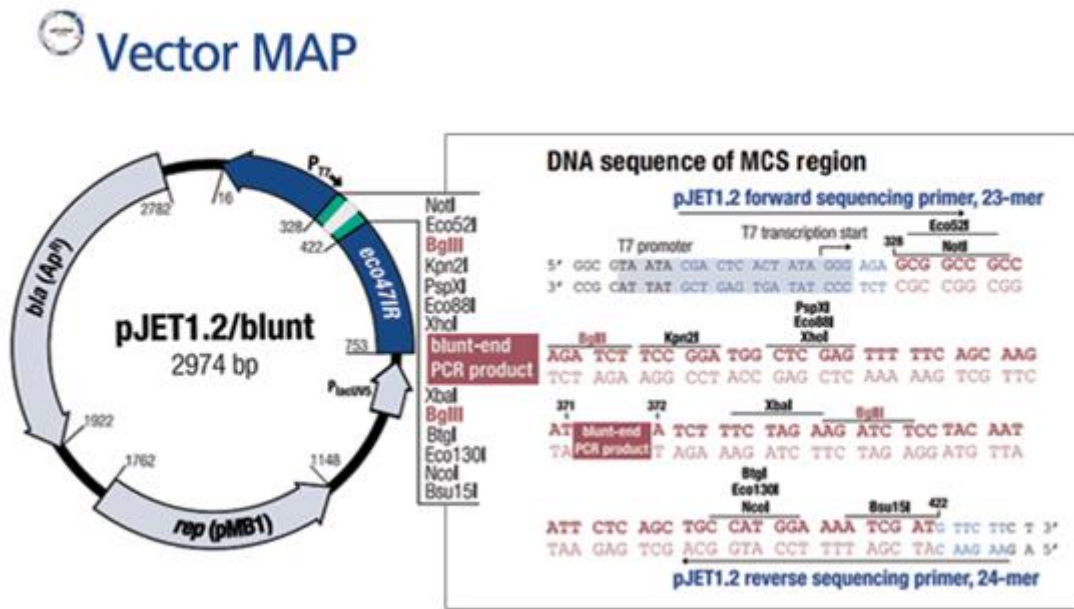
Mt-COI gen bölgesinin PCR sonuçları temel alınarak ilgili gen bölgesi için belirlenen 28 izolata ait ampliconlar DNA barkodlaması ve ilgili gen bölgesindeki inter ve intraspesifik varyasyonların araştırılması ile homoloji indekslerinin belirlenmesi amacıyla ilk basamakta pürifiye edildikten sonra klonlanmıştır.

Ligasyon basamağı: Mt-COI gen bölgesinin PCR'ı sonucu jel üzerinde belirlenen ampliconlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaction Buffer	10 µl
PCR product (10 ng/ µl)	4 µl
DNA Blunting enzyme	1 µl
Su	3 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C’de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl’ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl’si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. pJET1.2/blunt CloningVector

Transformasyon Basamağı: 5 µL’lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücrelerine eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Karışım, önce 42°C’de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C’de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet uçları ile alınarak yeniden LB katı besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.

Koloni Screening PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini anlamak için koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 12,5 µl Maxima Hot Start Green master mix'i, 0,5 µl pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerleri ile bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılarak toplam 25 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerde protokol initial denaturation: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 °C'de 30 s, annealing: 60 °C'de 30 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampikonlar %1.5'luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

Plazmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler ampisilinli 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisine alınarak 6000g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelet daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

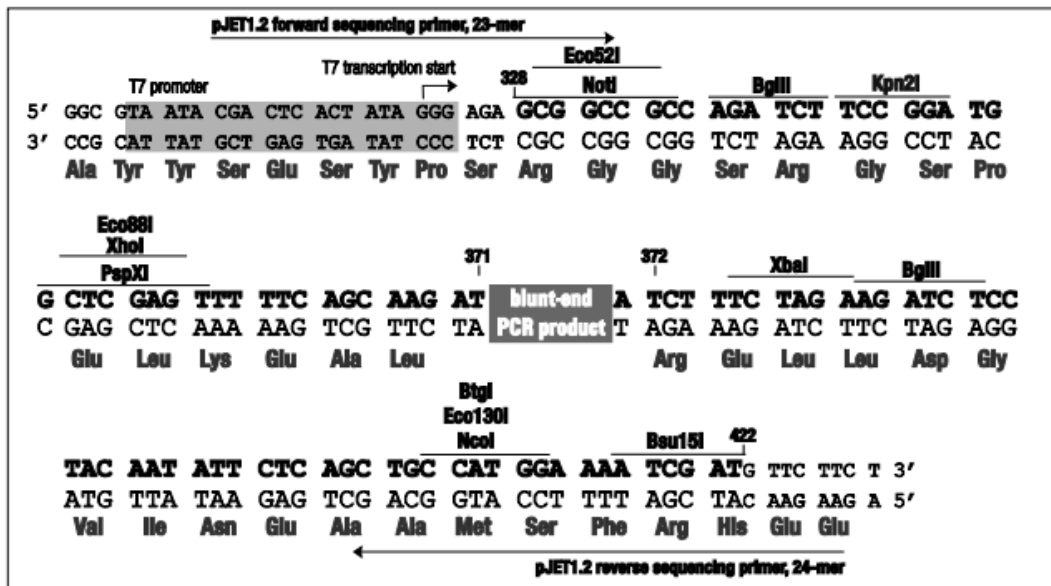
Peletten plazmid izolasyonu için Axygen plazmid pürifikasyon kit prosedürü takip edilmiştir. Axygen plazmid pürifikasyon ticari kitinin önerileri doğrultusunda plazmid ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

- 1- -20 °C'de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1 eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2- Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalanmıştır.
- 3- Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklenmiş ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalanmıştır
- 4- Karışım daha sonra 12,000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiş
- 5- Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plazmid Miniprep column içine konulup 12,000×g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır
- 6- Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki Miniprep column tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
- 7- Yıkama amacıyla her bir Miniprep column üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 8- Santrifüjasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve Miniprep column aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir

- 9- Tüp üzerine 700 µl Buffer W2 eklenerek 12.000 ×g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir.
- 10- Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmıştır. Miniprep column bu kez, yeni 2 ml’lik DNA’se RNA’se free bir tüp içerisine yerleştirilmiş ve membrana bağlanan Buffer W2’yi uzaklaştırmak için 12.000×g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 11- Santrifüj sonrası Miniprep column temiz bir 1.5 ml’lik tüp içerisine yerleştirilmiş ve plazmid DNA’sı elde etmek amacıyla üzerine 60 µl Eluent eklenmiş ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12.000 ×g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 12- Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml’lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plazmid DNA’sı, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon ve PCR Analizleri: İzole edilen rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır (Şekil 3.5). Elde edilen plazmid DNA’sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Su	14 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	3 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl



Şekil 3.5. Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları

Karışım vortekslenmiş ve 37 ° C’de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra %1.5’lik agaroz jele yüklenerek klonlanan genin varlığı yönünden incelenmiştir. Plazmid DNA’ların amplifikasyonu amacıyla pJET1.2 Forward (5’-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3’, Thermo Scientific) ve pJET1.2 Reverse (5’-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3’, Thermo Scientific) primerleri kullanılmış ve PCR sonrası ampliconlar % 1,5 ’luk agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.

3.2.6. Mt-COI Gen Bölgesinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

Mt-COI gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA’lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 8.1.8 (54) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA’sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenmiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank’ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 8.1.8 (54) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2 (25) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed inv (GTR+G+I) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.8 (54) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (42) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç “burn in” olarak çıkarılmıştır). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik ve Kromozomal İdentifikasyon Sonuçları

4.1.1. Morfolojik Analiz

Kuzey Doğu Anadolu Bölgesinde toplam 4 odaktan 100 larva ve 50 pupa örneği toplanmıştır. Toplanan larva ve pupa örneklerinin araştırma odaklarına göre dağılımları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Toplanan larvaların çalışma odaklarına göre dağılımları

Çalışma Odağı	Bağlı Olduğu Merkez	Toplanan Larva ve Pupa Sayısı	
		Larva	Pupa
Aktaş	Tortum-Erzurum	14	15
Yumaklı	Tortum-Erzurum	38	10
Balçesme	Göle-Ardahan	15	12
Boğatepe	Merkez-Kars	33	13
Toplam		100	50

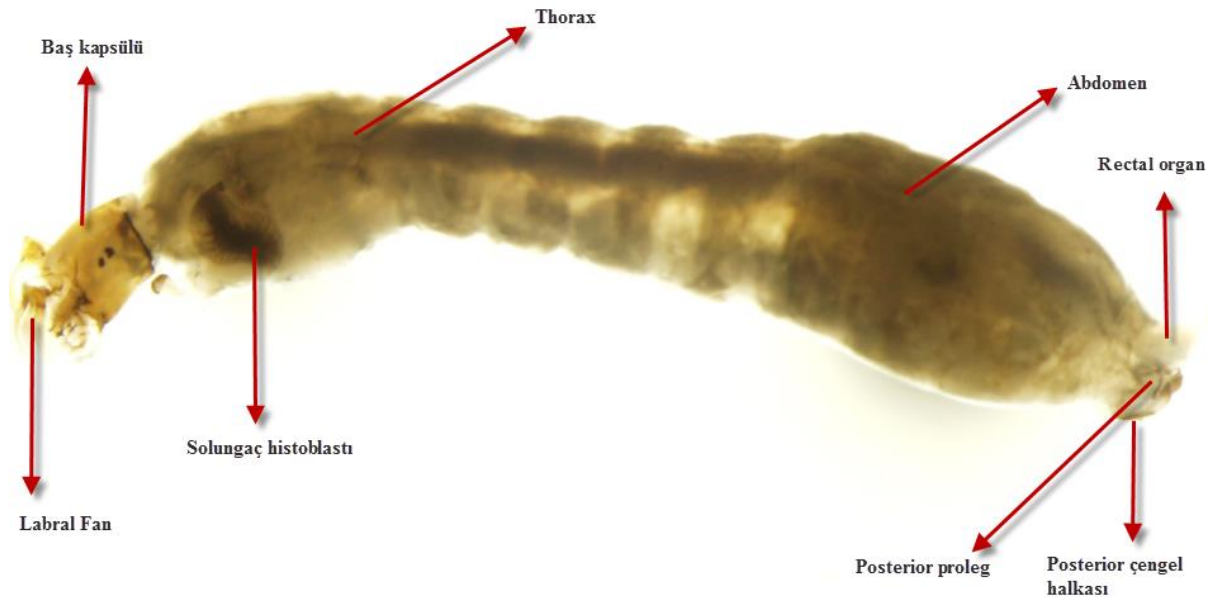
Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik identifikasyon sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Araştırma odaklarından toplanan larva örneklerinin morfolojik identifikasyon sonuçları

Tür	Aktaş	Yumaklı	Balçesme	Boğatepe	Toplam
<i>S. kiritshenkoi</i>	1	15	2	1	19
<i>S.vernum</i>	-	1	-	1	2
<i>S. bergi</i>	1	-	1	10	12
<i>S. equinum</i>	1	-	1	-	2
<i>S. paraequinum</i>	2	1	9	2	14
<i>S. bezzii</i>	6	1	1	-	8
Toplam	11	18	14	14	57

Araştırma merkezlerinden toplanarak incelenen larvalarda vücudun baş, toraks ve abdomen olmak üzere üç kısımdan oluştuğu ve sınırları çok belirgin olmayan 11 segmentten meydana geldiği görülmüştür. Başın geniş olduğu ve belirgin bir biçimde vücuttan ayrıldığı, başta iyi gelişmiş bir çift anten, ağız parçaları ve bir çift sefalik fan bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).

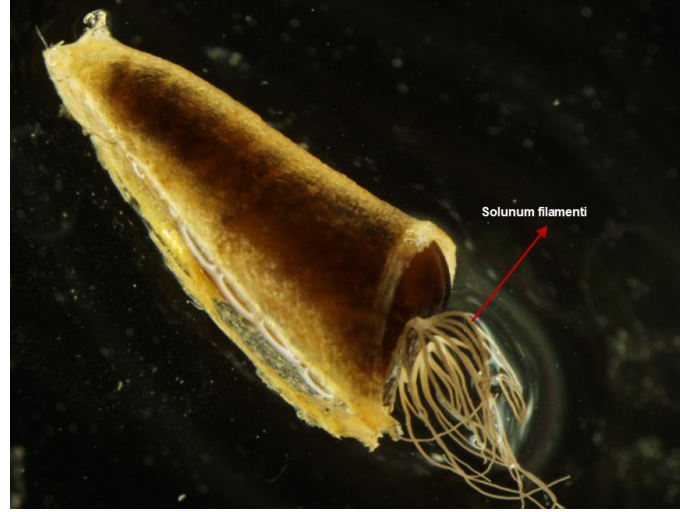
Vücudun göğüs bölgesi kalın olup ventral tarafında, ucunda kancalardan oluşmuş bir halkanın bulunduğu bir adet proleg gözlenmiştir. Abdomen sekiz segmentten meydana gelmiş olup ilk kısmının daha ince ve sonuna doğru tekrar genişlediği görülmüştür. Vücudun sonunda çok sayıda kanca içeren bir halka (posterior proleg) görülmüştür. Anal açıklığın dorsal kısmında “rektal organ” ya da “anal solungaçlar” adı verilen çıkıntıların yer aldığı görülmüştür. Baş kapsülünde post genal yarık, sefalik apotom üzerinde ise benek şeklinde lekeler ve sefalik fanların varlığı dikkati çekmiştir. Larvaların göğüs bölgesinde, solungaç histoblastları (pupal solunum filamentleri) toraksın iki yanında dış vücut örtüsünün altında kıvrılmış bir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Simulium* larvası (Orijinal)

Araştırma odaklarından toplanan pupa örneklerinde pupa kokon içinde bulunmakta ve kokon ayakkabı şeklindedir. Pupanın baş ve thoraksı birleşmiştir (sephalotoraks). Solunum organları,

vücudun her iki yanında gövdeden öne doğru uzamış parmak şeklindeki filamenttir ve vücuda yapışık durumdadır (Şekil 4.2).

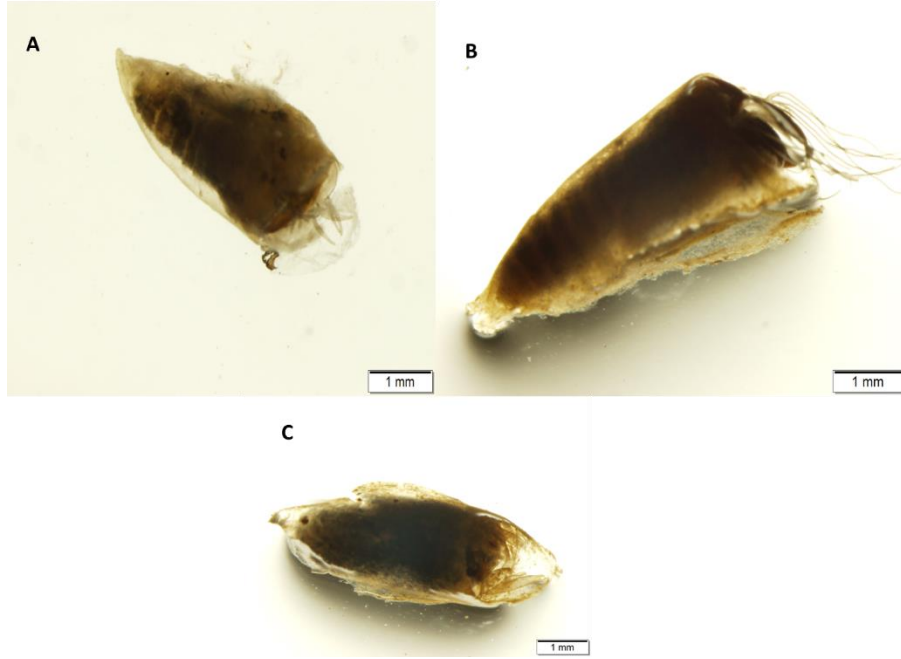


Şekil 4.2. *Simulium* sp. pupa genel görünümü (Orijinal)

Simulium larva ve pupalarına ait örneklerin tür bazında larva ve pupa morfolojilerine göre identifikasyonları ilgili teşhis anahtarlarına göre incelenmiş ve görüntülenmeleri sağlanmıştır. İncelenen larva ve pupalara ait görüntüler Şekil 4.3-Şekil 4.4’de sunulmuştur.



Şekil 4.3. *Simulium* larvalarının genel görünümü (Orijinal). A: *S. bergi*; B: *S. paraequinum*; C: *S. bezzi*; D: *S. kritshenkovi* kompleks



Şekil 4.4. *Simulium* sp. pupa genel görünümü (Orijinal). A: *S. paraequinum*; B: *S. kritshenkovi* kompleks; C: *S. equinum*

4.1.2. Kromozom analizi

Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılan kromozomal analizler sonucunda Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinden toplam 4 odaktan toplanan 100 larva ve 50 pupa örneğinin türlere ve araştırma odaklarına göre göre dağılımları Tablo 4.3’de verilmiştir.

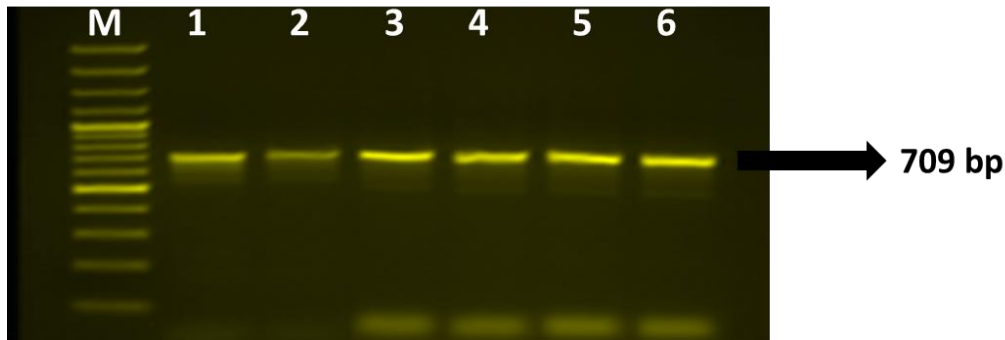
Tablo 4.3. Araştırma odaklarında toplanan larva ve pupa örneklerinin kromozomal identifikasyon sonuçları

Tür	Aktaş		Yumaklı		Balçesme		Boğatepe		Toplam	
	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa	Larva	Pupa
<i>S. kiritshenkoi</i>	5	4	20	1	1	2	5	2	31	9
<i>S. vernum</i>	2	2	4	1	1	2	4	3	11	8
<i>S. bergi</i>	1	3	4	2	2	2	14	-	21	7
<i>S. equinum</i>	2	2	3	4	2	2	4	3	11	11
<i>S. paraequinum</i>	1	2	3	1	8	2	3	2	15	7
<i>S. bezzi</i>	3	2	4	1	1	2	3	3	11	8
Toplam	14	15	38	10	15	12	33	13	100	50

4.2. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

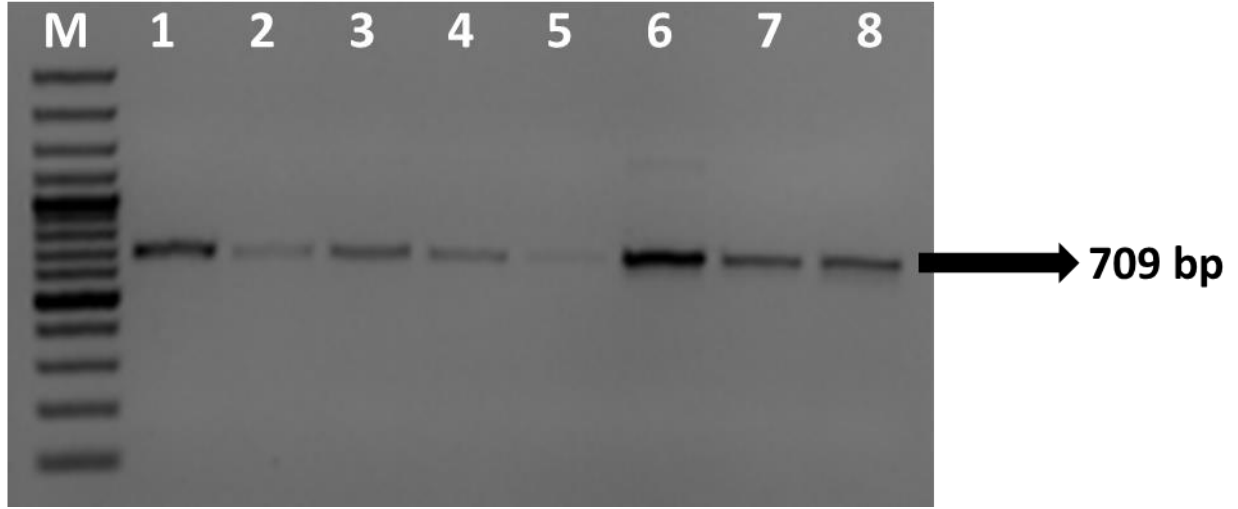
4.2.1 Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

Morfolojik ve kromozomal identifikasyonları sağlanan *Simulium* sp. larva ve pupa örneklerinden elde edilen genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesini hedef alan primerlerle amplifikasyonu sonucu 709 bp büyüklükte DNA bantları oluşturdukları belirlenmiştir. Bazı larva ve pupa örneklerine ait mt-COI gen bölgesi ampikonlarının agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.5’de verilmiştir.



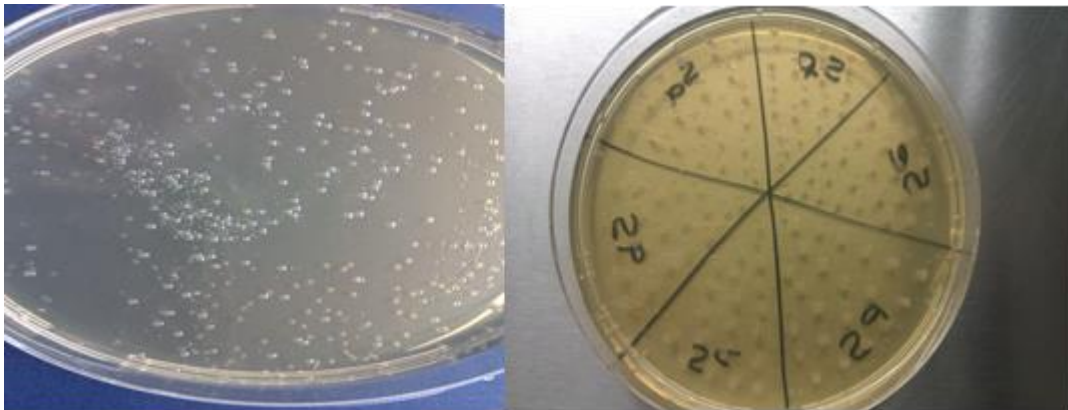
Şekil 4.5. *Simulium* larva ve pupalarına ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-4: *Simulium* sp. larva izolatları; 5-6: *Simulium* sp. pupa izolatları

Uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlara ait ampikonlar sekans analizleri için jel pürifiye edilmiştir (Şekil 4.6).

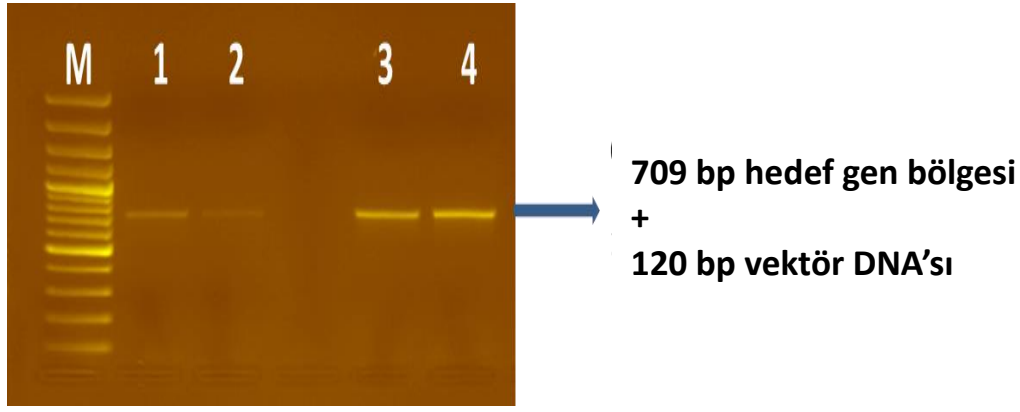


Şekil 4.6. Sekans analizleri için seçilen bazı izolatların mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1-4: *Simulium* sp. larva 5-8: *Simulium* sp. pupa

Jel pürifiye edilen ampikonların klonlanması sonucu katı besiyerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekilmiştir (Şekil 4.7). Bölümlenmiş kolonilerden seçilen tek koloniler vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu koloniler belirlenerek (Şekil 4.8) sıvı besiyerine aktarılmış ve sonrasında plazmid pürifikasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.7. LB katı besiyerinde üreyen 1. ve 2. inkübasyon basamakları sonucu oluşan koloniler



Şekil 4. 8. Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-2,8,9: Insert mt-COI gen bölgesi

Mt-COI gen bölgesine göre sekans analizlerine dahil edilen izolatlar, morfolojik ve kromozomal identifikasyona göre belirlenen türler, DNA izolasyon kaynağı, toplanma bölgesi ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.4'de verilmiştir. Sekans ve filogenetik analizlere Prof. Dr. Peter Adler tarafından Ermenistan'dan izole edilmiş iki izolat da dâhil edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları

Genomik DNA İzolatı	Morfolojik/Kromozomal İdentifikasyon	DNA izolasyon kaynağı	Toplama Bölgesi	GenBank Aksesyon Numarası
TR-ASipeq1	<i>S. paraequinum</i>	Larva	Balçesme/Ardahan	KX673584
TR-ASipeq2	<i>S. paraequinum</i>	Larva	Balçesme/Ardahan	KX673585
TR-ASipeq3	<i>S. paraequinum</i>	Larva	Balçesme/Ardahan	KX673586
TR-ASipeq4	<i>S. paraequinum</i>	Larva	Balçesme/Ardahan	KX673587
TR-ASipeq5P	<i>S. paraequinum</i>	Pupa	Balçesme/Ardahan	KX673588
TR-ASipeq6P	<i>S. paraequinum</i>	Pupa	Balçesme/Ardahan	KX673589
TR-ASieq1	<i>S. equinum</i>	Larva	Balçesme/Ardahan	KX673578
TR-ASieq2P	<i>S. equinum</i>	Pupa	Balçesme/Ardahan	KX673579
TR-ASieq3P	<i>S. equinum</i>	Pupa	Balçesme/Ardahan	KX673580
TR-ASieq4P	<i>S. equinum</i>	Pupa	Balçesme/Ardahan	KX673581
TR-ESibez1	<i>S. bezzii</i>	Larva	Aktaş/Erzurum	KX673590
TR-ESibez2	<i>S. bezzii</i>	Larva	Aktaş/Erzurum	KX673591
TR-ESibez3	<i>S. bezzii</i>	Larva	Aktaş/Erzurum	KX673592
TR-ESibez4	<i>S. bezzii</i>	Larva	Aktaş/Erzurum	KX673593
TR-ESibez5	<i>S. bezzii</i>	Larva	Aktaş/Erzurum	KX673594
TR-KSibe1	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX673600
TR-KSibe2	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX673601
TR-KSibe3	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX673602
TR-KSibe4	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX673603
TR-KSibe5	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX689258
TR-KSibe6	<i>S. bergi</i>	Larva	Boğatepe/Kars	KX689259
TR-ESikri1	<i>S. kiritshenkoi</i>	Larva	Yumaklı/Erzurum	KX673595

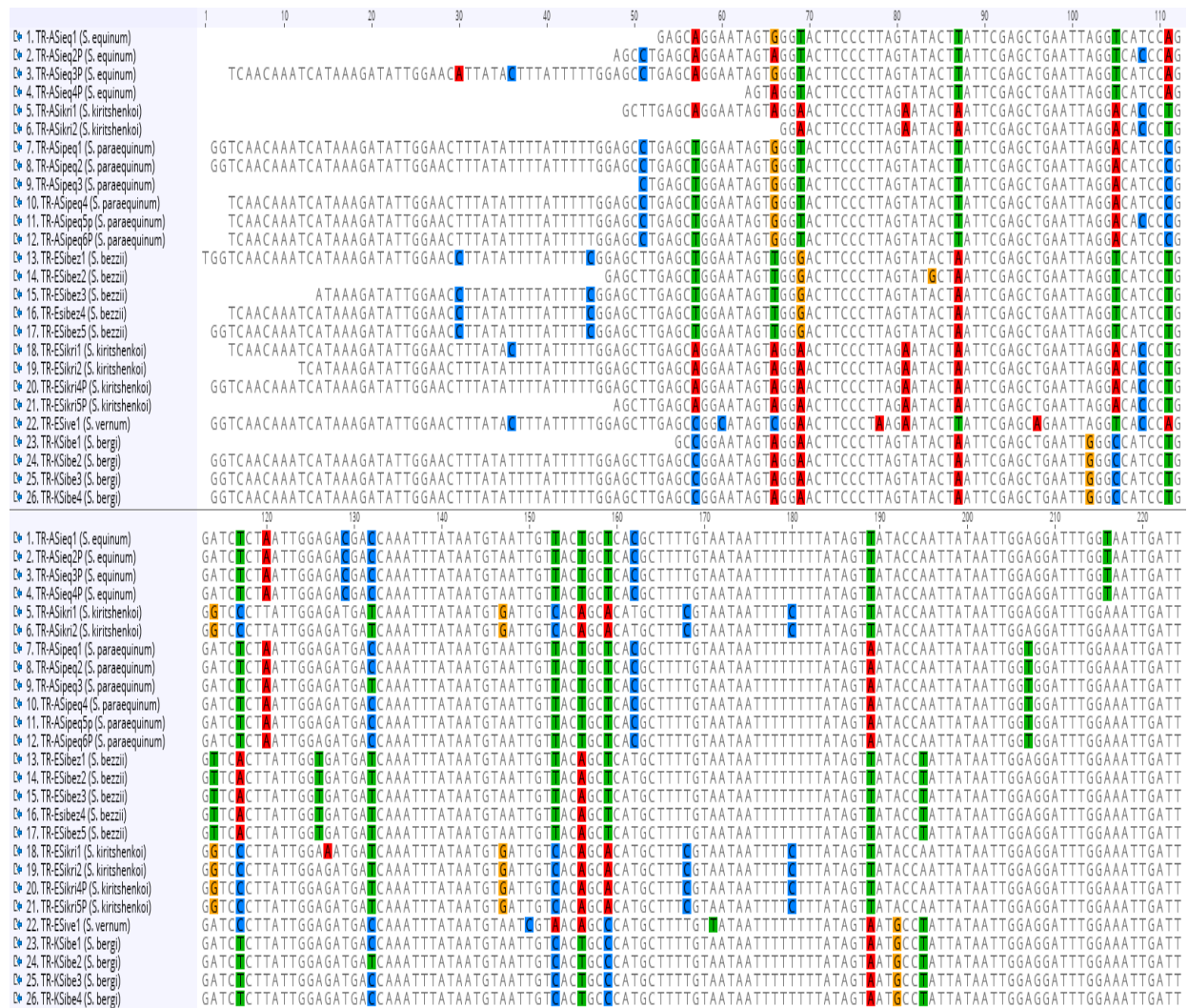
TR-ESikri2	<i>S. kiritshenkoi</i>	Larva	Yumaklı/Erzurum	KX673596
TR-ESikri4P	<i>S. kiritshenkoi</i>	Pupa	Yumaklı/Erzurum	KX673597
TR-ESikri5P	<i>S. kiritshenkoi</i>	Pupa	Yumaklı/Erzurum	KX673598
TR-ESive1	<i>S. verum</i>	Larva	Yumaklı/Erzurum	KX673599
TR-ASikri1	<i>S. kiritshenkoi</i>	Larva	Balçeşme/Ardahan	KX673582
TR-ASikri2	<i>S. kiritshenkoi</i>	Larva	Balçeşme/Ardahan	KX673583
ErSieq1	<i>S. equinum</i>	Larva	Ermenistan	-
ErSieq1	<i>S. equinum</i>	Larva	Ermenistan	-

Elde edilen toplam 28 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür ve/veya haplotip bazında konfirmasyonları sağlanmış olup ilgili izolatlar GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Mt-COI barkodlaması yapılan izolatların ilgili gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5 Mt-COI sekansları sağlanan *Simulium* sp. izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat (Plazmid)	Nükleotid kompozisyonu (%)				
	T	C	A	G	Toplam baz sayısı
TR-ASieq1	35,9	19,2	27,2	17,7	657,0
TR-ASieq2P	35,5	19,6	27,5	17,4	662,0
TR-ASieq3P	35,8	18,8	28,0	17,3	692,0
TR-ASieq4P	36,1	19,7	27,3	16,9	640,0
TR-ASikri1	36,4	18,7	27,8	17,1	637,0
TR-ASikri2	36,4	18,9	28,1	16,7	588,0
TR-ASipeq1	38,4	16,7	27,9	17,0	700,0
TR-ASipeq2	38,7	16,6	27,7	17,0	700,0
TR-ASipeq3	38,8	16,6	27,8	16,8	662,0
TR-ASipeq4	38,7	16,5	28,0	16,9	693,0
TR-ASipeq5P	38,8	16,4	27,9	16,8	695,0
TR-ASipeq6P	39,0	16,4	28,0	16,6	694,0
TR-ESibez1	39,2	17,5	26,9	16,4	709,0
TR-ESibez2	39,2	17,8	26,2	16,7	663,0
TR-ESibez3	39,6	17,2	26,7	16,6	682,0
TR-ESibez4	39,2	17,6	27,1	16,1	697,0
TR-ESibez5	38,9	17,6	26,9	16,5	709,0
TR-ESikri1	36,5	18,3	28,6	16,6	682,0
TR-ESikri2	36,8	18,2	28,2	16,8	674,0
TR-ESikri4P	36,5	18,1	28,7	16,7	684,0
TR-ESikri5P	36,2	18,8	28,1	16,9	638,0
TR-ESive1	36,4	18,6	28,5	16,4	708,0
TR-KSibe1	36,6	19,8	26,4	17,2	647,0
TR-KSibe2	36,9	18,8	27,5	16,8	708,0
TR-KSibe3	37,0	18,8	27,0	17,2	708,0
TR-KSibe4	37,0	18,8	27,0	17,2	708,0
TR-KSibe5	36,2	18,9	27,4	17,4	660,0
TR-KSibe6	36,6	19,8	26,3	17,4	651,0

Çalışmada araştırma yöresinde farklı alt soylarda belirlenen *Simulium* türlerine ait mt-COI gen bölgesinin 588-708 bp kısmını içeren toplam 28 sekans başarıyla elde edilmiştir. Bu sekanslar arasında 528 (%74,5) identik bölge belirlenirken 25 farklı haplotipi ortaya koyan 159 polimorfik bölge saptanmıştır. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Simulium* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan izolatlar arasında ortalama pairwise identiklik oranı %89,3 belirlenmiş olup ikili hizalama analiz sonucu belirlenen identiklik oranları ayrıca Tablo 4.6'da verilmiştir.





Şekil 4.9. *Simulium* sp. türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

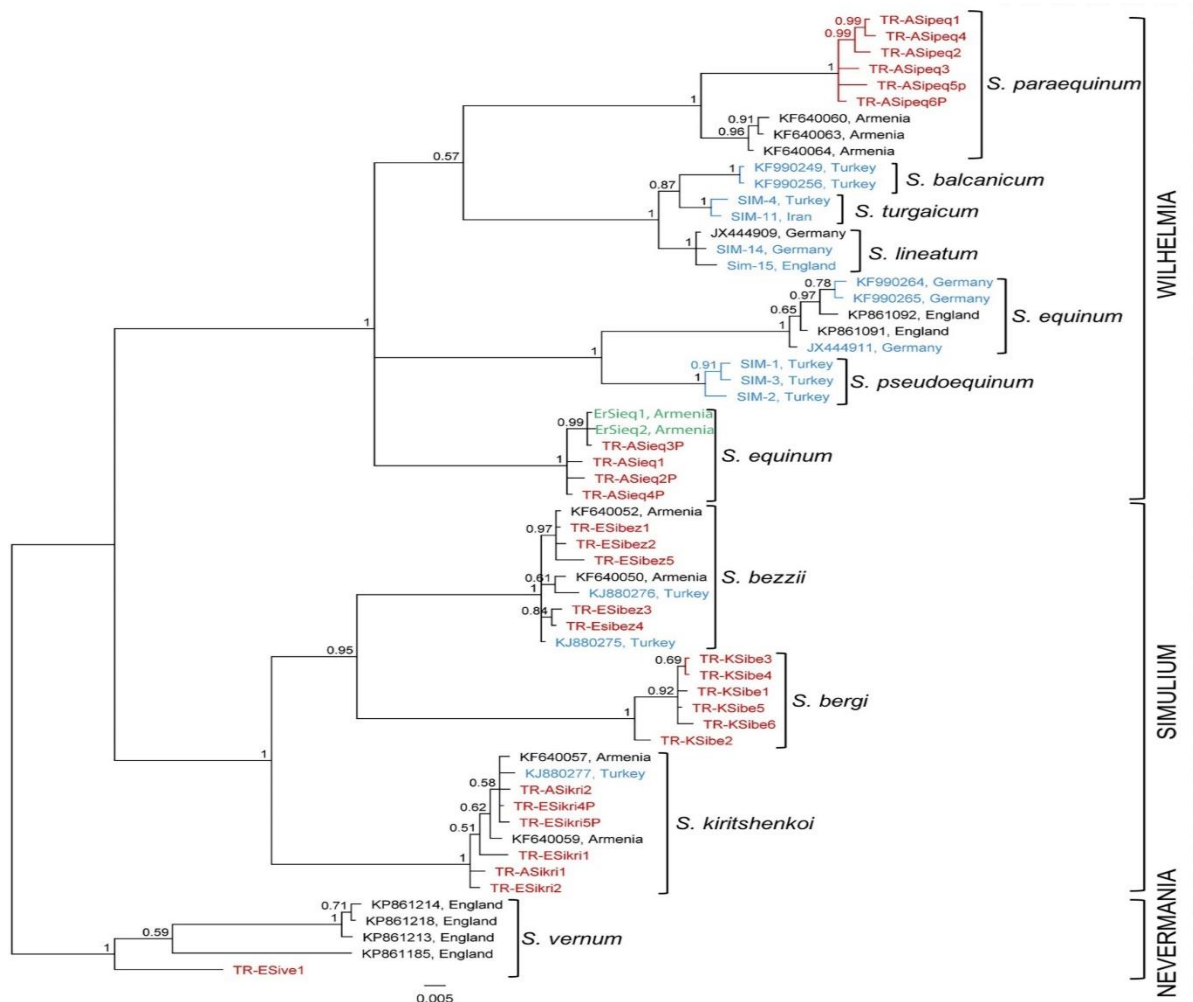
Tablo 4.6 *Simulium* sp. izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları

	TR-ASieq1	TR-ASie...	TR-ASie...	TR-ASie...	TR-ASikri1	TR-ASikri2	TR-ASip...	TR-ASip...	TR-ASip...	TR-ASip...	TR-ASip...	TR-ASip...	TR-ESibez1	TR-ESibez2	TR-ESibez3	TR-ESibez4	TR-ESibez5	TR-ESikri1	TR-ESikri2	TR-ESikri4P	TR-ESikri5P	TR-ESive1	TR-KSibe1	TR-KSibe2	TR-KSibe3	TR-KSibe4
TR-ASieq1		99.1%	99.2%	99.5%	85.8%	85.5%	88.8%	88.4%	88.3%	88.7%	88.1%	88.7%	87.5%	87.4%	86.9%	87.2%	87.2%	85.0%	85.5%	85.5%	85.3%	86.1%	85.0%	86.0%	85.5%	85.5%
TR-ASieq2P	99.1%		99.2%	99.5%	85.9%	85.5%	88.4%	88.1%	87.9%	88.3%	88.0%	88.3%	87.3%	87.2%	86.7%	87.0%	87.0%	85.1%	85.6%	85.6%	85.4%	86.7%	85.3%	86.3%	85.8%	85.8%
TR-ASieq3P	99.2%	99.2%		99.4%	85.4%	85.2%	89.0%	88.9%	88.1%	89.0%	88.4%	89.0%	87.6%	87.1%	87.1%	87.4%	87.7%	85.5%	85.6%	85.8%	85.0%	87.0%	85.3%	86.6%	86.1%	86.1%
TR-ASieq4P	99.5%	99.5%	99.4%		85.9%	85.7%	88.6%	88.3%	88.4%	88.5%	87.9%	88.5%	87.3%	87.2%	86.9%	87.1%	87.5%	85.1%	85.6%	85.6%	85.4%	86.4%	85.4%	86.3%	85.8%	85.8%
TR-ASikri1	85.8%	85.9%	85.4%	85.9%		99.3%	84.9%	85.2%	85.7%	84.8%	85.1%	85.2%	90.4%	90.3%	90.6%	90.7%	90.3%	99.1%	99.5%	99.5%	99.4%	88.4%	89.2%	89.6%	89.5%	89.5%
TR-ASikri2	85.5%	85.5%	85.2%	85.7%	99.3%		85.0%	85.4%	86.2%	84.9%	85.5%	85.7%	90.3%	90.1%	90.5%	90.6%	90.1%	99.1%	99.1%	99.8%	99.7%	89.1%	88.9%	88.9%	88.9%	88.9%
TR-ASipeq1	88.8%	88.4%	89.0%	88.6%	84.9%	85.0%		99.6%	98.9%	99.9%	98.8%	99.4%	86.3%	85.5%	86.1%	86.5%	86.1%	85.3%	85.5%	86.0%	85.1%	86.3%	84.5%	85.7%	85.9%	85.9%
TR-ASipeq2	88.4%	88.1%	88.9%	88.3%	85.2%	85.4%	99.6%		99.1%	99.6%	98.8%	99.4%	86.0%	85.2%	85.9%	86.4%	85.9%	85.6%	85.8%	86.3%	85.4%	86.6%	84.7%	85.6%	85.7%	85.7%
TR-ASipeq3	88.3%	87.9%	88.1%	88.4%	85.7%	86.2%	98.9%	99.1%		98.8%	98.9%	99.2%	85.4%	85.3%	85.4%	85.7%	85.8%	85.2%	85.4%	86.0%	85.8%	85.6%	83.9%	84.4%	83.9%	83.9%
TR-ASipeq4	88.7%	88.3%	89.0%	88.5%	84.8%	84.9%	99.9%	99.6%	98.8%		98.7%	99.3%	86.3%	85.5%	85.9%	86.3%	86.1%	85.2%	85.3%	85.8%	85.0%	86.1%	84.6%	85.6%	85.7%	85.7%
TR-ASipeq5p	88.1%	88.0%	88.4%	87.9%	85.1%	85.5%	98.8%	98.8%	98.9%	98.7%		99.1%	85.9%	85.1%	85.5%	85.9%	85.8%	85.5%	85.6%	86.4%	85.3%	86.5%	83.7%	85.0%	84.9%	84.9%
TR-ASipeq6P	88.7%	88.3%	89.0%	88.5%	85.2%	85.7%	99.4%	99.4%	99.2%	99.3%	99.1%		86.3%	85.6%	86.2%	86.6%	86.2%	85.6%	85.8%	86.5%	85.7%	86.7%	84.3%	85.2%	85.4%	85.4%
TR-ESibez1	87.5%	87.3%	87.6%	87.3%	90.4%	90.3%	86.3%	86.0%	85.4%	86.3%	85.9%	86.3%		99.8%	99.3%	99.4%	99.4%	90.3%	90.8%	90.6%	90.1%	89.1%	89.5%	90.7%	90.4%	90.4%
TR-ESibez2	87.4%	87.2%	87.1%	87.2%	90.3%	90.1%	85.5%	85.2%	85.3%	85.5%	85.1%	85.6%	99.8%		99.1%	99.2%	99.2%	90.0%	90.5%	90.1%	90.0%	88.7%	89.3%	90.2%	89.9%	89.9%
TR-ESibez3	86.9%	86.7%	87.1%	86.9%	90.6%	90.5%	86.1%	85.9%	85.4%	85.9%	85.5%	86.2%	99.3%	99.1%		99.9%	99.1%	90.3%	90.9%	90.6%	90.6%	89.1%	89.9%	90.3%	90.3%	90.3%
TR-ESibez4	87.2%	87.0%	87.4%	87.1%	90.7%	90.6%	86.5%	86.4%	85.7%	86.3%	85.9%	86.6%	99.4%	99.2%	99.9%		99.3%	90.6%	91.1%	90.9%	90.8%	89.5%	90.1%	90.7%	90.7%	90.7%
TR-ESibez5	87.2%	87.0%	87.7%	87.5%	90.3%	90.1%	86.1%	85.9%	85.8%	86.1%	85.8%	86.2%	99.4%	99.2%	99.1%	99.3%		90.2%	90.7%	90.5%	90.0%	88.6%	89.3%	90.1%	89.8%	89.8%
TR-ESikri1	85.0%	85.1%	85.5%	85.1%	99.1%	99.1%	85.3%	85.6%	85.2%	85.2%	85.5%	85.6%	90.3%	90.0%	90.3%	90.6%	90.2%		99.1%	99.1%	99.1%	88.6%	88.6%	89.3%	89.4%	89.4%
TR-ESikri2	85.5%	85.6%	85.6%	85.6%	99.5%	99.1%	85.5%	85.8%	85.4%	85.3%	85.6%	85.8%	90.8%	90.5%	90.9%	91.1%	90.7%	99.1%		99.4%	99.2%	88.7%	89.4%	90.1%	90.2%	90.2%
TR-ESikri4P	85.5%	85.6%	85.8%	85.6%	99.5%	99.8%	86.0%	86.3%	86.0%	85.8%	86.4%	86.5%	90.6%	90.1%	90.6%	90.9%	90.5%	99.1%	99.4%		99.8%	89.2%	89.1%	89.9%	90.1%	90.1%
TR-ESikri5P	85.3%	85.4%	85.0%	85.4%	99.4%	99.7%	85.1%	85.4%	85.8%	85.0%	85.3%	85.7%	90.1%	90.0%	90.6%	90.8%	90.0%	99.1%	99.2%	99.8%		88.4%	89.2%	89.0%	89.5%	89.5%
TR-ESive1	86.1%	86.7%	87.0%	86.4%	88.4%	89.1%	86.3%	86.6%	85.6%	86.1%	86.5%	86.7%	89.1%	88.7%	89.1%	89.5%	88.6%	88.6%	88.7%	89.2%	88.4%		88.3%	88.4%	89.0%	89.0%
TR-KSibe1	85.0%	85.3%	85.3%	85.4%	89.2%	88.9%	84.5%	84.7%	83.9%	84.6%	83.7%	84.3%	89.5%	89.3%	89.9%	90.1%	89.3%	88.6%	89.4%	89.1%	89.2%	88.3%		98.5%	99.7%	99.7%
TR-KSibe2	86.0%	86.3%	86.6%	86.3%	89.6%	88.9%	85.7%	85.6%	84.4%	85.6%	85.0%	85.2%	90.7%	90.2%	90.3%	90.7%	90.1%	89.3%	90.1%	89.9%	89.0%	88.4%	98.5%		98.6%	98.6%
TR-KSibe3	85.5%	85.8%	86.1%	85.8%	89.5%	88.9%	85.9%	85.7%	83.9%	85.7%	84.9%	85.4%	90.4%	89.9%	90.3%	90.7%	89.8%	89.4%	90.2%	90.1%	89.5%	89.0%	99.7%	98.6%		100%
TR-KSibe4	85.5%	85.8%	86.1%	85.8%	89.5%	88.9%	85.9%	85.7%	83.9%	85.7%	84.9%	85.4%	90.4%	89.9%	90.3%	90.7%	89.8%	89.4%	90.2%	90.1%	89.5%	89.0%	99.7%	98.6%	100%	

4.2.2 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan türlere ait izolatların Türkiye ve Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir. Filogenetik analizler sonucunda karakterize edilen türlere ait izolatların soy altı ve tür kompleksleri bazında filogenetik yapılanma gösterdikleri ve üst kümeler oluşturdukları belirlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen tür ve/veya haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $13,7 \pm 1,4$ saptanmıştır. Çalışmada morfolojik ve kromozomal analizlerle *S. paraequinum* olarak identifiye edilen ve moleküler karakterizasyonla TR-ASipeq1-6 olarak isimlendirilen izolatlar, filogenetik ağaç (Şekil 4.10) üzerinde görüleceği üzere Ermenistan'dan rapor edilmiş *S. paraequinum* izolatlarıyla (GenBank aksesyon: KF640060, KF640063, KF640064) birlikte cluster oluşturmuştur. TR-ASipeq1-6 izolatları kendi aralarında $0,9 \pm 0,3$ farklılık gösterirken Ermenistan izolatlarıyla $5,2 \pm 0,9$ farklılık gösterdiği saptanmıştır. *S. equinum* TR-ASieq1-4 izolatları kendi aralarında $0,8 \pm 0,3$ farklılık gösterirken Ermenistan (ErSieq1, ErSieq2), İngiltere (GenBank aksesyon: KP861091, KP861092) ve Almanya (GenBank aksesyon: KF990264, KF990265, JX444911) izolatlarıyla sırasıyla $0,7 \pm 0,3$, $17,7 \pm 2,6$ ve $17,7 \pm 2,6$ genetik farklılık göstermiştir. *S. bezzii* TR-ESibez1-5 izolatları kendi aralarında $0,6 \pm 0,2$ farklılık gösterirken Türkiye'de Erciyes Dağından elde edilmiş izolatlarla (GenBank aksesyon: KJ880275, KJ880276) $0,7 \pm 0,2$ ve Ermenistan izolatlarıyla (GenBank Aksesyon: KF640050, KF640052) $0,6 \pm 0,2$ farklı bulunmuştur. Çalışmada Dünyada ilk olarak *S. bergi* türüne ait izolatların DNA barkodlaması ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Karakterize edilen *S. bergi* TR-KSibe1-4 izolatları arasında genetik farklılık $0,6 \pm 0,2$ belirlenmiş olup filogenetik ağaç (Şekil 4.10) üzerinde de görüleceği üzere bu türe ait haplotipler *Simulium* soy altında Bezzii tür kompleksi üyeleriyle küme oluşturduğu ortaya konmuştur. Yine çalışmada izole edilen *S. kiritshenkoi* Ardahan TR-ASikri1-2 ve Erzurum TR-ESikri1, 2, 4P ve 5P il bazında kendi aralarında $0,7 \pm 0,3$ farklılık göstermiş, il bazında ve Ermenistan izolatları ile $0,6 \pm 0,3$, Türkiye'de Erciyes Dağından elde edilmiş *S. kiritshenkoi* izolatı ile de $0,7 \pm 0,3$ farklı bulunmuştur. Türkiye'den ilk kez moleküler olarak karakterize edilen Nevermania soy altında yer alan *S. vernum* TR-ESive1 izolatı GenBank'ta yalnızca İngiltere'den rapor edilmiş izolatlarla (GenBank aksesyon: KP861213, KP861214, KP861218, KP861185) $8,3 \pm 1,1$ genetik farklılık göstermiştir.

Çalışmada karakterize edilen türlere ait izolatlar ve Türkiye’den daha önce rapor edilmiş izolatların filogenetik analizlere blastn analizleri sonucu genetik yakınlıklarına göre Dünyadan ilave edilmiş izolatlarla birlikte alt soylara göre filogenetik yapılanmaları da analiz edilmiştir. Buna göre en yüksek genetik farklılık $11,2 \pm 1,1$ ile *Wilhelmia* soy altında belirlenmiş bunu $8,6 \pm 0,9$ *Simulium* ve $6,6 \pm 0,6$ ile de *Nevermania* alt soyları takip etmiştir. Altsoylar arasındaki genetik farklılıklar incelendiğinde *Wilhelmia* ve *Simulium* arasında $19,0 \pm 1,9$, *Wilhelmia* ve *Nevermania* arasında $18,4 \pm 1,8$ ve *Simulium* ve *Nevermania* arasında da $15,3 \pm 1,5$ genetik farklılık olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. *Simulium* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde, mavi izolatlar Türkiye’den daha önce GenBank’a kaydı yapılan *Simulium* izolatları ve yeşil renkli izolatlar ise Ermenistan’dan izole edilen ve Anabilim Dalımız tarafından GenBank’a kaydı yapılan izolatları göstermektedir. Node’ların önündeki rakamlar Bayesian posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diptera dizisi Nematocera dizi bölümünde yer alan Simulidae (Blackflies, Karasinekler) ailesinde bugüne kadar 2232'si yaşayan, 15'i ortadan kalkmış (fossil) toplam 2247 tür tarif edilmiştir. Bunların 1817'si *Simulium* soyunda bulunmaktadır (4, 6).

Simuliidler kan emerek yaptıkları parazitliğin yanında *Onchocerca volvulus*, *O. gutturosa*, *O. cervipedis*, *O. dukei*, *O. lienalis*, *O. ochengi*, *O. ramachandrini*, *O. tarcicola*, *Dirofilaria ursi*, *Splendidofilaria fallisensis*, *Mansonella ozzardi*, *Trypanosoma avium*, *Try. confusum*, *Try. corvi*, *Try. numidae*, *Leucocytozoon anatis*, *L. smithi*, *L. caulleryi*, *Hemoproteus nettionis* türleri gibi parazitlerin yanında çeşitli viral (Arbovirus) ve bakteriyel patojenlerin de vektörlüğünü yapmaktadırlar (7, 34, 86).

Pest olma potansiyeli bulunan Simuliid türlerinin bulundukları ekosistemlerde teşhislerinin yapılması ve davranışları hakkında bilimsel veriler elde edilmesi, muhtemel enfestasyonların ve derecelerinin öngörülebilmesi ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesi bakımından kritik öneme sahiptir. Nitekim Türkiye'de mera hayvancılığının geniş çapta yapıldığı, özellikle sığır yetiştiriciliğinin bölgesel bazda ekonomik manada çok önemli olduğu Kars, Erzurum ve Ardahan illerine bağlı bazı akarsu odaklarında *Simulium* enfestasyonlarının yoğun olarak görüldüğü ve sığırlarda simulitoksikozis sonucu yüksek ekonomik kayıpların rapor edildiği bildirilmiştir (10, 67).

Öte yandan Türkiye'de günümüze kadar simuliidler üzerine sito-kromozomal ve moleküler tabanlı identifikasyon ve klasifikasyon çalışmaları sınırlı sayıda bulunmaktadır. Günümüze kadar Türkiye'de sito-kromozomal ve moleküler tabanlı çalışmalar yalnızca araştırma ekibimiz tarafından Orta Kızılırmak Havzası ile Erciyes Dağı akarsularında yaygınlık gösteren simuliid türleri üzerinde gerçekleştirilmiş olup çeşitli türler için kromozomal ve DNA barkodları ortaya konmuştur. Ancak Türkiye simuliid faunasının belirlenmesi ve şimdiye kadar morfolojik analizlerle rapor edilen türlerin konfirmasyonu için geniş çaplı moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, konvansiyonel olarak morfolojik, sitogenetik tabanlı kromozomal analizler, PCR ve sekans analizleriyle filogenetik genotiplendirme çalışmaları yapılarak Kuzey Doğu Anadolu yöresinde Kars, Ardahan ve Erzurum illerine bağlı çeşitli odaklardaki akarsularda örnekleme yapılan simuliid türlerinin *S. bezzii*, *S. bergi*, *S. kiritshenkoi*, *S. equinum*, *S. paraequinum* ve *S. vernum* türleri oldukları identifiye edilmiştir. Araştırma yöresinde morfolojik ve kromozomal analizler sonucu identifiye edilen *S. bezzii*, *S. bergi* ve *S. kiritshenkoi* türleri *Simulium* alt

soyunda, *S. vernum* türü Nevermania alt soyunda ve *S. equinum* ve *S. paraequinum* ise Wilhelmia alt soyunda bulunmaktadır.

Bu çalışmada Kuzey Doğu Anadolu yöresinde Kars, Ardahan ve Erzurum illerine bağlı çeşitli odaklardaki akarsularda morfolojik ve kromozomal analizler sonucu teşhis edilen *S. bezzii* 'nin Ceyhan, Fırat, Göksu, Kızılırmak, Büyük Menderes, Çoruh nehir havzalarında, Yuvarlak çay akarsuyunda (Köyceğiz havzası), Yeşilırmak ve Sakarya nehir havzalarında ve aynı zamanda Trabzon (Akçaabat, Sümela manastırı), Rize (Anzer platosu) ve Giresun (Dereli yolu)'nun değişik bölgelerinde, Erzurum ve Bayburt'ta yaygın tür olduğu ileri sürülmüştür (13, 18, 51, 52, 67, 88). Başören ve Kazancı (13) Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 27 istasyondan topladıkları *Simulium* larva ve pupalarından morfolojik analizler ile iki cinse (*Prosimulium* ve *Simulium*) ait sekiz türün (*Prosimulium rufipes*, *Simulium (Obuchovia) auricoma*, *Simulium (Nevermannia) angustitarse*, *Simulium (Simulium) argyreatum*, *Simulium (Simulium) bezzii*, *Simulium (Simulium) ornatum*, *Simulium (Simulium) trifasciatum*, *Simulium (Simulium) variegatum*) varlığını kaydetmişler ve en fazla rastlanan türlerin *Simulium (Simulium) bezzii* (%36) ve *Simulium (Simulium) variegatum* (%39) türleri olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında *S. ornatum* tür grubu içerisinde bulunan *S. kiritshenkoi* kompleks, Palearktik Simuliidler içerisinde taksonomisi zor bir türdür. Günümüze kadar Türkiye'de bu tür grubu içerisinde 6 türün (*baracorne* Smart, 1944, *fontanum* Terteryan, 1952, *kiritshenkoi* Rubtsov, 1940, *caucasicum* Rubtsov, 1940, *ornatum* Meigen, 1818 (complex), *trifasciatum* Curtis, 1839) varlığı bildirilmiştir (87).

Nevermania alt soyunda yer alan *S. vernum* Dünya'da ve Türkiye'de yayılış göstermektedir. Başören ve Kazancı (12), Doğu Karadeniz'de 16 istasyondan [Rize(Ovit dağları) ve Giresun (Kümbet platosu)] topladıkları *Simulium* larva ve pupa örneklerinde *Prosimulium* ve *Simulium* cinslerine ait 8 türün (*Prosimulium fulvipes*, *Prosimulium tomosvaryi*, *Simulium (Nevermannia) cryophilum*, *Simulium (Nevermannia) vernum*, *Simulium (Simulium) hispaniola*, *Simulium (Wilhelmia) balcanicum*, *Simulium (Wilhelmia) lineatum*, *Simulium (Wilhelmia) pseudequinum*) varlığını bildirmişler ve en yaygın türün *Prosimulium tomosvaryi* (47%) türü olduğunu kaydetmişlerdir.

İncelenen örnekler arasında *S. Wilhelmia* alt soyunda iki tür tanımlanmış olup *S. Wilhelmia paraequinum*'un primer yaygın tür olduğu, *S. Wilhelmia equinum*'un ise daha sınırlı yayılış gösterdiği saptanmıştır. Morfometrik analizlerle *S. Wilhelmia equinum* Türkiye'de İstanbul (Çatalca), Tekirdağ (Saray), Edirne (İnece, İskender) ve Kırklareli (Babaeski) illerinde rapor

edilmiştir. Öte yandan *Wilhelmia* alt soyundaki ikinci tür olan *S. W. paraequinum* ise Kırklareli (Üsküp)'nde sınırlı bir yayılış gösterdiği bildirilmiştir (87).

Diğer yandan Türkiye'de bugüne kadar simuliid sinekler üzerine yapılmış sito-kromozomal ve moleküler tabanlı identifikasyon ve klasifikasyon araştırmaları üç çalışma ile sınırlıdır. Bu araştırmalardan ilkinde Yeşilöz (93), Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen Kızılırmak havzasında topladığı larvalarda morfolojik analizler ile toplanan larvaların *Simulium* sp. özelliği gösterdiğini belirlemiş ve daha sonra parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 ve ribosomal complete internal transcript spacer 2 ve parsiyel 28S gen bölgelerinin moleküler analizleri ile bu larvaları *S. (Wilhelmia) balcanicum* ve *S. (Wilhelmia) lienatum* olarak tanımlamıştır. Takiben başlatılan ikinci araştırmada ise İnci ve ark (47) Orta Kızılırmak havzasında sorun oluşturan karasinek türlerinde morfolojik, kromozomal ve moleküler analiz çalışmaları yapmışlar; morfolojik analizler sonucunda topladıkları larva örneklerini *Simulium Wilhelmia lineatum*, *S. Wilhelmia balcanicum* ve *S. Wilhelmia* spp. olarak tanımlamışlar; kromozomal analizlerle ise *S. lineatum* ve *S. balcanicum* türlerini saptamışlar ve aynı zamanda larvaların ribosomal internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve mitokondriyal cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonunu yaparak filogenilerini ortaya koymuşlardır. Araştırmaların üçüncüsünde ise Demircioğlu (27) Erciyes dağı akarsularında simuliid türlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla topladığı simuliid larva örneklerinde morfolojik, kromozomal ve moleküler analiz çalışması yapmış, morfolojik, kromozomal ve parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 ve ribosomal parsiyel 5.8S, complete internal transcript spacer 2 ve parsiyel 28S gen bölgelerinin moleküler analizleri sonucunda toplanan larvaların *S. bezzii* sitofom (Cyt) 2, *S. bezzii* Cyt 3, *S. ornatum* grup ve *S. velutinum* olduğunu saptamıştır. Araştırmacı (27) ribozomal 5.8S, ITS-2 ve 28S gen bölgelerinin nükleotid sekansları sonucunda *S. bezzii* (TrERUSimbe3) izolatını Dünyada ilk kez karakterize etmiş ve GenBank kaydını gerçekleştirmiştir.

Türkiye'de bugüne kadar varlığı ileri sürülen yaklaşık 50 simuliid türü sadece geleneksel morfometrik incelemelerle rapor edilmiştir (11, 18, 23, 29, 30, 32, 50-53, 67, 88, 95, 97). Mevcut çalışmada ise Kuzey Doğu Anadolu yöresinde çeşitli odaklarda bulunan akarsularda yayılış gösteren simuliid türleri tek bir birey temelinde morfometrik analizlerin yanında kromozomal ve moleküler analizlerle de araştırılmıştır. Dolayısıyla bütün analizler birbiriyle ayrı ayrı doğrulanmıştır. Zira simuliid nesillerinin kompleks yapılarının bu doğrulanmaya ihtiyaçları vardır.

Başlıca simuliid nesilleri (major lineages, örneğin, alt aileler ve soylar) arasındaki evrimsel ilişki; kromozomal, moleküler ve morfolojik karakterlerin uygulanması ile net bir şekilde çözülmüş ve desteklenmiştir (7, 64). Polytene kromozomu veya sitotaksonomi çalışmaları Simuliidae ailesinin sistematığı ve taksonomisinde önemli bir rol oynamaktadır. Sitogenetik çalışmalar, tanımlanmış birçok nominal türde sibling türlerin varlığını ortaya koymada oldukça başarılıdır. Kromozomal düzenlemeler (genellikle inversiyonlar), sex kromozomları ve otozomal polimorfizmler sibling türlerin teşhisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (3, 7, 77). *Simulium damnosum* kompleksi içindeki türler arasında doğal hibridizasyon sıklığı yaklaşık 0.0009-0.001 olarak belirlenmiş (16, 70), ayrıca deneysel hibridizasyon çalışmalarında başarılı bir şekilde yapılmıştır (63). Diğer yandan doğal *Simulium* popülasyonlarında sıra dışı derecede polimorfizm belirlenmiştir. Polimorfizmlerin büyük bölümü inversiyonlardır. İnversiyonlar genellikle sex kromozomlarını üretmek için üst üste birikmektedirler. Hatta seks kromozomlarını içeren tür ya da tür gruplarında sitolojik olarak farklılaşmamışlardır (4). Bu inversiyonlardan %97'si paracentric inversiyonlardır (15). Morfolojinin evrimsel analizi, çevresel etkiyle etkilenebildiği için genellikle zordur ve birçok genin fazla ya da daha az etkisi ile saptanma ihtimali vardır. Bunun yanında kendi gerçeği içinde morfolojik analiz direkt olarak uygulanabilirliği yönünden önem arz etmektedir. Örneğin tarsal tırnağın şekli, konak derisine tutunmada bir adaptasyon olarak nitelenmektedir (36). Diğer yandan kromozomal varyasyonlar direkt uygulanabilir karakterde değildir. Ancak kullanışlı genetik markerları sağlarlar. Sitogenetik varyasyonun uygulanabilirliği sınırlı olup, tüm genetik varyasyonları yansıtmamaktadır. Bu açıdan kromozomal varyasyonlarla ilişkili olmayan kardeş türlerin çeşitliliği henüz netliğe kavuşmamıştır.

Moleküler biyolojik teknikler simuliid türlerinin daha çok özelliğinin incelenmesine imkân sağlamıştır. Bu teknikler genel olarak nükleik asitler (genellikle DNA), proteinler (enzimler ve yapısal proteinler) ve ikincil metabolitler (örn; lipitler ve karbonhidratlar) olarak üç gruba ayrılmaktadır. DNA varyasyonu genetikdir. Bunların ekspresyonu çevresel faktörlerden etkilenmemektedir. İlgili genin kodon sekansını yansıtan protein varyasyonu, amino asit dizilimlerindeki değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte protein varyasyonu, post-translasyonel modifikasyondan da etkilenebilir. Böylece bu varyasyonlar, her zaman genetik olarak saptanamayabilir (68). İkincil metabolitler ise enzimatik faaliyetler sonucu ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bunlar, genetik temelden bir adım daha uzakta bulunurlar. Sitogenetik, morfolojik (24, 35) ve moleküler (64) çalışmalar ışığında Simuliinae

alt ailesinin holoarctic *Prosimuliini* ve tüm dünyada aygın olan *Simuliini* olmak üzere iki soya ayrıldığını ortaya koymuştur.

Simuliid türlerinin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri çalışılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 16S ve 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri; mitokondrial gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (41, 60, 73, 78, 90-92). Cytochrome c oxidase enzimi, bakteri ve mitokondride bulunan geniş transmembran protein kompleksidir. Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (55). Taksonomi ve sistematik çalışmalarında mitokondrial genlerin iyi bir markır olduğu bildirilmiştir. Mitokondrial genlerin sayıca fazla olmaları (hücre başına 1000 kopya), intronlarının eksikliği, rekombinasyona daha az maruz kalmaları ve kalıtımın haploid modlu olması nedenleri ile nükleer genlerden daha iyi markırdırlar (38, 39, 79, 80, 84, 85). Benzer şekilde hayvan mitokondrialarında diğer 12 proteini kodlayan genin, mt-COI'nin üçüncü kodon pozisyonunda baz değişimleri yüksek oranda görülmekte ve 12S ve 16S ribozomal genlerden yaklaşık 3 kat daha fazla moleküler evrime neden olmaktadır (57). Bu nedenle kardeş veya yakından ilişkili türlerin hatta bir tür içerisindeki fitocoğrafik grupların belirlenmesinde, COI gen bölgesinin evrimi daha hızlı olmaktadır (1, 20, 38, 39, 43, 72, 82). Bununla birlikte mt-COI gen bölgesinin amino asit sekansları yavaş gerçekleştiğinden dolayı COI, sitokrom b gibi mitokondrial genlerden daha büyük bir filogenetik sinyale sahiptir (28, 83). Böylece amino asit değişimleri incelenerek daha büyük taksonomik gruplarda (örneğin filum yada order) tanımlanamayan organizmaların teşhisini yapmak mümkün olmuştur (38, 39). COI geninin bir diğer avantajı ise bu gen bölgesi için kullanılan universal primerlerin hayvan filumlarının hepsinde olmasa da birçoğunda 5' ucundan belirlemeye imkân vermektedir (31, 38, 40, 96). Simuliid türler üzerine GenBank'ta mt-COI gen bölgesinin araştırıldığı farklı ülkelerden çeşitli kayıtlar bulunmaktadır. Pramual ve ark., (71) Tayland'da insan sokağı *S. nodosum*, *S. nigrogilvum* ve *S. doipuiense* kompleksinde mitokondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin farklılıkları üzerine yaptıkları filogenetik araştırmada, intraspesifik genetik farklılığı *S. nodosum*'da %3.16, *S. nigrogilvum*'da %3.87 ve *S. doipuiense* kompleksinde ise %5.54 olarak belirlemişlerdir. Hernández-Triana ve ark. (96), *Simulium* soyuna ait morfolojik olarak farklı 31 örneğin mt-COI gen bölgesi analizleri sonucunda kardeş türlerin varlığını belirleyen tür komplekslerinde genetik varyasyonu %2.05-

%6.13 olarak saptarken morfolojik olarak farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise %0.07-1.65 olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar morfotaksonomik çalışmaların DNA barkodlaması ile tamamlanmasıyla medikal öneme sahip simuliidlerin ve gizli türlerin identifikasyonunda etkili bir yöntem olduğunu kaydetmişlerdir. Mevcut araştırmada da yukarıda bildirilen çalışmalara (71, 96), paralel olarak araştırma yöresinden elde edilen simuliid izolatlarının mt-COI gen bölgesinde intraspesifik polimorfik alanların varlığı saptanmış, mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizlerine göre farklı türler arasında intra ve interspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir.

Çalışmamızda filogenetik analizler sonucunda karakterize edilen türlere ait izolatların soy altı ve tür kompleksleri bazında filogenetik yapılanma gösterdikleri ve üst kümeler oluşturdukları saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen tür ve/veya haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $13,7 \pm 1,4$ olarak belirlenmiştir. Çalışmada morfolojik ve kromozomal analizlerle *S. paraequinum* olarak tanımlanan TR-ASipeq1-6 izolatları, Ermenistan'dan rapor edilmiş *S. paraequinum* izolatlarıyla (GenBank aksesyon: KF640060, KF640063, KF640064) birlikte cluster oluşturmuştur. TR-ASipeq1-6 izolatları kendi aralarında $0,9 \pm 0,3$ farklılık gösterirken Ermenistan izolatlarıyla $5,2 \pm 0,9$ farklılık göstermiştir. *S. equinum* TR-ASieq1-4 izolatları kendi aralarında $0,8 \pm 0,3$ farklılık gösterirken Ermenistan (ErSieq1, ErSieq2), İngiltere (GenBank aksesyon: KP861091, KP861092) ve Almanya (GenBank aksesyon: KF990264, KF990265, JX444911) izolatlarıyla sırasıyla $0,7 \pm 0,3$, $17,7 \pm 2,6$ ve $17,7 \pm 2,6$ genetik farklılık gösterdiği saptanmıştır. *S. bezzii* TR-ESibe1-5 izolatları kendi aralarında $0,6 \pm 0,2$ farklılık gösterirken Türkiye'de Erciyes Dağından elde edilmiş izolatlarla (GenBank aksesyon: KJ880275, KJ880276) $0,7 \pm 0,2$ ve Ermenistan izolatlarıyla (GenBank Aksesyon: KF640050, KF640052) $0,6 \pm 0,2$ farklı bulunmuştur. Çalışmada Dünyada ilk olarak *S. bergi* türüne ait izolatların DNA barkodlaması ve filogenetik analizleri yapılmış ve karakterize edilen *S. bergi* TR-KSibe1-4 izolatları arasında genetik farklılık $0,6 \pm 0,2$ belirlenmiş ve bu türe ait haplotipler *Simulium* soy altında Bezzii tür kompleksi üyeleriyle küme oluşturduğu ortaya konmuştur. Yine mevcut çalışmada izole edilen *S. kiritshenkoi* Ardahan TR-ASikri1-2 ve Erzurum TR-ESikri1, 2, 4P ve 5P il bazında kendi aralarında $0,7 \pm 0,3$ farklılık göstermiş, il bazında ve Ermenistan izolatları ile $0,6 \pm 0,3$, Türkiye'de Erciyes Dağından elde edilmiş *S. kiritshenkoi* izolatu ile de $0,7 \pm 0,3$ farklı bulunmuştur. Türkiye'den ilk kez moleküler olarak karakterize edilen Nevermania soy altında yer alan *S. verum* TR-ESive1 izolatu GenBank'ta yalnızca İngiltere'den rapor edilmiş izolatlarla (GenBank aksesyon: KP861213, KP861214, KP861218, KP861185) $8,3 \pm 1,1$ genetik farklılık göstermiştir.

Çalışmada karakterize edilen türlere ait izolatlar ve Türkiye’den daha önce rapor edilmiş izolatların filogenetik analizlere blastn analizleri sonucu genetik yakınlıklarına göre Dünyadan ilave edilmiş izolatlarla birlikte alt soylara göre filogenetik yapılanmaları da analiz edilmiştir. Buna göre en yüksek genetik farklılık $11,2 \pm 1,1$ ile *Wilhelmia* soy altında belirlenmiş bunu $8,6 \pm 0,9$ *Simulium* ve $6,6 \pm 0,6$ ile de *Nevermania* alt soyları takip etmiştir. Alt soylar arasındaki genetik farklılıklar incelendiğinde *Wilhelmia* ve *Simulium* arasında $19,0 \pm 1,9$, *Wilhelmia* ve *Nevermania* arasında $18,4 \pm 1,8$ ve *Simulium* ve *Nevermania* arasında da $15,3 \pm 1,5$ genetik farklılık olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de Kars, Ardahan ve Erzurum illerini kapsayan Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde *Simulium* türleri üzerine morfolojik, kromozomal ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon ve filogeni çalışması yapılmıştır. Bu sonuçlarla Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde *S. kritshenkoi*, *S. vernum*, *S. bergi*, *S. equinum*, *S. paraequinum* ve *S. bezzii* türlerinin varlığı ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışmayla Dünyada ilk kez *Nevermania* alt soyundaki *S. vernum* izolatının mitokondriyal gen bölgesine göre DNA barkodlaması gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmış ve filogenisi ortaya konmuştur. Karakterize edilen tüm izolatların dünyada GenBank’a kayıt edilmiş mevcut homolog izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir.

Mevcut çalışma, Türkiye’de Kuzeydoğu Anadolu yöresinde *Simulium* türlerinin epidemiyolojisi ile yaygın tür ve/veya alttürlerin sitogenetiği ve genotiplerinin ortaya konması açısından ve Türkiye’nin biyolojik varlıkları olarak tescillerinin sağlanması bakımından oldukça önemli veriler sağlamıştır.

KAYNAKLAR

1. Abascal F., Posada D., Knight R.D., Zardoya R. 2006. Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. Public Library of Science Biology, 4, 0711-0718.
2. Adler P.H., İnci A., Yildirim A., Düzlü Ö., McCreddie J.W., Kúdela M., Khazeni A., Brúderová T., Seitz G., Takaoka H., Otsuka Y., Bass J. 2015. "Are Black Flies Of The Subgenus *Wilhelmia* (Diptera: Simuliidae) Multiple Species or A Single Geographical Generalist? Insights From The Macrogenome", Biological Journal of the Linnean Society, 114; 163-183.
3. Adler PH., Yildirim A., Onder Z., Tasci GT., Duzlu O., Arslan MO., Ciloglu A., Sari B., Parmaksizoglu N., Inci A. 2016. Rearrangement hotspots in the sex chromosome of the Palearctic black fly *Simulium bergi* (Diptera, Simuliidae). Comp Cytogen, 10(2): 295-310.
4. Adler PH., Crosskey RW. 2017. World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory [2017], 126 pp. <http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>
5. Adler P.H., Cheke R.A., Post R.J. 2010. "Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae)", Infect Genet Evol, 10, 846-65.
6. Adler P.H., Crosskey R.W. 2011. "World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory". <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>. Son Erişim Tarihi: 30 Aralık 2013.
7. Adler P.H., Currie D.C., Wood D.M. 2004. "The Black Flies (Simuliidae) of North America", Cornell University Press in Association with the Royal Ontario Museum, USA.
8. Adler PH., İnci A., Yildirim A., Seitz G., Düzlü Ö., "Chromosomal Insights Into The Pest Status Of The Subgenus *Wilhelmia* In Turkey.", 5th International Simuliid Symposium, SLOVAKYA, 3-7 Eylül 2012.
9. Akarsu G.A., Güngör Ç., Yergök H.İ.Ç., Şimşek, İ. 2003. Bir idrar örneğinde *Simulium* larvası. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 56, 131-4.

10. Arslan MÖ., Temur A. 2005. Erzurum’da sığırlarda simulitoksikozis salgını. (Yayınlanmamış).
11. Balık S., Ustaoglu M.R., Özbek M., Taşdemir A., Topkara, E.T. 2002. Yelköprü Mağarası (Dikili, İzmir) ve yakın çevresinin sucul faunası hakkında bir ön araştırma, EÜ Su Ürünleri Dergisi, 19, 221-5.
12. Başören Ö., Kazancı N., Girgin S. 2013. The distribution of Simuliidae (Insecta, Diptera) species in Ankara Stream (Turkey). Int Rev Hydrobiol, 6,2: 157-167.
13. Başören Ö., Kazancı N. 2012. Contribution to the knowledge of Simuliidae (Diptera, Insecta) fauna of Turkey: Eastern Black Sea Region. Int Rev Hydrobiol, 2: 121-130.
14. Beaty BJ., Marquardt WC: The Biology of Disease Vectors. Fort Collins, University Press of Colorado, 1996.
15. Bedo DG. 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. Chromosoma, 64: 37-65.
16. Boakye DA., Mosha FW. 1988. Natural hybridization between *Simulium sanctipauli* and *S. sirbanum*, two sibling species of the *S. damnosum* complex. Med Vet Entomol, 2: 397-399.
17. Brockhouse C.L., Vajime C.G., Marin R., Tanguay R. 1993. Molecular identification of onchocerciasis vector sibling species in blackflies (Diptera:Simuliidae), Biochem Biophys Res Commun, 194, 628-634.
18. Clergue-Gazeau M., Kazancı N. 1992. Türkiye Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası II: Çeşitli akarsu sistemlerinden toplanmış türlere ekolojik bir yaklaşım, Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 13, 17-32.
19. Conflitti I.M., Kratochvil M.J., Spironello M., Shields G.F., Currie D.C. 2010. Good species behaving badly: Non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae), Mol Phylogenet Evol., 57, 245-57.
20. Cox A.J., Hebert P.D.N. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Molecular Ecology, 10, 371-386.
21. Crosskey R.W. 1981. Simuliid taxonomy. In: Black flies: the future for biological methods in integrated control, Laird. M., (ed). Academic Press, London, 3-18.
22. Crosskey R.W. 1990. The Natural History of Blackflies. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England.

23. Crosskey R.W., Zwick H. 2007. New faunal records with taxonomic annotations for the Blackflies of Turkey (Diptera: Simuliidae), *Aqutaic Insects.*, 29, 21-48.
24. Currie D.C. 1988. Phylogeny of Primitive Simuliidae (Insecta: Diptera: Culicimorpha), Ph.D. dissertation, University of Alberta, Edmonton, Canada.
25. Darriba D., Taboada GL., Doallo R., et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8):772.
26. Das S.C., Nath D.R., Bhuyan M., Hazarika S. 1990. Field trial of abate and Teknar for *Simulium* (Diptera: Simuliidae) control in India, *J Am Mosq Control Assoc*, 6, 135-7.
27. Demircioğlu A., İnci A., Adler P.H., Yildirim A., Düzlü Ö., Önder Z., Çiloğlu A., Investigation and Molecular Characterization of *Simulium* Species in The Streams of Erciyes Mountain in Turkey, VI International Simuliidae Symposium, Torino, ITALYA, 16-19 Eylül 2014, pp.37-37.
28. Dijkstra P., Rubio J.M., Post R. J. 2003. Resolving relationships over a wide taxonomic range in Delphacidae (Homoptera) using the COI gene. *Systematic Entomology*, 28, 89-100.
29. Ertunç Ö. 2009. Türkiye'nin Batısındaki Bazı Akarsuların Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
30. Ertunç Ö., Türkmen G., Kazancı N. 2008. Research on Simuliidae (Insecta: Diptera) fauna of Yedigöller National Park (Bolu, Turkey), *Review of Hydrobiology*, 2, 81-92.
31. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.
32. Gazyağcı A.N. 2011. Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde Simuliidae Türlerinin Yayılışı, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül, KARS.
33. Gray E.W., Adler P.H., Sariözkan S., İnci A., Yildirim A., Düzlü Ö. Economic Losses Associated With Black Flies In Turkey, North American Black Fly Association, 12th Annual Meeting, Georgia, ABD, 22 Şubat - 23 Nisan 2014, pp.2-2

34. Gray E.W., Adler P.H., Coscaron-Arias C., Coscarón S., Noblet R. 1999. Development of the first blackfly (Diptera: Simuliidae) Management program in Argentina and comparison with other programs, J Am Mosq Control Assoc, 15, 400-6.
35. Grenier P., Rageau J. 1960. Remarque's sur la classification des Simuliidae, Bull Soc Pathol Exot, 53, 727-42.
36. Gryaznov A.I. 1984. Morphological adaptations of bloodsucking blackflies to their hosts. In: Diptera (Insecta) of the Fauna of the USSR and Their Significance in Ecosystems [Dvukrylye Fauny SSSR i Ikh Rol' v Ekosistemakh], Narchuk EP, Zlobin VV. (Eds.), Akademiya Nauk SSSR, Leningrad [=St. Petersburg], Russia, pp. 31-34 (in Russian; English translation: 1992), Entomol Rev, 71, 143-5.
37. Hamada N., Adler P.H. 1998. A New Species of *Simulium* (Diptera: Simuliidae) from Open Areas in Central Amazonia, Brazil, Mem Inst Oswaldo Cruz, 93, 317-25.
38. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270, 313-21.
39. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270, 96-9.
40. Hernández-Triana L.M., Craney J.L., Hall A., Fatih F., Mackenzie-Dodds J., Shelley A.J., Zhou X., Post R.J., Gregory T.R., Hebert P.D.N. 2012. DNA Barcodes Reveal Cryptic Genetic Diversity within the Blackfly Subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and Related Taxa in the New World. Zootaxa, 3514: 43-69.
41. Higazi T.B., Boakye D.A., Wilson M.D., Mahmoud B.M., Baraka O.Z., Mukhtar M.M., Unnasch T.R. 2001. Cyto taxonomic and molecular analysis of *Simulium* (Edwardsellum) *damnosum* sensulato (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan, J Med Entomol, 37, 547-53.
42. Huelsenbeck JP., Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics, 17(8):754-755.
43. Hunter S.J., Goodall T.I., Walsh K.A., Owen R., Day J.C. 2008. Nondestructive DNA extraction from blackflies Diptera: Simuliidae): retaining voucher

- specimens from DNA barcoding projects. *Molecular Ecology Resources*, 8, 56-61.
44. Ilmonen J., Adler P.H., Malqvist B., Cywinska A. 2009. The *Simulium venum* group (Diptera: Simuliidae) in Europe: multiple character sets for assessing species status. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 847-863
45. Imura T., Sato Y., Ejiri H., Tamada A., Isawa H., Sawabe K., Omori, S., Murata K., Yukawa M. 2010. Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan, *Parasitol Res*, 106, 543-7.
46. İnci A., Yazar S., Tunçbilek A., Canhilal R., Doğanay M., Aydın L., Aktaş M., Vatansever Z., Özdarendeli A., Özbel Y., Yıldırım A., Düzlü Ö. 2013. Vectors And Vector-Borne Diseases in Turkey, *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 281-296.
47. İnci A., Yıldırım A., Düzlü Ö. Orta Kızılırmak Havzasında Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu ve Vektörlük Potansiyellerinin Real Time PCR ile Araştırılması. TÜBİTAK Proje No: 111O426, 2014.
48. İnci A., Yıldırım A., Düzlü Ö., Adler P.H., Bişkin Z., Çiloğlu A., Yeşilöz H., Demircioğlu A., Seitz G., Molecular Characterization Of Blackflies (Diptera:Simuliidae) Collected From Kızılırmak River In Nevşehir Province Of Turkey., 5th International Simuliid Symposium, SLOVAKYA, 3-7 Eylül 2012.
49. Jitklang S., Kuvangkadilok C., Baimai V. 2008. Cytogenetics and morpho taxonomy of the *Simulium (Gomphostilbia) ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand, *Zoo taxa*, 1917, 1-28.
50. Kazancı N., Clergue-Gazeau M., 1990. Simuliidae de Turquie. I: Premieresdonneesfaunistiques et biogeographiques (Diptera, Simuliidae), *Annales de Limnologie*, 26, 45-50.
51. Kazancı N., Ertunç Ö. 2008a. Bazı Simuliidae (Insecta: Diptera) türlerinin habitat özellikleri, *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, 25, 319-23.
52. Kazancı N., Ertunç Ö. 2008b. On the Simuliidae (Insecta, Diptera) fauna of Turkey, *Review of Hydrobiology*, 1, 27-36.
53. Kazancı N., Ertunç Ö. 2010. Simuliidae (Insecta, Diptera) türlerinin Yeşilirmak Nehri Havzası (Türkiye)'nın sucul habitat kalitesini belirlemede indicator olarak kullanılmaları, *Review of Hydrobiology*, 3, 27-36.

54. Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. 2012: Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28: 1647-1649
55. Khalimonchuk O., Rödel G. 2005. Biogenesis of cytochrome c oxidase, Mitochondrion, 5, 363-88.
56. Kim K.S., Tsuda Y., Yamada A. 2009. Blood meal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan, *J Med Entomol*, 46, 1230-4.
57. Knowlton N., Weigt L.A. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265, 2257–2263.
58. Krueger A., Kalinga A.K., Kibweja A.M., Mwaikonyole A., Maegga B.T. 2006. Cytogenetic and PCR-based identification of *S. damnosum* ‘Nkusi J’ as the anthropophilic blackfly in the Uluguru onchocerciasis focus in Tanzania, *Trop Med Int Health*, 11, 1066-74.
59. Kruger A., Gelhaus A., Garms R. 2000. Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum* and their relationship with West African species of the complex (Diptera: Simuliidae), *Insect Mol Biol*, 9, 101-8.
60. Kruger A., Hennings I.C. 2006. Molecular phylogenetics of black flies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications, *Mol Phylogenet Evol*, 39, 83-90.
61. Larue B., Gaudreau C., Bagre H.O., Charpentier G. 2009. Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae), *Mol Phylogenet Evol*, 53, 749-57.
62. Lechthaler W., Car M. 2005. Simuliidae-Key to larvae and pupae from Central and Western Europe. CD-R Edition, Vienna.
63. Meredith SEO, Boakye DA, Raybould JN et al. 1987. Experimental hybridization between members of the *Simulium damnosum* complex. *Med Vet Entomol*, 1: 193-199.
64. Moulton J.K. 2000. Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera), *Syst Entomol*, 25, 95-113.

65. Moulton J.K. 2003. Can the current molecular Arsenal adequately track rapid divergence events within Simuliidae (Diptera)?, *Mol Phylogenet Evol*, 27, 45-57.
66. Myburgh E., Nevill E.M. 2003. Review of blackfly (Diptera: Simuliidae) Control in South Africa, *Onderstepoort J Vet Res*, 70, 307-16.
67. Özbek H., Hayat R., Aslan İ., 1995. Erzurum'un bazı ilçelerinde simuliid (Diptera, Simuliidae) salgını, *Türk Entomol Derg*, 19, 37-42.
68. Pasteur N., Pasteur G., Binhomme F. 1988. Sayfa 215. *Practical Isozyme Genetics*, Ellis Horwood Ltd, Chichester.
69. Phayahasena S., Colgan D.J., Kuvangkadilok C., Pramual P., Baimai V. 2010. Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences, *Genetica*, 138, 633-48.
70. Post R.J. Natural interspecific hybridisation of *Simulium sanctipauli* s.l. with *Simulium squamosum* and *Simulium yahense* (Diptera: Simuliidae). *Tropenmed Parasitol* 1984; 35: 58-60.
71. Pramual P., Thaijarern J., Sofian-Azirun M., Ya'cob Z., Hadi U. K, Takaoka H. 2015. Cytogenetic and Molecular Evidence of Additional Cryptic Diversity in High Elevation Black Fly *Simulium feuerborni* (Diptera: Simuliidae) Populations in Southeast Asia. *J Med Entomol* 52 (5), 829-836.
72. Pramual P., Kuvangkadilok C., Baimai V., Walton C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14, 3989-4001.
73. Pramual P., Wongpakam K., Adler P. 2011. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae), *Genome*, 54, 1-9.
74. Pruess K.P., Zhu X., Powers T.O. 1992. Mitochondrial transfer RNA genes in a blackfly, *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae), indicate long divergence from mosquito (Diptera: Culicidae) and fruitfly (Diptera: Drosophilidae), *J Med Entomol*, 29, 644-51.
75. Regis L., da Silva S.B., Melo-Santos M.A. 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95, 207-10.

76. Riley C.M., Fusco R. 1990. Field efficacy of Vectobac-12AS and Vectobac-24AS against black fly larvae in new Brunswick streams (Diptera: Simuliidae), *J Am Mosq Cntrol Assoc*, 6, 43-6.
77. Rivera Castillo J.M. 2008. Utility of the cytochrome oxidase I (COI) for species identification and phylogeographic analysis in black flies Diptera: Simuliidae). MSc Thesis, Toronto, 97 pp.
78. Rivera J., Currie D.C. 2009. Identification of Nearctic blackflies using DNA barcoding (Diptera: Simuliidae), *Mol Ecol Res*, 9, 224-36.
79. Ruiz F.J. 2010. Systematics of the Anopheles Nyssorhynchus) Oswaldoi group in Latin America. PhD Thesis, Canterbury Christ Church University, xxii + 214 pp and appendixes.
80. Saccone C., Decarla G., Gissi C., Pesole G., Reynes A. 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as model system. *Gene*, 238, 195-210.
81. Sariözkan S., İnci A., Yildirim A., Düzlü Ö., Gray E.W., Adler P.H., 2014. Türkiye’de Kapadokya Bölgesinde Simulium (Wilhelmia) Türlerinin (Diptera: Simuliidae) İstilasında Oluşan Ekonomik Kayıplar, *Türkiye Parazitoloj Derg*, 38; 116-19.
82. Shufan K.A., Burd J.D., Anstead J.A., Lushai G. 2000. Mitochondrial DNA sequence divergence among greenbug Homoptera: Aphididae) biotypes: evidence for host-adapted genes. *Insect Molecular Biology*, 9, 179-184.
83. Simmons R.B., Weller S.J. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 196-210.
84. Simon C., Buckley T.T., Frati F., Stewart J.B., Beckenbach A.T. 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 545-579.
85. Simon C., Frati F., Beckenbach A.T., Crespi B., Liu H., Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701.

86. Stoops C.A., Adler P.H. 2006. Feeding behavior of larval blackflies (Diptera: Simuliidae) with and without exposure to *Bacillus thuringiensis var israelensis*, J Vector Ecol, 31, 79-83.
87. Şirin Ü., Çalışkan H., Şahin Y. 2015. Black flies (Diptera: Simuliidae) of Turkish Thrace, with a new record for Turkey, Biodiversity Data Journal, 3: e4834.
88. Şirin Ü., Sahin Y. 2005. New records of blackflies (Diptera, Simuliidae) for the Turkish fauna, Zoology in the Middle East, 36, 99-104.
89. Tang J., Toè L., Back C., Unnasch T.R. 1996. Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera:Simuliidae) complex, Mol Biol Evol, 13, 244-52.
90. Tang J., Unnasch T.R. 1995. Discriminating PCR artifacts using DHDA (directed heteroduplex analysis), BioTechniques, 19, 902-5.
91. Tang J.M., Toe L., Back C., Unnasch T.R. 1995. Mitochondrial alleles of *Simulium damnosum* sensulato infected with *Onchocerca volvulus*, Int J Parasitol, 25, 1251-4.
92. Thanwisai A., Kuvangkadilok C., Baimai V. 2006. Molecular phylogeny of blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA, Genetica, 128, 177-204.
93. Yeşilöz H. 2011. Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir Bölümünde Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu, Doktora Tezi, ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
94. Yeşilöz H., Yıldırım A. 2015. Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir Bölümünde Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu, Türkiye Parazitol Derg, 39: 33-40.
95. Yılmaz A., İnci A., Tunçbilek Ş.A., Yeşilöz H., Koçak Ö., Şirin Ü., İça A., Yıldırım A., Demircioğlu A., Düzlü Ö. 2007. Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (*Simulium (Wilhelmia) lineatum*) (Diptera: Simuliidae) İstilas, ERÜ Vet Fak Derg, 4, 91-5.
96. Zhang D-X., Hewitt G.M. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Molecular and Biology, 6, 143-150.
97. Zwick H. 2007. On a small collection of wild-caught adult black flies (Diptera: Simuliidae) from Turkey, Entomologist's Monthly Magazine, 143, 100.