

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERCIYES DAĞI AKARSULARINDA *SİMULIUM*
TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KLASİFİKASYONU**

**Hazırlayan
Ahmet DEMİRCİOĞLU**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERCIYES DAĞI AKARSULARINDA *SIMULIUM*
TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER
KLASİFİKASYONU**

**Hazırlayan
Ahmet DEMİRCİOĞLU**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4317 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ahmet DEMİRCİOĞLU

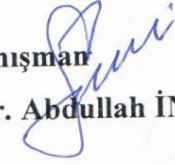
İmza :

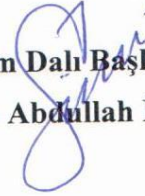


YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Erciyes Dağı Akarsularında *Simulium* Türlerinin Araştırılması ve Moleküler Klasifikasyonu” başlıklı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.


Tezi Hazırlayan
Ahmet DEMİRCİOĞLU


Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ


Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında Ahmet DEMİRCİOĞLU tarafından hazırlanan “Erciyes Dağı Akarsularında *Simulium* Türlerinin Araştırılması ve Moleküler Klasifikasyonu” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

05/06/2014

JÜRİ :

İmza

Üye : Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

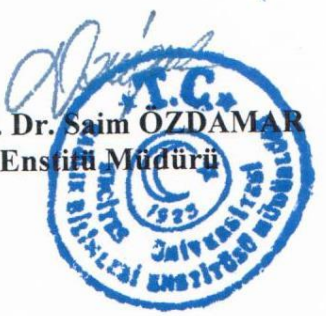
Üye: Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY (Vet. Fak. Mikrobiyoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 13.06.2014 tarih ve...632...sayılı kararı ile onaylanmıştır.

13.06.2014

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında beni cesaretlendiren, bilgi, beceri ve tecrübesinden faydalandığım, eleştirileri ve yardımları ile her zaman yol gösterici olan, çalışma disiplini, işine gösterdiği hassasiyet ile örnek aldığım hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Abdullah İNCİ, saha ve laboratuvar çalışmalarım esnasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM başta olmak üzere diğer öğretim elemanları Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Öğr. Gör. Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Biyolog Zekiye KOÇER, Biyolog Gözde ŞAHİNGÖZ, Vet. Hek. Gamze YETİŞMİŞ'e ve çalışma süresince malzeme bazında TYL-2013-4317 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

ERCIYES DAĞI AKARSULARINDA *SIMULIUM* TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER KLASİFİKASYONU

Ahmet DEMİRCİOĞLU

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2014
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ÖZET

Bu çalışma, Erciyes dağı akarsularında simuliid türlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında Erciyes dağı akarsularında üç istasyondan toplam 100 adet simuliid larva örnekleme yapılmıştır. Toplanan larvaların önce morfolojik ve kromozomal incelemeleri yapılmış daha sonra moleküler analize geçilmiştir. Morfolojik ve kromozomal analizler ile araştırma yöresinden toplanan 100 larvanın 20'sinin *S. bezzii* sitoform (Cyt) 2, 20'sinin *S. bezzii* Cyt 3, 50'sinin *S. ornatum* grup ve 10'unun ise *S. velutinum* olduğu tespit edilmiştir. Moleküler analizler için örnekleme istasyonlarından seçilmiş toplam 4 larvadan genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 ve ribosomal parsiyel 5.8S, complete internal transcript spacer 2 ve parsiyel 28S gen bölgelerini amplifiye eden spesifik primerler ile PCR'a tabii tutulmuştur. İzolatlara ait ampikonların PCR primerleri ile klonlanıp plasmid pürifikasyonundan sonra sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların GenBank kayıtları yapılmış ve dünyadaki benzer izolatlar ile Multiple alignmentları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizi sonucu *S. bezzii* cytoform 2 ve cytoform 3 izolatları arasında %0,8 farklılık saptanmıştır. *S. bezzii* ve *S. ornatum* grup izolatları arasında %9,6±1,2, *S. bezzii* ve *S. velutinum* arasında 13,9±1,4 ve *S. ornatum* grup ve *S. velutinum* izolatları arasında ise %13,5±1,4 genetik farklılık tespit edilmiştir. Ribozomal 5.8S, ITS-2 ve 28S gen bölgelerinin nükleotid sekansları sonucunda *S. bezzii* (TrERUSimbe3) Dünyada ilk kez karakterize edilmiştir. TrERUSimbe3 izolatu GenBank'ta ilgili gen bölgesi yönünden kayıtlı *Simulium* izolatlarından en yüksek filogenetik yakınlığı %96,2 ile *S. ornatum* grubuna dâhil izolatlarla göstermiştir. Araştırma yöresinde karakterize edilen *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatu ise en yüksek identikliği %99,7 ile aynı grupta yer alan *S. trifasciatum* ve *S. ornatum* izolatları ile göstermiştir. *S. bezzii* TrERUSimbe3 ve *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatları arasında ise %3,7±1,0 genetik farklılık belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez Erciyes dağı akarsularında *Simulium* türlerinin morfolojik, kromozomal ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Bu çalışmayla Türkiye'de ilk kez *S. bezzii* cyt2, *S. bezzii* cyt3, *S. velutinum* ve *S. ornatum*

izolatlarının mitokondriyal gen bölgesine göre karakterizasyonları yapılarak filogenileri ortaya konmuş ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda araştırma yöresinden izole edilen *S. bezzii* Cyt 2 (TrERUSimbe2) ve *S. ornatum* grup (TrERUSimor) izolatlarının ribozomal gen bölgesine göre moleküler analizleri sonucunda karakterizasyonları yapılarak GenBank kayıtları gerçekleştirilmiş ve *S. bezzii* Cyt 2 izolatının ribozomal ITS-2 gen bölgesi Dünya’da GenBank’a kayıdı gerçekleştirilen ilk izolat olmuştur.

Anahtar kelimeler: Simulidae, Erciyes dağı, larva, Moleküler karakterizasyon

INVESTIGATION AND MOLECULAR CLASIFICATION OF *SIMULIUM* SPECIES IN THE RIVERS OF ERCIYES MOUNTAIN

Ahmet DEMİRCİOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
Master's Thesis, June 2014
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ABSTRACT

This study was carried out to determine the molecular characterization of simuliid species in rivers of Erciyes Mountain. For this aim between May-September 2013, totally 100 simuliid larvae collected from three collection sites. Morphological and chromosomal examination was performed before molecular analyzes in collected larvae. 20 *Simulium bezzii* cytoform (Cyt) 2, 20 *S. bezzii* Cyt 3, 50 *S. ornatum* group and 10 *S. velutinum* from totally 100 larvae were determined by morphological and chromosomal examination. For molecular analyses the genomic DNA extractions were utilized on 4 larvae selected from sampled area and PCR analyses were performed with the primer pairs that amplified mitochondrial partial cytochrome oxidase subunit 1 and ribosomal partial 5.8S, complete internal transcript spacer 2 and partial 28S gene regions. Sequence analyses of the isolates were done with PCR primers after cloning and plasmid purifications. GenBank records of isolates were done and performing multiple alignments between the obtained isolates and other similar isolates from the world completed phylogenetic analyses. The pairwise analyses between the *S. bezzii* Cyt2 and Cyt3 isolates characterized by Mt-COI sequences showed $5.3 \pm 0.6\%$ genetic difference. The genetic difference between *S. bezzii* and *S. ornatum* group, *S. bezzii* and *S. velutinum*, *S. ornatum* group and *S. velutinum* isolates were determined as $9.6 \pm 1.2\%$, $13.9 \pm 1.4\%$ and $13.5 \pm 1.4\%$, respectively. *S. bezzii* (TrERUSimbe3) isolate was firstly revealed in the world according to ribosomal 5.8S, ITS-2 and 28S gene region. The maximum identity rates between the TrERUSimbe3 isolate and *S. ornatum* group isolates within *Simulium* isolates from the world were determined as 96, 2% according to the phylogenetic analyses of ribosomal 5.8S, ITS-2 and 28S gene regions. *S. ornatum* group TrERUSimor isolate showed 99,7% identity with *S. trifasciatum* and *S. ornatum* by phylogenetic analyses of ribosomal 5.8S, ITS-2 and 28S gene regions. Also genetic difference between the *S. bezzii* TrERUSimbe3 and *S. ornatum* group TrERUSimor isolates established as $3.7 \pm 1.0\%$.

In conclusion, morphological, chromosomal and molecular characterization of *Simulium* sp. in Erciyes Mountain Rivers in Turkey was determined for the first time with this study. *S. bezzii* cyt2, *S. bezzii* cyt3, *S. velutinum* and *S. ornatum* isolates were done molecular characterization and exhibited phylogeny according to mt-COI gene region and were also deposited to the

GenBank. While molecular characterization *S. bezzii* Cyt 2 (TrERUSimbe2) and *S. ornatum* group (TrERUSimor) isolates were detected according to ribosomal 5.8S, ITS-2 and 28S gene region and deposited to the GenBank. *S. bezzii* Cyt 2 isolate was initially recorded to the GenBank in the World.

Key words: Black fly, Erciyes Mountain, Molecular classification, Simuliidae

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	xii
 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>SIMULIUM</i> TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ	3
2.2. <i>SIMULIUM</i> TÜRLERİNİN MORFOLOJİSİ.....	4
2.3. YAŞAM DÖNGÜSÜ	5
2.3.1.Yumurta	6
2.3.2.Larva.....	6
2.3.3.Pupa	8
2.3.4.Ergin	9
2.4. ÜREME.....	10
2.5. BESLENME.....	10
2.6. <i>SIMULIUM</i> TÜRLERİNİN ZARARLARI VE VEKTÖRLÜK ROLLERİ.....	11
2.7. TÜRKİYEDE <i>SIMULIID</i> SİNEKLER ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR ..	12
2.8. <i>SIMULIID</i> SİNEKLER ÜZERİNE YAPILAN MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR.	14
2.9. <i>SIMULIUM</i> TÜRLERİ İLE MÜCADELE	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI.....	16
3.1.1. Araştırma Sahası.....	16
3.1.2. Simuliid Larvalarının Toplanması	18

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. <i>Simulium</i> larvalarının toplandığı istasyon ve larva sayıları	18
Tablo 4.1. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin kromozomal identifikasyon sonuçları.....	27
Tablo 4.2. GenBank kayıtları yapılan <i>Simulium</i> sp. izolatların incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri ve kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları.....	31
Tablo 4.3. Erciyes dağı akarsularından elde edilen <i>Simulium</i> izolatlarıyla dünyadan Ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgeleri yönünden Multiple alignment dâhil edilen diğer bazı <i>Simulium</i> izolatlarına ait aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler.....	34
Tablo 4.4. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları.....	35
Tablo 4.5. Erciyes dağı akarsularında <i>Simulium</i> sp. izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı <i>Simulium</i> sp. izolatlarının parsiyel 5.8 S, complete ITS-2, parsiyel 28S gen dizilimlerinin pairwise analizleri.....	36
Tablo 4.6. GenBank kayıtları yapılan <i>Simulium</i> sp. izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri ve kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları.....	40
Tablo 4.7. Erciyes dağı akarsularından elde edilen <i>Simulium</i> izolatlarıyla dünyadan mt-COI gen bölgeleri yönünden Multiple alignment dâhil edilen diğer bazı <i>Simulium</i> izolatlarına ait aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler.....	42
Tablo 4.8. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları.....	43
Tablo 4.9. Erciyes dağı akarsularında <i>Simulium</i> sp. izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı <i>Simulium</i> sp. izolatlarının mt-COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri	44
Şekil 2.1. <i>Simulium</i> türlerinin sistematikteki yeri.....	4
Şekil 2.2. <i>Simulium</i> sp. morfolojisi.....	5
Şekil 2.3. <i>Simulium</i> türlerinde hayat siklusu.....	6
Şekil 2.4. <i>Simulium</i> sp. yumurtası	7
Şekil 2.5. <i>Simulium</i> sp. larvası.....	8
Şekil 2.6. <i>Simulium</i> sp. pupası	9
Şekil 2.7. Ergin <i>Simulium</i> sp.....	10
Şekil 3.1. Örneklem istasyonu	17
Şekil 3.2. Simuliid larva örneklemesi yapılan istasyonların harita üzerinde görünümü...	17
Şekil 4.1. Taşlara tutunmuş <i>Simulium</i> sp. larvaları.....	25
Şekil 4.2. Akarsu içerisinde <i>Simulium</i> larvaları.....	26

Şekil 4.3.	Simuliid larvalarının complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesini amplifiye eden ITS2F ve ITS2R primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü	27
Şekil 4.4.	Simuliid larvalarının parsiyel COI gen bölgesini amplifiye eden LCO1490 ve HCO2198 primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü	28
Şekil 4.5.	<i>Simulium</i> sp.'nin complete ITS2 ve parsiyel 28S ribozomal gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü	28
Şekil 4.6.	Simuliid larvalarının parsiyel mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü	29
Şekil 4.7.	Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler	29
Şekil 4.8.	Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler	30
Şekil 4.9.	Transforme hücrelerde ITS-2 gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü	30
Şekil 4.10.	Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü.	31
Şekil 4.11.	TrERUSimbe3 izolatının parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S nükleotid ve amino asit sekanları.....	32
Şekil 4.12.	TrERUSimor izolatının parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S nükleotid ve amino asit sekanları	33
Şekil 4.13.	Araştırma yöresinde incelenen Erciyes dağı izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>Simulium</i> izolatlarının ribozomal parsiyel 5.8S, complete complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	37
Şekil 4.14.	Erciyes dağı izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer <i>Simulium</i> izolatlarının parsiyel ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	39
Şekil 4.15.	TrERUSimbe2 izolatının mt-COI nükleotid ve aminoasit sekanları.....	40
Şekil 4.16.	TrERUSimbe3 izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekanları ..	41
Şekil 4.17.	TrERUSimv izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekanları.....	41
Şekil 4.18.	TrERUSimor izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekanları	42
Şekil 4.19.	Araştırma yöresinde incelenen Erciyes dağı izolatları ile Dünyadaki diğer bazı <i>Simulium</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları	45
Şekil 4.20.	Erciyes dağı izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer <i>Simulium</i> izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları	49

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diptera dizisi, Nematocera dizialtı ve Simuliidae ailesinde yer alan karasinekler, kanatlı ve evcil hayvanlar ile insan sağlığını tehdit etmelerinin yanında ekonomik ve ekolojik bakımdan da önemli insektlerdir (1). 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 bölgelerininin filogenetik analiz çalışmaları bulunmaktadır. İç Anadolu Bölgesi'nin en yüksek dağı olan Erciyes dağı'nın, dağcılık ve kış sporlarında çok önemli bir turizm potansiyeline sahip olması yanında aynı zamanda önemli bir yayla turizm bölgesi olması 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 olmaktadırlar (2).

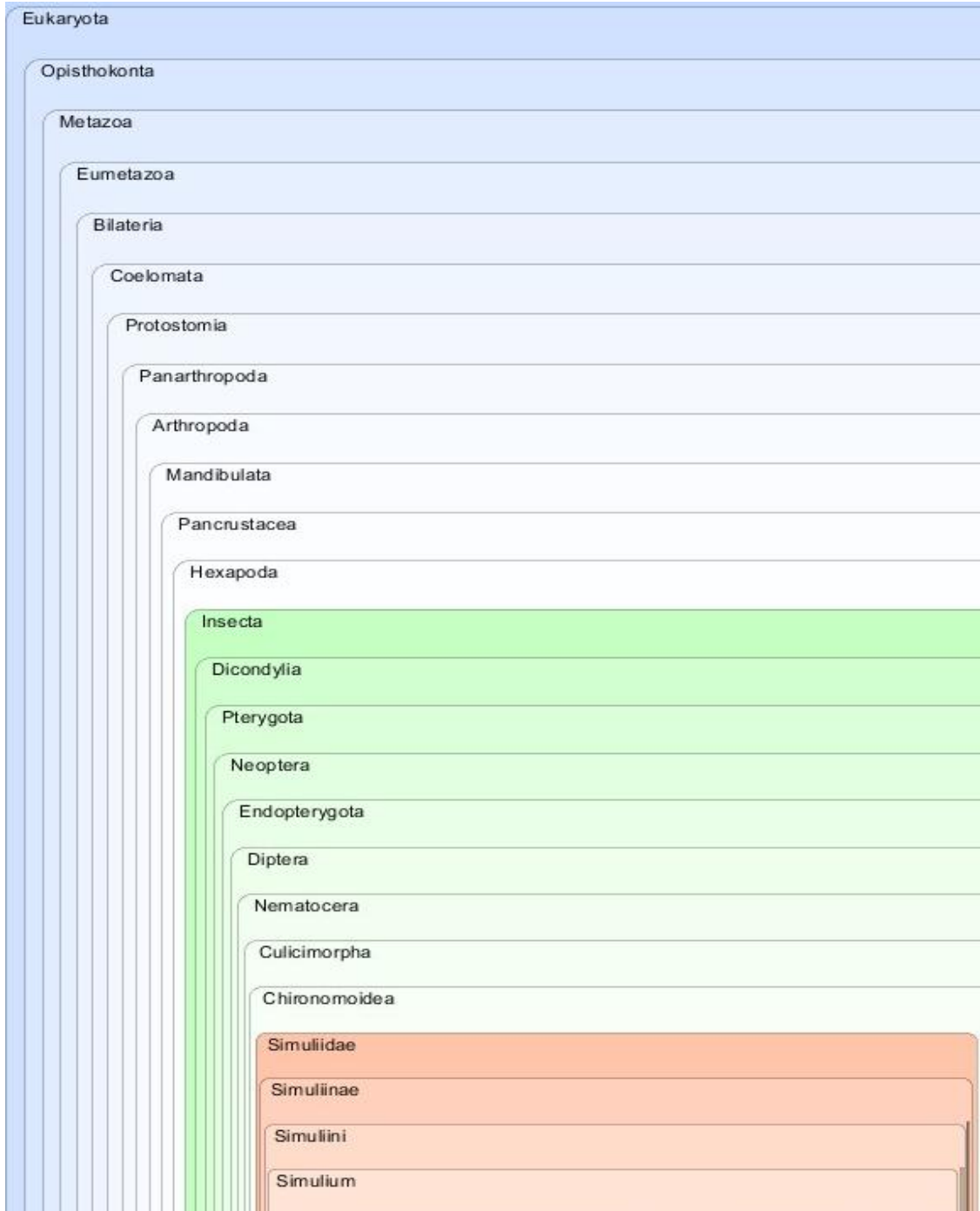
Bu tez çalışmasıyla, Erciyes dağı akarsularında pest olma potansiyeline sahip Simuliid türlerinin morfolojik ve kromozomal identifikasyonlarını takiben, mitokondrial cytochrome oxidase I (COI) ve ribozomal ITS2 gen bölgelerinin sekans analizleriyle moleküler klasifikasyonları yapılmış ve araştırma yöresinde simuliid kompozisyonu moleküler konfirmasyonlarla ortaya konmuştur. Çalışmada aynı zamanda yörede tür ve suş kompozisyonlarının belirlenmesi ve DNA dizi analizi sonucu elde edilen gen dizilimlerinin Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak GenBank'a kayıtları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *SIMULIUM* TÜRLERİNİN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ

Simulium türleri, *Diptera* dizisi içerisinde *Nematocera* dizi bölümünde ve *Simuliidae* (Karasinekler, Blackflies) ailesinde yer almaktadır. Simuliidae ailesi dünyanın her bölgesinde görülebilen önemli ailelerden birisidir. Bu ailede günümüze kadar 2101'i yaşayan, 12'si ortadan kalkmış (fossil) toplam 2113 tür tanımlanmıştır. Bunların 1697'si *Simulium* soyunda yer almıştır (1). 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.

Simulium türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri Geneious 5.0 yazılımında hazırlanarak Şekil 2.1'de verilmiştir (3).



Şekil 2.1. *Simulium* türlerinin sistematikteki yeri (**Kaynak:** Adler ve Crosskey, 2009:3).

2.2. *SIMULIUM* TÜRLERİNİN MORFOLOJİSİ

Simuliidler; küçük, esmer, kalın vücutlu, kambur sırtlı Nematocerlerdir (Şekil 2.2). *Simuliumlar* 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 cinstе de aynı olup ve genellikle 11 segmentlidirler. Palpler 5 segmentli ve 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 görünümlerine 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 (4, 5).



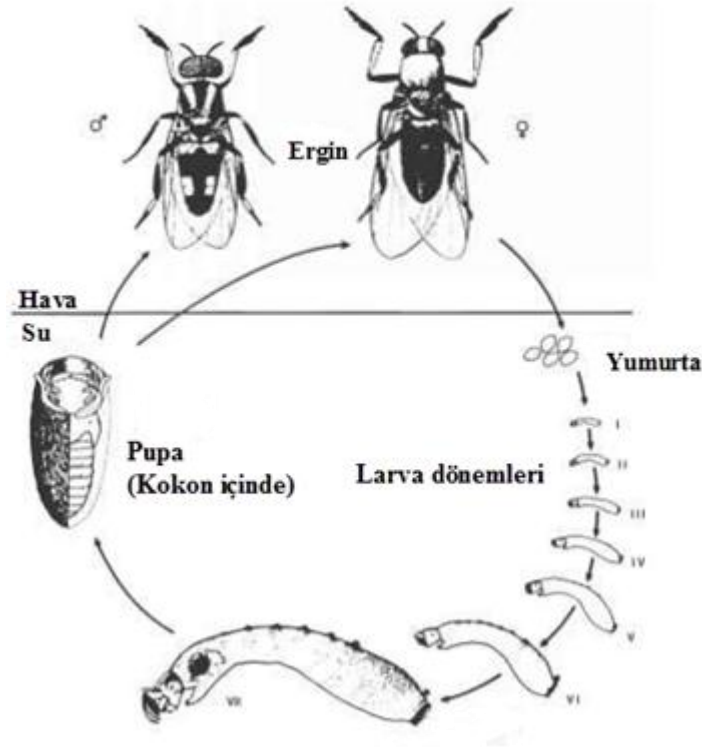
Şekil 2.2. *Simulium* sp. morfolojisi

(<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. Yumurtaları yaygın olarak 30-800 arasında, ortalama 200-300'lük gruplar halinde akan suların kenarlarına ya da

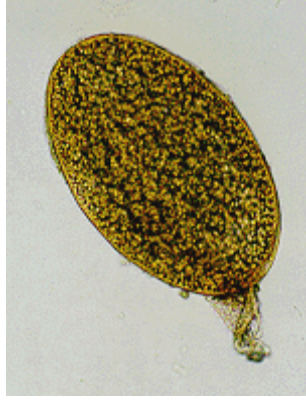
direkt olarak suyun içine bırakırlar (5-7). *Simulium* türlerinin yaşam siklusu Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. *Simulium* türlerinde hayat siklusu (**Kaynak:** Beaty ve Marquardt, 1996: 8)

2.3.1. Yumurta

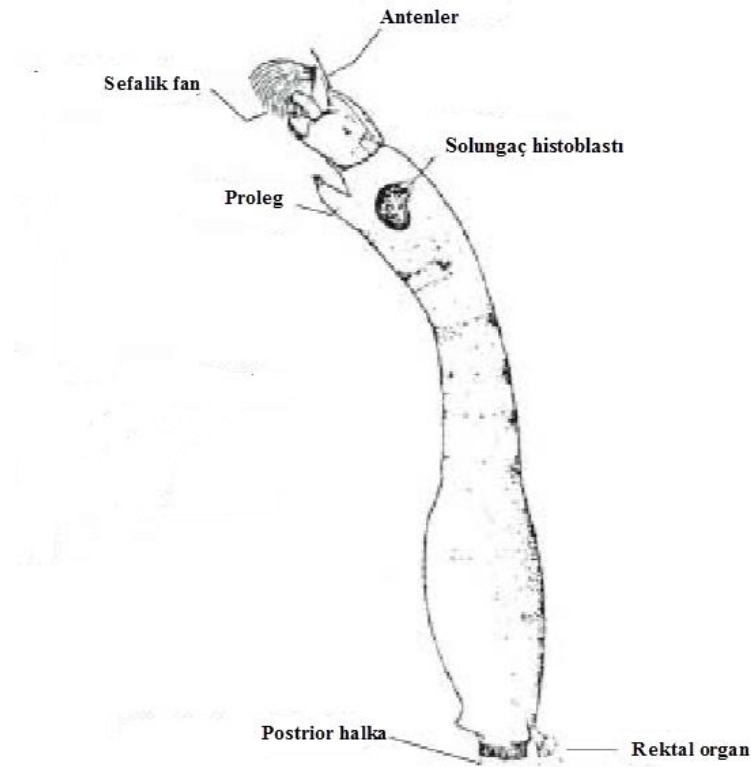
Yumurtalar, önce krem-beyaz, sonra embriyonal gelişim ile birlikte siyaha yakın bir renge dönüşürler (Şekil 2.4). 100-400 µm uzunluğunda ve oval-elipsoidal veya üç köşelidir. Yüzeyleri düzdür. Gözle görülebilir yumurta kabuğu iç yumurta membranı ve endokoryondur ya da çok az koryonik plastron gelişmiştir (6, 7). 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 (5-7).



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

2.3.2. Larva

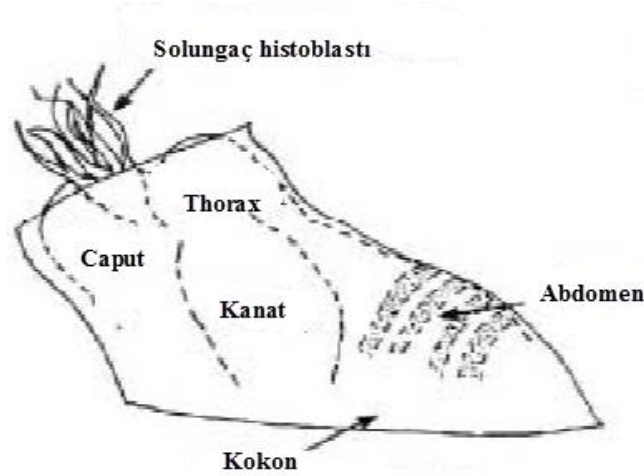
Çevre ve suyun sıcaklığına bağlı olarak yumurtalardan 4-5 günde larvalar çıkar. Larvalar kurtçuk şeklinde silindirik yapıdadır (Şekil 2.5). Yumurtadan çıkan larva kuyruk emicisi (*sucker*) ile taş, kütük veya su bitkileri gibi herhangi bir objeye tutunur ve ipeksi ipliği ile ıslanmaktan korunur. Larvalarda 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 (5-7).



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

2.3.3. Pupa

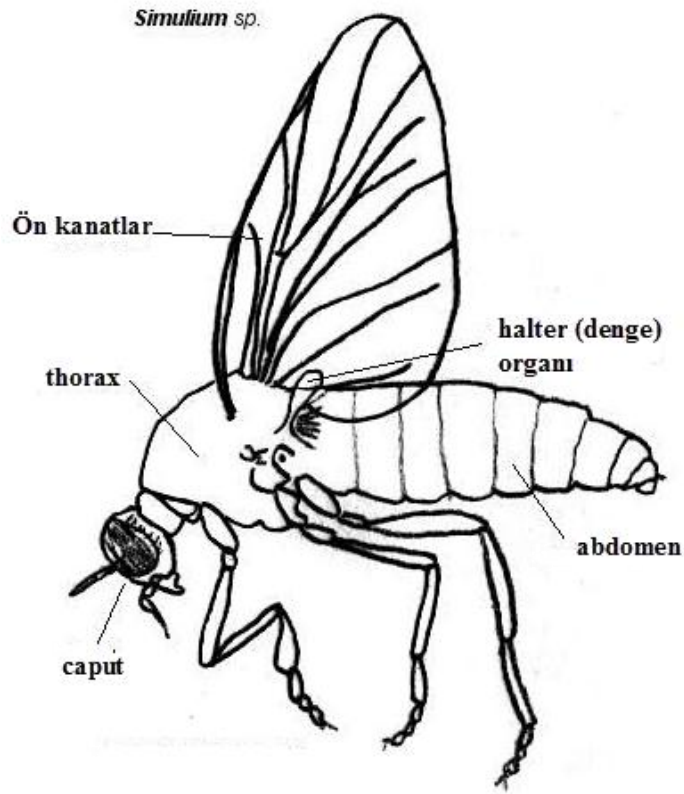
Son larva döneminden sonraki gelişim evresidir. Pupalar çoğunlukla bir kokon içinde bulunur. Pupanın başı ve toraksı tek bir parça halinde yani sefalotoraks içinde birleşmiştir ve segmentli bir karın bulunmaktadır (Şekil 2.6). Toraks, dikenleri ve koza iplikleri ile ilgili kancaları oluşturur ve pupa 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 erişkin geliştiğinden gitgide kararır. Pupa kabukları dağıldığında erişkin hava akımıyla sürüklenir ve hemen uçmaya başlar (5-7).



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 proboscise sahiptir. 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 (5-7). 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 (9).



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 nehirlere akan su kesimlerinde üremektedirler. Simuliidae ailesi üyeleri holometabol gelişim gösterirler. Ergin sinekler üreme yerlerinde birbirlerine yaklaşırlar ve çiftleşme yerde şekillenir. Simulidler ovipardırlar. Erkek simulidler 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. (5-7).

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 özütü ile beslenirler. Dişi simulidlerin 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 özütü ile beslenen erkekler ortalama 10 gün yaşarlar (5-7).

2.6. *SIMULIUM* TÜRLERİNİN ZARARLARI VE VEKTÖRLÜK ROLLERİ

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. Simulid 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 (1, 5-7).

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 (1, 5-7).

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 (1, 5-7).

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 (10, 11).

2.7. TÜRKİYE’DE SİMULİİD SİNEKLER ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

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 (12). Daha sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bir kadına ait idrar örneğinde *Simulium* sp. larvası bildirilmiştir (13). Türkiye’nin *Simulium* faunasına katkı sağlayacak sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiştir (2, 12, 14-24). Bu çalışmalardan Kazancı ve Cleargue-Gazeau, (14) Türkiye’de Simuliidae faunası üzerine ilk detaylı çalışmayı yapmışlar ve 22 tür (20’si yeni kayıt) rapor etmişlerdir. Takiben Cleargue-Gazeau ve Kazancı, (15) Türkiye’de 26 türü (7’si yeni kayıt) bildirmişlerdir. Balık ve ark., (16), Dikili-Ayvalık yöresinde Yelköprü mağarası ve civarının sucul faunasının tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada *Eusimulium angustitarse*’yi rapor etmişlerdir. Şirin ve Şahin (17), Sakarya Nehir Havzası’nda 23 türü (10’u yeni kayıt) rapor etmişlerdir. Crosskey ve Zwick (18), Türkiye’nin Anadolu

bölümünde 9 yeni türü tarif etmişlerdir. Yine Zwick (19), daha önce kaydedilmiş türlerin yeni istasyonlardan kayıtlarını vermiştir. Kazancı ve Ertunç (20), Türkiye Simuliidae faunasına ilişkin 19 türü (5'i yeni kayıt) ve bu türlerin bazı ekolojik özelliklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (20), Türkiye'nin kuzey, batı ve güneyinden topladıkları örneklerde 15 tür (5'i yeni kayıt) tanımlamışlardır. Ertunç ve ark., (22), Yedi Göller Milli Parkı'nda Simuliidae faunası üzerine yaptıkları araştırmada 7 tür tanımlamışlardır. Ertunç (23), 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 (24), Yeşilırmak Nehir Havzası'nın Simuliidae faunasını ve Simuliidae türlerinin su kalitesi ile ilişkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 10 tür (1'i Yeşilırmak Havzası için ilk kayıt) tanımlamışlardır. Diğer yandan Yılmaz ve ark. (2) Kayseri-Nevşehir arasında kalan Orta Kızılırmak alanında *Simulium* enfestasyonlarının afet boyutundaki artışını rapor etmişlerdir. Yeşilöz (25) Türkiye'de ilk kez Kızılırmak nehrinin Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen bölümünde *Simulium* (*Wilhelmia*) *equinum*'un varlığını ortaya koymuştur. Gazyağcı (26) Kırıkkale ve Ankara yöresi Kızılırmak nehrinde *Simulium* türlerinin yayılışını izlemek üzere yaptıkları çalışmada *S. petricolum*, *S. equinum*, *S. pseudequinum*, *S. lineatum*, *S. balcanicum*, *S. erythrocephalum* ve *S. alajense* tür düzeyinde (7 tür), *S. angustipes* ve *S. ornatum* ise grup düzeyinde (2 grup) teşhis edip bu türlerden *S. petricolum*, *S. equinum* ve *S. erythrocephalum*'un Kızılırmak nehri havzasında ilk kayıt edilen türler olduğunu rapor etmiştir. Başören ve Kazancı (27) Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 27 istasyondan örnekledikleri *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.

İnci ve ark. (28) Orta Kızılırmak Havzasından topladıkları simuliid larva örneklerinde morfolojik analizlerle *Simulium* *Wilhelmia* *lineatum*, *S. Wilhelmia* *balcanicum* ve *S.*

Wilhelmia spp.'yi identifiye etmişlerdir. Aynı araştırmacılar (28) sitogenetik kromozomal analizlerle larvaların *S. lineatum* ve *S. balcanicum* olduğunu teyit etmişlerdir.

2.8.SİMULİİD SİNEKLER ÜZERİNE YAPILAN MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Simulidlerin taksonomik klasifikasyonu konvansiyonel olarak larvada kromozomal analiz, pupada morfoloji ve erginlerinde dış yapı morfolojisine dayanmaktadır. Tür ayrımı morfolojik ve sitolojik olarak çok zordur (5, 29, 30). Bunun yanında bu aile için geniş çaplı kladistik filogenetik çalışmalar sadece birkaç çalışma ile sınırlıdır (5, 31,32). Karasineklerin taksonomisi ile ilgili DNA sekans çalışmaları 16S ribozomal RNA ve transfer RNA (33,34) gen bölgelerinin araştırılmasıyla başlamıştır. Daha sonra ise 16s rRNA ve NADH subunit 4 (ND4) gen bölgeleri kısmen kullanışlı olmuştur (5, 35, 36). Son yıllarda ise *Simulium* türlerinin DNA tabanlı klasifikasyonunda ise ITS (Internal transcribed spacers) (37) ve COI (Cytochrome oxidase I) (38) gen bölgeleri polimorfik bölgeleri ve bu şekilde özgüllüğü yüksek moleküler klasifikasyon yapılmaya başlanmıştır.

Hebert ve ark. (39,40) 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 nüklear rDNA'nın ITS1 gen bölgesi Simuliidler üzerindeki ilk sistematik çalışmalardır. 18S ve 5.8S arasında bulunan ITS1 gen bölgesi çok değişken bir bölgedir (41). Simuliidler' deki ITS1 gen bölgesi çalışmaları onchocerciasis'in taşıyıcılığını yapan *Simulium damnosum* üzerinde yoğunlaşmıştır. *Simulium* türlerinin ITS1 gen bölgesi 240 nükleotitden 400 nükleotide kadar değişik uzunluktadır (42-44). Tayland da 29 *Simulium* türü bilinmektedir. Pramual ve ark. (45) Tayland da sitokrom oksidaz gen bölgesi tabanlı sekanslarda *Gomphostilbia* (*Simulium*) alt türünde 13 türü identifiye etmişlerdir.

16S rRNA ve ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) genlerinin mitokondriyal DNA sekanslarına bağlı olarak, Tang ve ark. (46) Batı Afrika'daki *Simulium damnosum*'un 6 suşu ile olan filogenetik yakınlığını göstermişlerdir. Aynı gen bölgeleri hem Afrika hemde Güney Amerikadaki farklı *Simulium* türlerinin filogenetik akrabalıkları üzerinde de çalışılmıştır (44, 47).

Krüger ve ark. (48), mitokondrial 16 S rRNA gen sekansı çalışmaları ile *Simulium damnosum*'un Doğu ve Batı Afrika suşlarının filogenetik akrabalığını ortaya

koymuşlardır. Higazi ve ark, (35), 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.

Türkiye'de Simuliid sineklerin moleküler identifikasyonu üzerine moleküler tabanlı sınırlı çalışma bulunmaktadır. Yeşilöz (25), Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen Kızılırmak nehrinden topladıkları *Simulium* örneklerinin parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 ve ribosomal complete internal transcript spacer 2 ve parsiyel 28S gen bölgelerinin moleküler analizleri sonucunda Türkiye'de ilk olarak *S. (Wilhelmia) equinum* 'un varlığını ortaya koymuştur. İnci ve ark. (28), Orta Kızılırmak havzasından topladıkları *Simulium* örneklerinde ribosomal internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve mitokondriyal cytochrome oxidase I (mt-COI) sekans çalışmaları sonucunda *S. balcanicum*, *S. lineatum* ve *S. equinum* türlerini tanımlamışlardır.

2.9. SIMULIUM TÜRLERİ İLE MÜCADELE

Simuliid sinekler Insecta sınıfında mücadelesi en zor olan arthropodlardandır. *Simulium* türlerine karşı mücadelede en etkili başarının sağlandığı dönem larva dönemidir. Larva dönemlerinde doğru seçilmiş bir larvasit, tekniğine uygun olarak ve yeterli dozda kullanıldığında yüksek oranda başarı sağlanabilmektedir. 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 ve günümüzde dünyanın hemen her yerinde larva mücadelesinde, larvicid etkili *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) kullanılmıştır. Kana'da (49), Amerika Birleşik Devletleri (7), Brezilya (50), Arjantin (6), Hindistan (51), Türkiye (3) ve Afrika kıtasının birçok bölümünde Simuliidae mücadelesinde Bti sistematik şekilde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda akan suyun debisinde meydana getirilecek ani azaltma ve yükseltme gibi yöntemlerle su rejiminin değiştirilmesi mücadelede kullanılabilecek uygulamalar arasında bulunmaktadır (2).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1. Araştırma Sahası

Çalışma Mayıs-Eylül 2012 tarihleri arasında Erciyes dağındaki küçük akarsularda (Şekil 3.1) toplam 100 adet Simuliidae ailesine bağlı sinek larvaları üzerinde yürütülmüştür. Örneklemeye yapılan bölgelerde eş zamanlı olarak GPS ile bölgenin koordinatları ve haritası (Şekil 3.2) çıkarılmıştır (Tablo 3.1). Bununla birlikte simuliidlerin biyolojisinde önem arz eden bölgenin akarsu yatağı, vejetasyonu ve karakteri gibi çeşitli özellikleri de kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.1 Örnekleme istasyonu



Şekil 3.2. Simuliid larva örneklemesi yapılan istasyonların harita üzerinde görünümü

3.1.2. Simuliid larvalarının toplanması

Simuliid larvaları, dere yatağı içinde tutundukları taş ve bitkilerden ince uçlu bir pens yardımı ile ağız vida kapaklı vialler içerisine toplanmıştır. Fiksatif olarak simuliid larvaları için özellikle kromozom analizinde önerilen Carnoy's solüsyonu kullanılmıştır (52). Solüsyonlar soğuk zincirde tutulmuş ve sahada her tüp için 10dk ara ile 3 kez değiştirilmiştir. Laboratuvara ulaştırılan örnekler son kez solüsyonları değiştirilerek incelenene kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Larva örnekleme yapılan odaklar ve toplanan larva sayısı Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 *Simulium* larvalarının toplandığı odak ve larva sayıları

İstasyon	Koordinat	Larva sayısı
1	38° 32'.39.44''K; 35° 31'.43.20''D	35
2	38° 32'.32.96''K; 35° 31'.43.67''D	35
3	38° 32'.54.81''K; 35° 31'.39.61''D	30

3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Morfolojik İnceleme

Toplanan larvaların mikroskopik incelemesi Olympus SZ11 marka ve model alttan aydınlatmalı stereo mikroskopta yapılmış ve Olympus DP60 mikroskop kamerasında görüntüler kaydedilmiştir.

3.2.2. Kromozomal Analiz

Toplanan larva örneklerinden 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.

3.2.3. Moleküler İnceleme

3.2.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Simuliid türlerinin moleküler klasifikasyonu ve filogenisi için seçilen istasyonlardan toplanan larvalardan genomik DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde

yapılmıştır. Carnoy's solüsyonu içerisinde muhafaza edilen Simuliid larva örneklerinin her biri önce steril DNA'se RNA'se free mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve üzerlerine sıvı azot ilave edilerek steril pestle ile toz haline getirilmiştir. Daha sonra tüplerin üzerine 25µl proteinase K ve 200µl Tissue Lysis Buffer (Bioneer) ilave edilerek, 60°C'de 1 gece su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra tüpler ultrasantrifüje yerleştirilerek 14.000 rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir. Tüplerden santrifüj sonrası DNA ekstraksiyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA) ile üreticinin açıklamalarına göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- a) Kit içerisinde bulunan Eluent, önceden ısısı 65°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konulmuştur.
- b) Santrifüj sonrası supernatant alınarak üzerine 350 µl PBS (phosphate-buffered saline, not provided) ve 0.9 µl RNase A ilave edilmiş ve 30 sn el yardımıyla nazikçe çalkalanmıştır.
- c) Tüp içine 20 µl Proteinase K ve 150 µl Buffer C-L ilave edilerek hemen 1dk vortekslenmiştir.
- d) Tüpler 56°C'de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir (Her 2-5 dk'da bir vortekslenmiştir).
- e) Tüpler üzerine 350 µl Buffer P-D eklenerek 30 sn vortekslenmiştir.
- f) Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- g) Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine (provided) miniprep kolon yerleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep columnlar içerisine konularak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- h) Süre sonunda dibe çöken süpernatantlar dökülmüş ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep columnlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- i) Miniprep columndan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırılmış ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep kolonlar içerisine 700 µl of Buffer W2 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve bu işlemler 2 kez tekrarlanmıştır.

- j) Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirilmiştir. Herhangi bir solüsyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.
- k) Herbir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, önceden 65°C'lik su banyosuna konulmuş olan Eluent'den 100 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2 DNA amplifikasyonu ve Elektroforez

Larvalardan elde edilen genomik DNA ekstraktları ribosomal internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve 28S gen bölgesinin yaklaşık 430 bp gen fragmentini amplifiye eden ITS2F (5'-TTGAACGCATATCGCACTTCTTGC-3') ve ITS2R (5'-CCTTATTAATATGCTTAAATTCAGGG-3') (41); mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgesinin yaklaşık 658 bp gen fragmentini amplifiye eden LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGG GTGACCAAAAAATCA-3') (40) primerler ile PCR analizine tabii tutulmuştur.

Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Ribosomal ITS2 gen bölgesi ve mt-COI gen bölgesi için ilgili kaynaklarda (53, 54) belirtilen protokoller modifiye edilerek reaksiyon karışımı: 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 1.3 µM her bir primer, 2.3U Taq DNA polimerase ve 50ng template DNA kullanılmıştır.

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermalcycler cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur. Ribosomal ITS-2 gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli PCR şartları aşağıda verilmiştir (53).

- | | |
|--------------|-------------|
| 1. 95 °C 5dk | 1 siklus |
| 2. 94 °C 1dk | } 35 siklus |
| 3. 58 °C 1dk | |

4. 72 °C 2dk

5. 72 °C 10dk 1 siklus

Mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan termal profil aşağıda gösterilmiştir (47).

1. 96 °C 1dk 1 siklus

2. 94 °C 1dk
3. 55 °C 1dk
4. 72 °C 1.5dk

} 35 siklus

5. 72 °C 10dk 1 siklus

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerine ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen ampliconların görüntülenmesi amacıyla %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp 90 V'da 50 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.3.3. Sekanslama ve Filogenetik Analiz

3.2.3.3.1. Simuliid larvalarının ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin, klonlanması, sekansı ve filogenetik analizleri

Morfolojik ve kromozomal tür teşhisleri yapılmış larva örneklerinin PCR analizleri sonucu uygun bant profilleri gösterenlerden seçilen izolatlar full dizilimlerin elde edilmesi amacıyla klonlanmış ve sekanslanmışlardır.

Ligasyon basamağı: ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin 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	15 µl
PCR product (10 ng/ µl)	11.5 µl
DNA Blunting enzyme	1.5 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.

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 plasmidi içerip içermediğini anlamak için Koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl ITaq master mix’i, 0,4 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 20 µL’lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerda 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 ampliconlar %1.5’luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

Plasmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plasmid 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 plasmid izolasyonu için Axygen plasmid pürifikasyon kit prosedürü takip edilmiştir. Axygen plasmid pürifikasyon ticari kitinin önerileri doğrultusunda plasmid 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 $12,000\times\text{g}$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir
- 5- Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plasmid Miniprep column içine konulup $12,000\times\text{g}$ 'de 1 dk santrifüj yapılmıştır
- 6- Altteki 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 $12.000 \times\text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 8- Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve Miniprep column aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir
- 9- Tüp üzerine 700 μl Buffer W2 eklenerek $12.000 \times\text{g}$ '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 $12.000\times\text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11- Santrifüj sonrası Miniprep column temiz bir 1.5 ml'lik tüp içerisine yerleştirilmiş ve plasmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 60 μl Eluent eklenmiş ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra $12.000 \times\text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 12- Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plasmid 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 XbaI (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen plazmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Su	14 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	4 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl

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.

3.2.3.3.2. Klonlanan ITS-2 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Sekansı ve Filogenetik Analizleri

Her iki 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 BioEdit Sequence Alignment (55) ve Geneious 5.5.5 (56) yazılımları ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Mega 5.2 (57) ve Geneious 6.1.6 (56) genetik analiz yazılımlarıyla çoklu hizalamaları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. LARVA ÖRNEKLEMESİ VE ÇEVRESEL ÖZELLİKLER

Erciyes Dağı'nın yaklaşık 2173 m yüksekliğinde bulunan ve kar sularının erimesiyle birlikte akışkanlığı ve debisi artış gösteren akarsularda simuliid larvalarının Nisan-Mayıs ayları itibarıyla gelişimlerine başladıkları görülmüştür. Bu dönem itibarıyla ilgili istasyonlardan toplam 100 adet larva örnekleme yapılmıştır. Larvaların daha çok su içerisindeki vejetatif alanlara ve/veya taş yüzeylerine tutundukları tespit edilmiştir (Şekil 4.1-Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Taşlara tutunmuş *Simulium* sp. larvaları (Orijinal)



Şekil 4.2. Akarsu içerisinde *Simulium* larvaları (Orijinal)

4.2. MORFOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

Araştıma merkezinden 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.

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.

4.3. KROMOZOMAL ANALİZ SONUÇLARI

Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılan kromozomal analizler sonucunda Erciyes dağı akarsularından toplanan toplam 100 larvanın 20'sinin *S. bezzi* sitoform (Cyt) 2, 20'sinin *S. bezzi* Cyt 3, 50'sinin *S. ornatum* grup ve 10'unun ise *S. velutinum* olduğu tespit edilmiştir. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin kromozomal identifikasyon sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

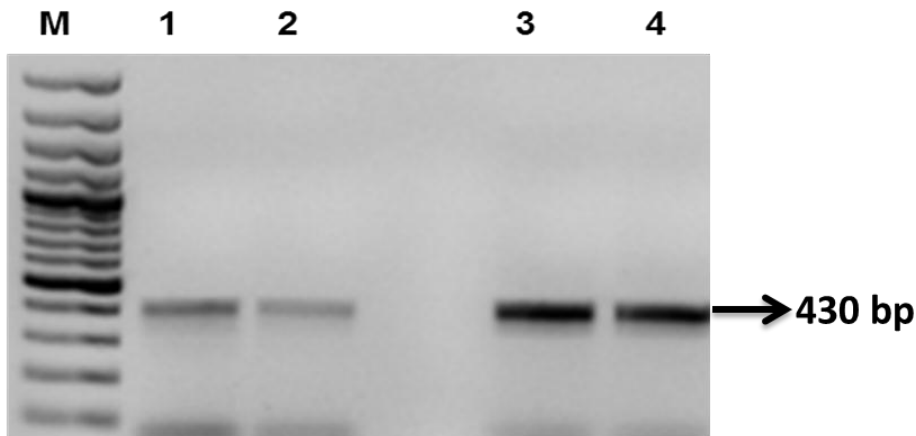
Tablo 4.1. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin kromozomal identifikasyon sonuçları

Tür	A	B	C	Toplam
<i>S. bezzi</i>	8	7	5	20
<i>S. bezzi</i>	10	6	4	20
<i>S. ornatum</i> grup	18	17	15	50
<i>S. velutinum</i>	3	3	4	10
Toplam	39	33	28	100

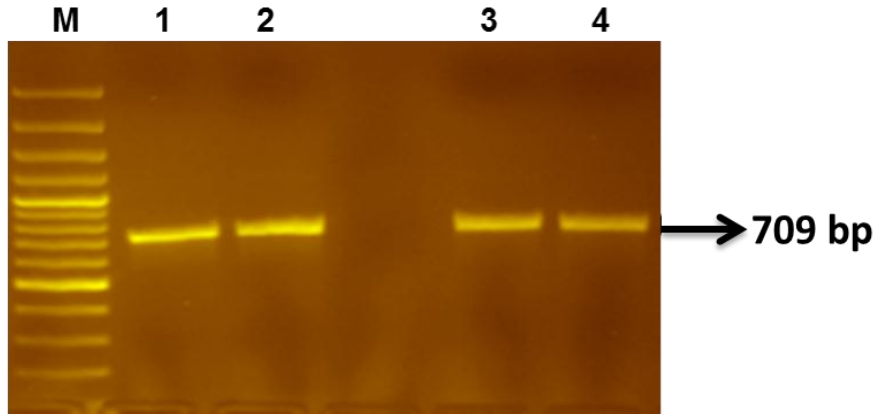
4.4. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

4.4.1. PCR Sonuçları

İncelemesi yapılan 3 istasyondan toplanan toplam 100 larvanın ribosomal ITS-2 ve 28S ile mt-COI gen bölgelerinin spesifik primerler ile parsiyel amplifikasyonları sonucu ürünlerin jel agarozda görünümü Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

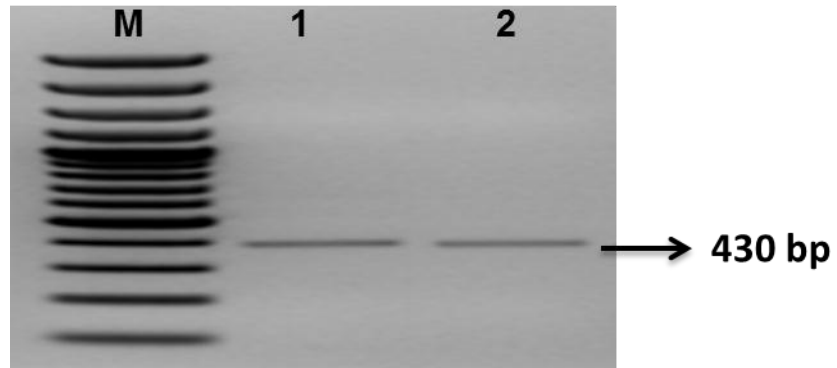


Şekil 4.3. Simuliid larvalarının complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesini amplifiye eden ITS2F ve ITS2R primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1,2,3,4: Pozitif örnekler

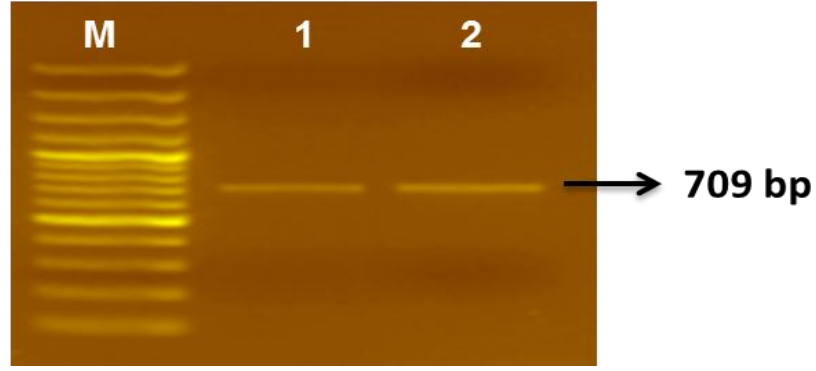


Şekil 4.4. Simuliid larvalarının parsiyel COI gen bölgesini amplifiye eden LCO1490 ve HCO2198 primerleri ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1,2,3,4: Pozitif örnekler

Elde edilen ampikonların jel pürifikasyonları sonrası DNA miktarları ölçülmüş ve uygun konsantrasyonda olanlardan istasyon 1'den 3, istasyon 2 ve 3'ten ise 1'er ampikon sekans analizi için ayrılmıştır. Jel pürifiye ampikonların agaroz jeldeki görünimleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. Simuliid larvalarının complete ITS-2 ve parsiyel 28S ribozomal gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,2: Pozitif örnekler

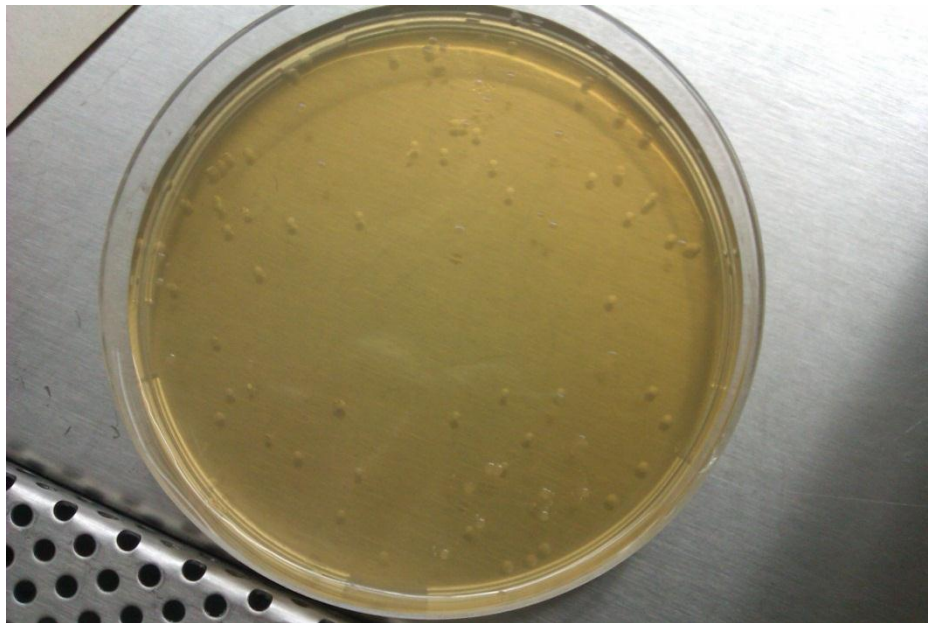


Şekil 4.6. Simuliid larvalarının parsiyel mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel pürifiye edilen örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,2: Pozitif örnekler

4.4.2. ITS-2 ve Mt-COI Gen Bölgelerinin Klonlama Sonuçları

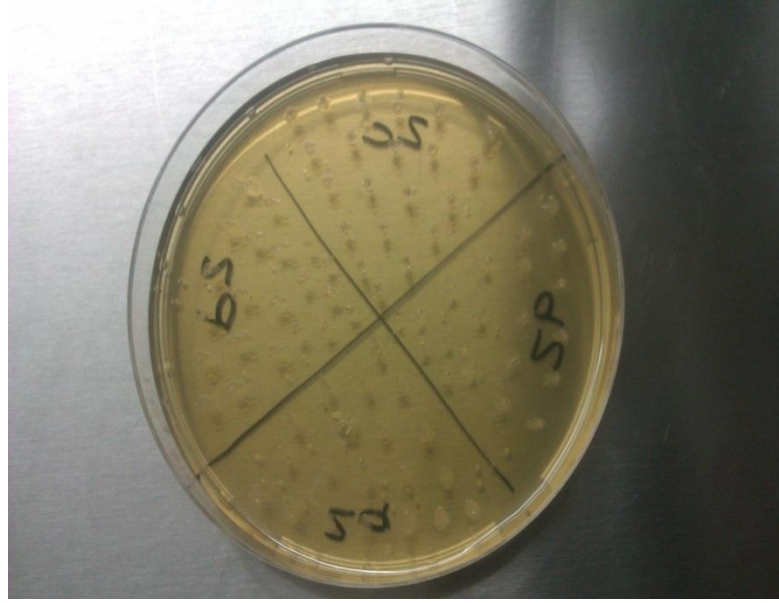
Erciyes dağı akarsularından toplanan, moleküler ve kromozomal analizleri yapılan *Simulium* örneklerinden ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu için dört izolat sekansların kayıpsız elde edilebilmesi için klonlanmıştır. Bu amaçla ilgili izolatların PCR analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen ampikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir.

Elde edilen jel pürifiye örnekler CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne insert edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünü *E. coli* TOP 10 kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrası ampicylin LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



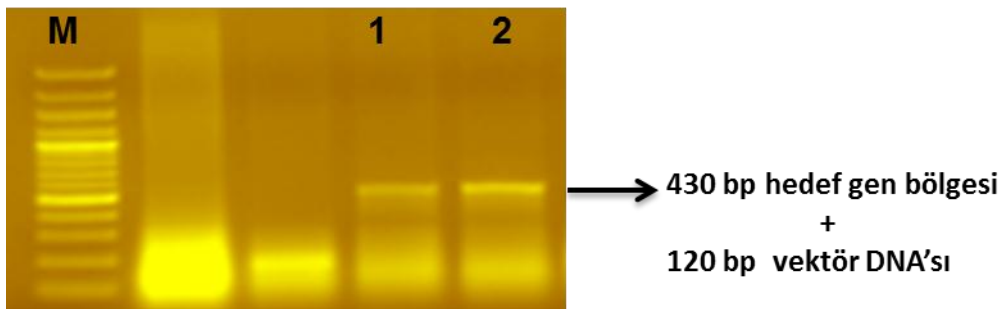
Şekil 4.7. Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besiyerine ekilmiştir. Tekrar 37 °C’de 1 gece inkübe edilen kolonilerin katı besiyerinde görünüşleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

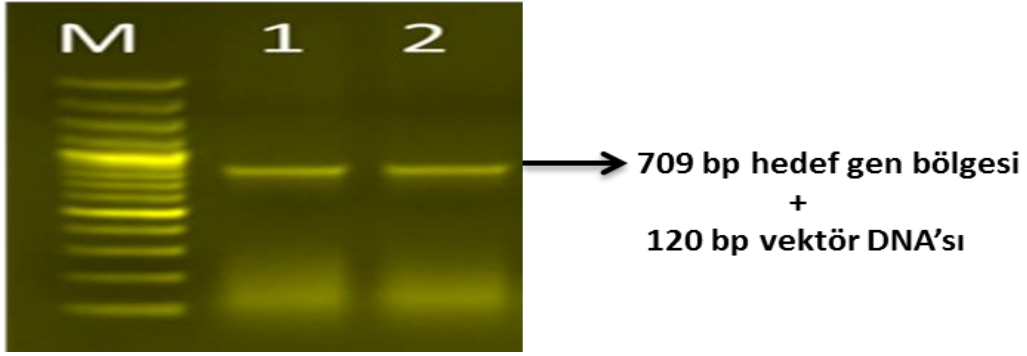


Şekil 4.8. Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre insert olduğu ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerlerle koloni PCR yapılarak teyit edilmiştir. ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin koloni PCR sonuçları sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da gösterilmiş olup her iki gen bölgesine ait DNA’ların vektörlere başarılı bir şekilde insert olduğu görülmüştür.



Şekil 4.9. Transforme hücrelerde ITS-2 gen bölgesinin koloni PCR’ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1,2: İnsert ITS-2 gen bölgesi



Şekil 4.10. Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampliconların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1,2: Insert mt-COI gen bölgesi

Koloni PCR sonuçlarını takiben ilgili gen bölgeleri yönünden pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besi yerine aktarılmış, bir gece 37°C'de inkubasyondan sonra üreyen transforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plasmid pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.4.3. ITS-2 Geninin Sekans ve Filogenetik Analizi

ITS-2 gen bölgeleri yönünden elde edilen plasmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgelerinin sekansları elde edilmiştir. ITS-2 gen bölgesi yönünden sekansları elde edilen izolatların izolasyon kaynağı ve yeri, incelenen gen bölgesi ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.2'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.11-4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.2. GenBank kayıtları yapılan *Simulium* izolatların incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri ve kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür	İzolasyon Yeri	DNA İzolasyon kaynağı	Gen Bölgesi	Aksesyon Numarası
TrERUSimbe3	<i>S. bezzii</i> Cyt 3	Erciyes dağı	Larva	Ribozomal 5.8S, ITS-2, 28S	KJ880280
TrERUSimor	<i>S. ornatum</i> grup	Erciyes dağı	Larva	Ribozomal 5.8S, ITS-2, 28S	KJ880279



Şekil 4.11. TrERUSimbe3 izolatının parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S nükleotid ve amino asit sekansları (KJ880280)



Şekil 4.12. TrERUSimor izolatının izolatının parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S nükleotid ve amino asit sekansları (KJ880289)

Erciyes dağı küçük akarsulardan elde edilen simuliid izolatlarıyla ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan ve Multiple alignmentta dâhil edilen Dünya'daki diğer bazı *Simulium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank veri tabanından alınarak Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Erciyes dağı akarsularından elde edilen *Simulium* izolatlarıyla dünyadan Ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgeleri yönünden Multiple alignment'a dâhil edilen diğer bazı *Simulium* izolatlarına ait aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	DNA izolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
SoAcre4A1	İngiltere	Larva	<i>S. ornatum</i>	EU429811
SoHole1A2	İngiltere	Larva	<i>S. ornatum</i>	EU429817
SoRtud2A6	İngiltere	Larva	<i>S. ornatum</i>	EU429857
SoWill2A1	İngiltere	Larva	<i>S. ornatum</i>	EU429870
SiHDam2A2	İngiltere	Larva	<i>S. intermedium</i>	EU429887
SiHDam3A1	İngiltere	Larva	<i>S. intermedium</i>	EU429890
StHeyS1A7	İngiltere	Pupa	<i>S. trifasciatum</i>	EU429913
StHeyS2A4	İngiltere	Pupa	<i>S. trifasciatum</i>	EU429919

Araştırma yöresinde nükleotid dizileri ortaya konan Erciyes dağı izolatları ile Dünyadan Multiple alignment'a dâhil edilen diğer *Simulium* izolatlarının parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.4'de, pairwise alignmentları ise Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	G+C (%)	A+T (%)	Toplam nükleotid sayısı
SoAcre4A1	29,8	16,9	36,7	16,6	33,5	66,5	662,0
SoHole1A2	29,9	17,1	36,4	16,6	33,7	66,3	662,0
SoRtud2A6	29,9	16,9	36,5	16,7	33,6	66,4	658,0
SoWill2A1	30,0	16,9	36,5	16,6	33,5	66,5	663,0
SiHDam2A2	30,0	17,0	36,6	16,4	33,3	66,7	666,0
SiHDam3A1	30,0	17,0	36,6	16,4	33,3	66,7	666,0
StHeyS1A7	29,9	17,1	36,5	16,5	33,6	66,4	666,0
StHeyS2A4	29,7	17,1	36,6	16,5	33,6	66,4	666,0
TrERUSimbe3	36,6	13,7	35,1	14,5	28,2	71,8	393,0
TrERUSimor	37,3	14,2	33,2	15,2	29,4	70,6	394,0
Ortalama	30,8	16,6	36,3	16,3	32,9	67,1	609,6

Tablo 4.5. Erciyes dağı akarsularında *Simulium* sp. izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *Simulium* sp. izolatlarının parsiyel 5.8 S, complete ITS-2, parsiyel 28S gen dizilimlerinin pairwise analizleri

	EU429817 Si...	EU429919 Si...	EU429913 Si...	EU429870 Si...	EU429890 Si...	EU429887 Si...	EU429857 Si...	EU429811 Si...	S. bezzi TrE...	S. ornatum g...
EU429817 <i>Simulium</i> ornatu...		99.4%	98.7%	99.7%	98.7%	98.7%	98.6%	99.2%	95.6%	99.7%
EU429919 <i>Simulium</i> trifasci...	99.4%		99.3%	99.1%	99.3%	99.3%	98.1%	99.0%	95.6%	99.7%
EU429913 <i>Simulium</i> trifasci...	98.7%	99.3%		98.8%	99.7%	99.4%	97.5%	98.2%	95.1%	99.7%
EU429870 <i>Simulium</i> ornatu...	99.7%	99.1%	98.8%		98.8%	98.8%	98.6%	98.9%	95.3%	99.4%
EU429890 <i>Simulium</i> interm...	98.7%	99.3%	99.7%	98.8%		99.7%	97.5%	98.2%	95.1%	99.2%
EU429887 <i>Simulium</i> interm...	98.7%	99.3%	99.4%	98.8%	99.7%		97.5%	98.2%	95.1%	99.2%
EU429857 <i>Simulium</i> ornatu...	98.6%	98.1%	97.5%	98.6%	97.5%	97.5%		99.1%	96.2%	99.2%
EU429811 <i>Simulium</i> ornatu...	99.2%	99.0%	98.2%	98.9%	98.2%	98.2%	99.1%		96.2%	99.2%
S. bezzi TrERUSimbe3 Kays...	95.6%	95.6%	95.1%	95.3%	95.1%	95.1%	96.2%	96.2%		95.7%
S. ornatum grup TrERUSim...	99.7%	99.7%	99.7%	99.4%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	95.7%	

Araştırma yöresinde sekans analizi yapılan Erciyes dağı izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı *Simulium* izolatlarının, ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgelerinin Multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

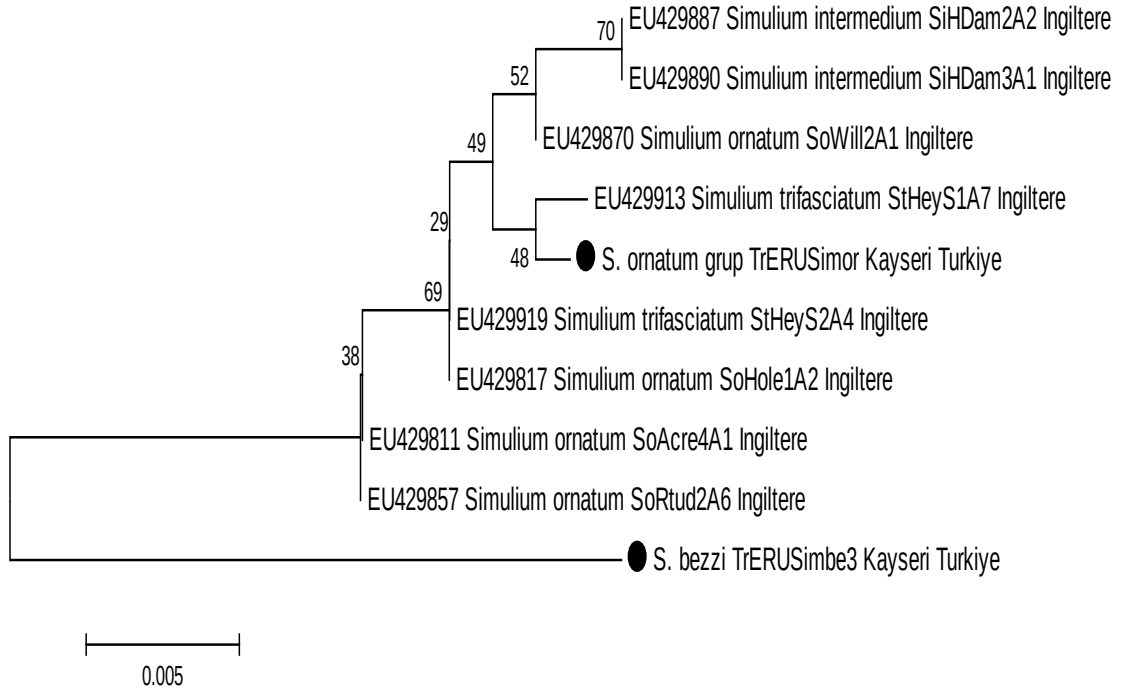
	300	310	320	330	340	350	360
1. EU429817 Simulium ornatum isol...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
2. EU429919 Simulium trifasciatum i...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
3. EU429913 Simulium trifasciatum i...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
4. EU429870 Simulium ornatum isol...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
5. EU429890 Simulium intermedium ...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
6. EU429887 Simulium intermedium ...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
7. EU429857 Simulium ornatum isol...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
8. EU429811 Simulium ornatum isol...	GAACATCGACAAGTTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
9. S. bezzi TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	TTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	TTGAACGCATATCGCACTTCTTGCTTTTATTCTATTTAGTTAGGATGGCTTGAGGTTCA						
	370	380	390	400	410	420	430
1. EU429817 Simulium ornatum isol...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
2. EU429919 Simulium trifasciatum i...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
3. EU429913 Simulium trifasciatum i...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
4. EU429870 Simulium ornatum isol...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
5. EU429890 Simulium intermedium ...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
6. EU429887 Simulium intermedium ...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
7. EU429857 Simulium ornatum isol...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
8. EU429811 Simulium ornatum isol...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
9. S. bezzi TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	TATGGTTGAGTGCTATAATTTATCAATAGAACGTTCTTTTCGCAAGAAAGACGCACGTATCAACTATGAAGAA						
	440	450	460	470	480	490	500
1. EU429817 Simulium ornatum isol...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
2. EU429919 Simulium trifasciatum i...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
3. EU429913 Simulium trifasciatum i...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
4. EU429870 Simulium ornatum isol...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
5. EU429890 Simulium intermedium ...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
6. EU429887 Simulium intermedium ...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
7. EU429857 Simulium ornatum isol...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
8. EU429811 Simulium ornatum isol...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
9. S. bezzi TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	ATTGATTTTTTTTCATATTTGATTAATCAAGAGATATG-AAAATTCGAAAAAGGTTTACCTCATGGGTAGCC						
	520	530	540	550	560	570	580
1. EU429817 Simulium ornatum isol...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
2. EU429919 Simulium trifasciatum i...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
3. EU429913 Simulium trifasciatum i...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
4. EU429870 Simulium ornatum isol...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
5. EU429890 Simulium intermedium ...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
6. EU429887 Simulium intermedium ...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
7. EU429857 Simulium ornatum isol...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
8. EU429811 Simulium ornatum isol...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
9. S. bezzi TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	TATTCAAGATTTTATATAAATACTATCATTTCTTCGTA-AAAAATGAATGATTACATGTATTATTTTAAATCCT						

	590	600	610	620	630	640	650
1. EU429817 <i>Simulium ornatum</i> isol...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
2. EU429919 <i>Simulium trifasciatum</i> i...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
3. EU429913 <i>Simulium trifasciatum</i> i...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
4. EU429870 <i>Simulium ornatum</i> isol...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
5. EU429890 <i>Simulium intermedium</i> ...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
6. EU429887 <i>Simulium intermedium</i> ...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
7. EU429857 <i>Simulium ornatum</i> isol...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
8. EU429811 <i>Simulium ornatum</i> isol...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
9. S. bezzii TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAAATT--ATT--TTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	ATGCTTGAATAGTGCGTACTGAGATAAACATTTGATTTTTTTGAATTATATACTAAAAATTATACATAGCCTC						
	660	670	680	690	700	710	
1. EU429817 <i>Simulium ornatum</i> isol...	AACTCATGTGAG						
2. EU429919 <i>Simulium trifasciatum</i> i...	AACTCATGTGAG						
3. EU429913 <i>Simulium trifasciatum</i> i...	AACTCATGTGAG						
4. EU429870 <i>Simulium ornatum</i> isol...	AACTCATGTGAG						
5. EU429890 <i>Simulium intermedium</i> ...	AACTCATGTGAG						
6. EU429887 <i>Simulium intermedium</i> ...	AACTCATGTGAG						
7. EU429857 <i>Simulium ornatum</i> isol...	AACTCATGTGAG						
8. EU429811 <i>Simulium ornatum</i> isol...	AACTCATGTGAG						
9. S. bezzii TrERUSimbe3 Kayseri Tur...	AACTCATGTGAGACTACCCCTGAATTTAAGCATATTAATAAGG						
10. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	AACTCATGTGAGACTACCCCTGAATTTAAGCATATTAATAAGG						

Şekil 4.13. Araştırma yöresinde incelenen Erciyes dağı izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *Simulium* izolatlarının ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.13’de görüleceği üzere ribozomal ITS-2 gen bölgesine göre *Simulium* türleri ve izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri, delesyonları ve insertionları belirlenmiştir. Erciyes dağı izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer bazı *Simulium* izolatlarının ribozomal 5.8S, ITS-2 ve 28S gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Tamura Nei modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.14’de verilmiştir. ITS-2 gen bölgesine göre *S. bezzii* Dünyada ilk kez karakterize edilmiş olup TrERUSimbe3 izolatu GenBank’ta ilgili gen bölgesi yönünden kayıtlı *Simulium* izolatlarından en yüksek filogenetik yakınlığı %96,2 ile *S. ornatum* grubuna dâhil izolatlarla (GenBank (GenBank aksesyon: EU429857, EU429811) göstermiştir. Araştırma yöresinde karakterize edilen *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatu ise en yüksek identikliği %99,7 ile aynı grupta yer alan *S. trifasciatum* (GenBank aksesyon: EU429913, EU429919) ve *S. ornatum* (GenBank aksesyon: EU429817) izolatları ile göstermiştir. Aynı akarsu

içerisinden izole edilen *S. bezzii* TrERUSimbe3 ve *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatları arasında ise $3,7 \pm 1,0$ genetik farklılık tespit edilmiştir.



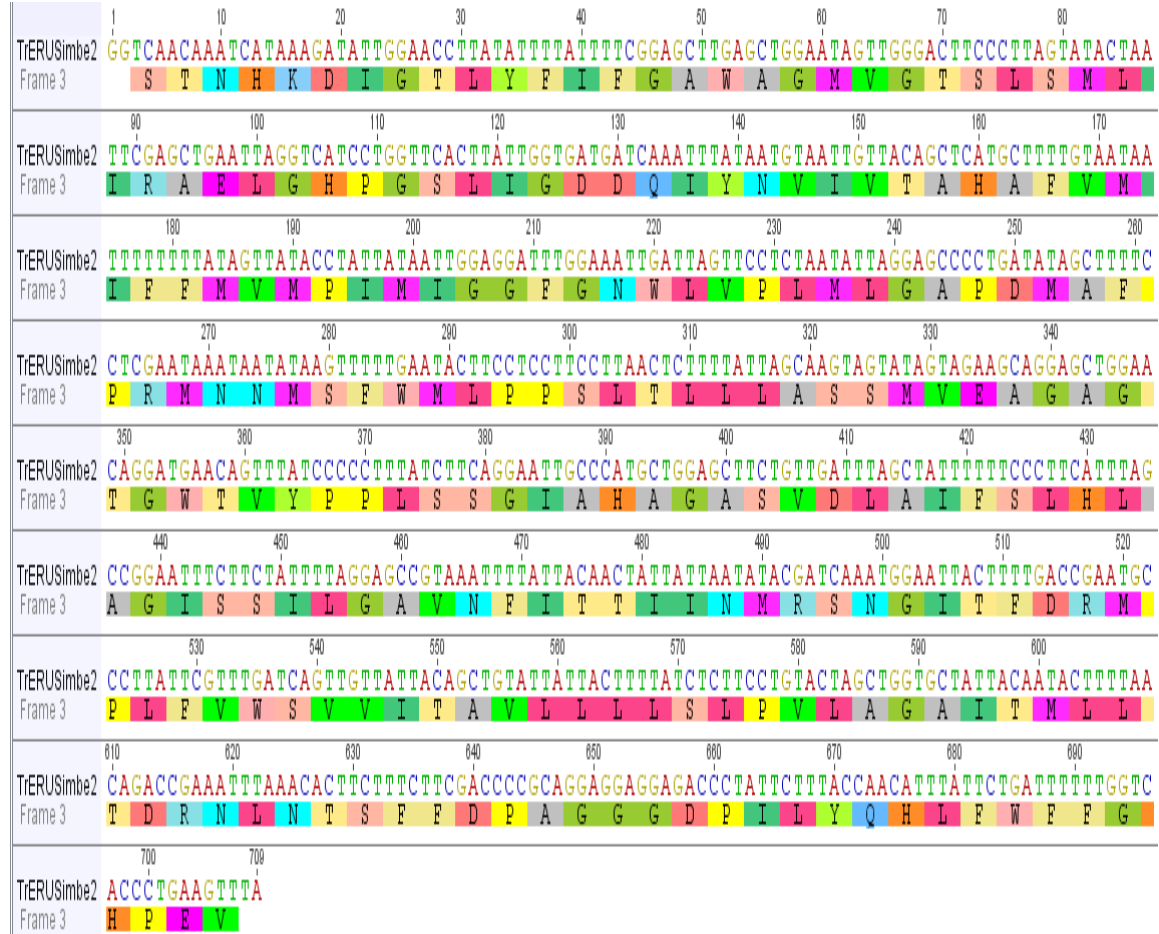
Şekil 4.14. Erciyes dağı izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *Simulium* izolatlarının ribozomal parsiyel 5.8S, complete ITS-2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining – Tamura Nei modeli).

4.4.4. Mt-COI Geninin Sekans ve Filogenetik Analizi

Mt-COI gen bölgesi yönünden elde edilen plasmidler, vektör spesifik primer çifti ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri vektör sekansı ile alignment yapılarak ilgili gen bölgelerinin sekansları elde edilmiştir. mt-COI gen bölgeleri yönünden sekansları elde edilen izolatların izolasyon kaynağı ve yeri, incelenen gen bölgesi ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.6'da, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.15-4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.6. GenBank kayıtları yapılan *Simulium* sp. izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri ve kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları

İzolat	İzolasyon Yeri	DNA İzolasyon kaynağı	Gen Bölgesi	Aksesyon Numarası
TrERUSimbe2	Erciyes dağı	Larva	Mt-COI	KJ880275
TrERUSimbe3	Erciyes dağı	Larva	Mt-COI	KJ880276
TrERUSimv	Erciyes dağı	Larva	Mt-COI	KJ880278
TrERUSimor	Erciyes dağı	Larva	Mt-COI	KJ880277



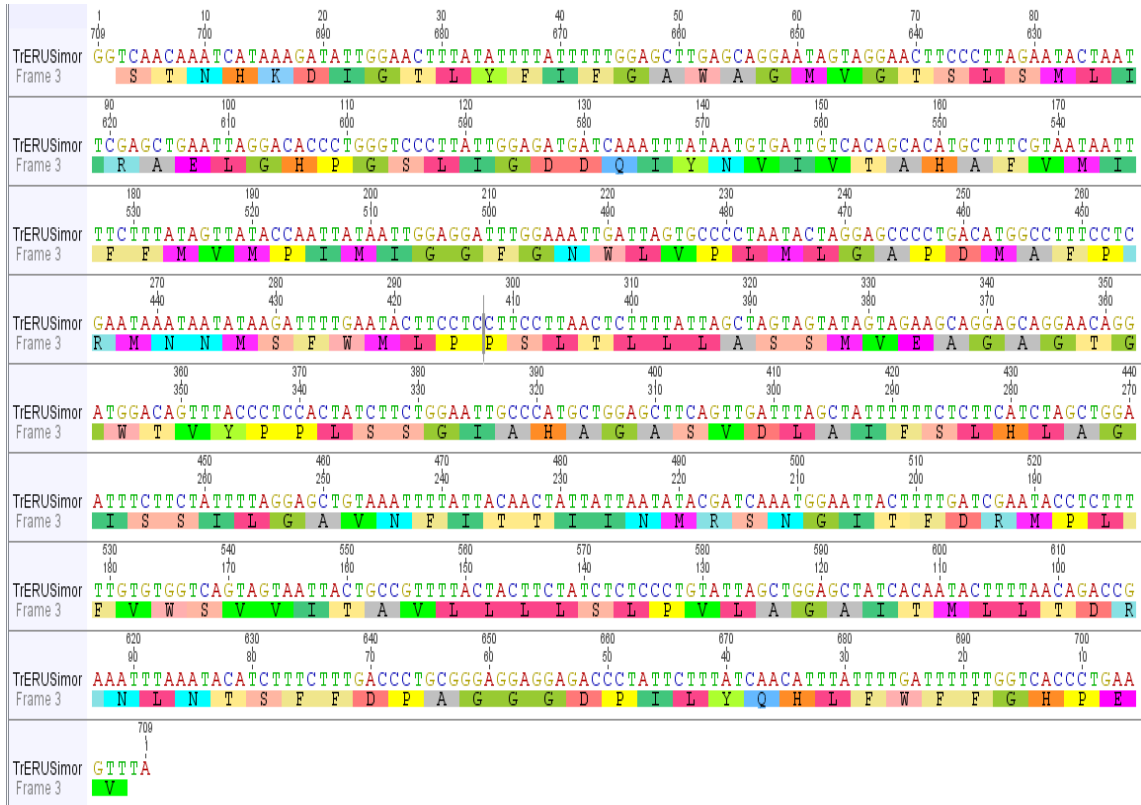
Şekil 4.15. TrERUSimbe2 izolatının mt-COI nükleotid ve aminoasit sekansları (KJ880275)

TrERUSimbe3 Frame 3	1 10 20 30 40 50 60 70 80	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATATTTTATTTTCGGAGCTTGAGCTGGAATAGTTGGGACTTCCCTTAGTATACTAA S T N H K D I G T L Y F I F G A W A G M V G T S L S M L
TrERUSimbe3 Frame 3	90 100 110 120 130 140 150 160 170	TTCGAGCTGAATTAGGTATCTGGTTCACCTATTAGTGATGATCAAAATTTAATGTAATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAA I R A E L G H P G S L I S D D Q I Y N V I V T A H A F V M
TrERUSimbe3 Frame 3	180 190 200 210 220 230 240 250 260	TTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGAGGATTGGAAATGATTAGTTCCTCTAATATTAGGAGCCCTGATATAGCTTTTC I F F M V M P I M I G G F G N W L V P L M L G A P D M A F
TrERUSimbe3 Frame 3	270 280 290 300 310 320 330 340	CTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTTCCTCCTTCCTTAACCTTTTTATTAGCAAGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGCTGGAA P R M N N M S F W M L P P S L T L L L A S S M V E A G A G
TrERUSimbe3 Frame 3	350 360 370 380 390 400 410 420 430	CAGGATGAACAGTTTATCCCCCTTATCTTCAGGAATTGCCATGCTGGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCCCTTCATTTAG T G W T V Y P P L S S G I A H A G A S V D L A I F S L H L
TrERUSimbe3 Frame 3	440 450 460 470 480 490 500 510 520	CCGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACAACATATTATAATATACGATCAAAATGGAATTACTTTTGACCGAATAC A G I S S I L G A V N F I T T I I N M R S N G I T F D R M
TrERUSimbe3 Frame 3	530 540 550 560 570 580 590 600	CCTTATTCGTTTGATCAGTAGTTATTACAGCTGTATTATTACTTTTCTCTTCCTAGCTAGCTGGTGCTATTACAATACCTTTTAA P L F V W S V V I T A V L L L L S L P V L A G A I T M L L
TrERUSimbe3 Frame 3	610 620 630 640 650 660 670 680 691	CAGATCGAAATTTAAACACTTCTTCTTCGATCCCGCAGGAGGAGAGCCCTATTCTTTACCAACATTTATTCTGATTTTGGGTC T D R N L N T S F F D P A G G G D P I L Y Q H L F W F F G
TrERUSimbe3 Frame 3	700 709	ACCCGAAGTTTA H P E V

Şekil 4.16. TrERUSimbe3 izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekansları (KJ880276)

TrERUSimv Frame 3	1 10 20 30 40 50 60 70 80	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGGAACCTTATACCTTATTTTCGGAGCTTGAGCAGGAATAGTAGGAATCTCTAAGTATACCTATT S T N H K D I G T L Y F I F G A W A G M V G T S L S M L I
TrERUSimv Frame 3	90 100 110 120 130 140 150 160 170	CGAGCAGAATTAGGACACCTGGTTCCTTAAATTTGGGATGACCAGATTTATAACGTAATTGTTACAGCCCATGCAATTGTAATAATTT R A E L G H P G S L I G D D Q I Y N V I V T A H A F V M I E
TrERUSimv Frame 3	180 190 200 210 220 230 240 250 260	TTTTATAGTAATACCAATTATAAATTGGAGGATTGGAAATGACTTGTAACCTTTAATGTTAGGGGCCCTGATATAGCTTTCCCTCGAA F M V M P I M I G G F G N W L V P L M L G A P D M A F P R
TrERUSimv Frame 3	270 280 290 300 310 320 330 340 350	TAAATAATATAAGTTTTGGTTATTACCACCATCTCTTACTCTATTATTAGCTAGTAGTATAATTGAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGA M N N M S F W L L P P S L T L L L A S S M I E A G A G T G W
TrERUSimv Frame 3	360 370 380 390 400 410 420 430 440	ACAGTTTACCCCTACTATCATCAGGAATCGCCATGCTGGAGCATCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTCTTCCCTGCGGGAATTTTC T V Y P P L S S G I A H A G A S V D L A I F S L H L A G I S
TrERUSimv Frame 3	450 460 470 480 490 500 510 520 530	TTCAAATTTAGGAGCTGTAATTTTATTACAACAATTATTAATATACGATCTAATGGAATTACATTTGACCGAATACCTTTATTGTGT S I L G A V N F I T T I I N M R S N G I T F D R M P L F V
TrERUSimv Frame 3	540 550 560 570 580 590 600 610 620	GATCAGTAGTAATACAGTAGTATTCTTTTTTCTACTCCAGTATTAGCCGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATCTA W S V V I T V V L L L S L P V L A G A I T M L L T D R N L
TrERUSimv Frame 3	630 640 650 660 670 680 690 700 709	AACACTTCTTTTTTTGACCCAGCAGGTGGGGGAGACCTATTCTTTTCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCCGAAGTTTA N T S F F D P A G G G D P I L Y Q H L F W F F G H P E V

Şekil 4.17. TrERUSimv izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekansları (KJ880278)



Şekil 4.18. TrERUSimor izolatının parsiyel mt-COI nükleotid ve aminoasit sekansları (KJ880277)

Erciyes dağından elde edilen simuliid izolatlarıyla mt-COI gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan ve Multiple alignmentta dâhil edilen Dünya'daki diğer bazı *Simulium* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler GenBank veri tabanından alınarak Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Erciyes dağı akarsularından elde edilen *Simulium* izolatlarıyla dünyadan mt-COI gen bölgeleri yönünden Multiple alignmentta dâhil edilen diğer bazı *Simulium* izolatlarına ait aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	DNA izolasyon kaynağı	Türler	Aksesyon Numarası
Sim-37be	Ermenistan	Larva	<i>S. bezzii</i>	KF640053
Sim-28va	Ermenistan	Larva	<i>S. bezzii</i>	KF640052
Sim-39kir	Ermenistan	Larva	<i>S. kiritshenkoi</i>	KF640057
Sim-30va	Ermenistan	Larva	<i>S. bezzii</i>	KF640050
Sim-36kir	Ermenistan	Larva	<i>S. kiritshenkoi</i>	KF640059
Sim-38kir	Ermenistan	Larva	<i>S. kiritshenkoi</i>	KF640058
Sim-27au	Ermenistan	Larva	<i>S. aureum</i>	KF640036

SpetOlli08	İngiltere	Larva	<i>S. petricolum</i>	GQ465949
JI-BOLD-99	Finlandiya	Larva	<i>S. velutinum</i>	JF872794
SvelWint01	İngiltere	Larva	<i>S. velutinum</i>	GQ465954
EusimGill01	İngiltere	Larva	<i>S. velutinum</i>	GQ465974

Araştırma yöresinde nükleotid dizileri ortaya konan Erciyes dağı izolatları ile Dünyadan Multiple alignment'a dâhil edilen diğer *Simulium* izolatlarının complete mt-COI gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.8'de, pairwise alignmentları ise Tablo 4. 9'da verilmiştir.

Tablo 4.8. Multiple alignmentları yapılan pozitif izolatlar ve Dünyadan diğer bazı izolatların nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	G+C (%)	A+T (%)	Toplam nükleotid sayısı
TrERUSimbe2	38,9	17,6	27,2	16,2	33,9	66,1	709,0
TrERUSimbe3	39,1	17,3	27,6	15,9	33,3	66,7	709,0
TrERUSimor	36,8	18,1	28,1	17,1	35,1	64,9	709,0
TrERUSimv	36,0	17,5	29,6	16,9	34,4	65,6	709,0
Sim-37be	39,0	18,0	27,0	15,9	34,0	66,0	615,0
Sim-28va	39,0	18,0	27,0	15,9	34,0	66,0	615,0
Sim-39kir	36,1	19,3	28,1	16,4	35,8	64,2	615,0
Sim-30va	39,1	17,9	27,2	15,8	33,7	66,3	614,0
Sim-36kir	36,1	19,5	28,0	16,4	35,9	64,1	615,0
Sim-38kir	35,9	19,7	27,8	16,6	36,3	63,7	615,0
Sim-27au	35,4	18,4	29,6	16,6	35,0	65,0	615,0
SpetOlli08	36,3	17,5	29,3	16,9	34,3	65,7	658,0
JI-BOLD-99	35,3	19,0	28,9	16,9	35,9	64,1	658,0
SvelWint01	35,3	19,0	28,6	17,2	36,2	63,8	658,0
EusimGill01	35,6	18,7	28,6	17,2	35,9	64,1	658,0
Ortalama	36,9	18,3	28,2	16,5	34,9	65,1	651,5

Tablo 4.9. Erciyes dağı akarsularında *Simulium* sp. izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *Simulium* sp. izolatlarının mt-COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri

	KF640053 Si...	KF640052 Si...	KF640057 Si...	KF640050 Si...	KF640059 Si...	KF640058 Si...	KF640036 Si...	GQ465949 Si...	JF872794 Si...	GQ465954 Si...	GQ465974 Si...	S. velutinum ...	S. bezzii Cyt...	S. ornatum g...	S. bezzii Cyt...
KF640053 <i>Simulium bezzii</i> S...		100%	90.2%	99.1%	90.6%	90.4%	86.8%	86.5%	86.2%	85.9%	85.7%	86.3%	99.2%	90.2%	99.7%
KF640052 <i>Simulium bezzii</i> S...	100%		90.2%	99.1%	90.6%	90.4%	86.8%	86.5%	86.2%	85.9%	85.7%	86.3%	99.2%	90.2%	99.7%
KF640057 <i>Simulium kirtshe...</i>	90.2%	90.2%		90.3%	99.5%	99.2%	86.5%	86.5%	87.3%	86.5%	87.0%	86.2%	90.4%	99.5%	90.6%
KF640050 <i>Simulium bezzii</i> ...	99.1%	99.1%	90.3%		90.7%	90.5%	87.1%	87.1%	86.4%	85.8%	85.6%	86.6%	99.3%	90.3%	99.4%
KF640059 <i>Simulium kirtshe...</i>	90.6%	90.6%	99.5%	90.7%		99.7%	86.5%	86.5%	87.3%	86.5%	86.7%	86.2%	90.7%	99.3%	90.9%
KF640058 <i>Simulium kirtshe...</i>	90.4%	90.4%	99.2%	90.5%	99.7%		86.5%	86.5%	87.3%	86.8%	87.0%	86.5%	90.6%	99.3%	90.7%
KF640036 <i>Simulium aureum</i> ...	86.8%	86.8%	86.5%	87.1%	86.5%	86.5%		98.0%	95.6%	95.0%	95.0%	98.9%	86.7%	86.2%	86.8%
GQ465949 <i>Simulium petrico...</i>	86.5%	86.5%	86.5%	87.1%	86.5%	86.5%	98.0%		95.9%	95.6%	95.6%	98.6%	86.8%	87.1%	86.9%
JF872794 <i>Simulium velutin...</i>	86.2%	86.2%	87.3%	86.4%	87.3%	87.3%	95.6%	95.9%		98.5%	97.9%	95.9%	86.3%	87.4%	86.2%
GQ465954 <i>Simulium velutin...</i>	85.9%	85.9%	86.5%	85.8%	86.5%	86.8%	95.0%	95.6%	98.5%		98.8%	95.6%	86.0%	86.9%	85.9%
GQ465974 <i>Simulium velutin...</i>	85.7%	85.7%	87.0%	85.6%	86.7%	87.0%	95.0%	95.6%	97.9%	98.8%		95.6%	85.9%	87.4%	85.7%
S. velutinum TrERUSimv Ka...	86.3%	86.3%	86.2%	86.6%	86.2%	86.5%	98.9%	98.6%	95.9%	95.6%	95.6%		87.3%	87.7%	87.4%
S. bezzii Cytoform 3 TrERU...	99.2%	99.2%	90.4%	99.3%	90.7%	90.6%	86.7%	86.8%	86.3%	86.0%	85.9%	87.3%		91.0%	99.3%
S. ornatum grup TrERUSim...	90.2%	90.2%	99.5%	90.3%	99.3%	99.3%	86.2%	87.1%	87.4%	86.9%	87.4%	87.7%	91.0%		91.1%
S. bezzii Cytoform 2 TrERU...	99.7%	99.7%	90.6%	99.4%	90.9%	90.7%	86.8%	86.9%	86.2%	85.9%	85.7%	87.4%	99.3%	91.1%	

Araştırma yöresinde sekans analizi yapılan Erciyes dağı izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı *Simulium* izolatlarının, mt-COI gen bölgesinin Multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

	1	10	20	30	40	50	60	70
1. KF640053 Simulium bezzii Sim-37...								GGGACTTC
2. KF640052 Simulium bezzii Sim-28...								GGGACTTC
3. KF640057 Simulium kiritshenkoi S...								GGAAC TTC
4. KF640050 Simulium bezzii Sim-3...								GGGACTTC
5. KF640059 Simulium kiritshenkoi ...								GGAAC TTC
6. KF640058 Simulium kiritshenkoi S...								GGAAC TTC
7. KF640036 Simulium aureum Sim...								GGAAC TTC
8. GQ465949 Simulium petricolum S...								
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...								
10. GQ465954 Simulium velutinum S...								
11. GQ465974 Simulium velutinum E...								
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...								
13. S. bezzii Cytoform 3 TrERUSimbe...								
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...								
15. S. bezzii Cytoform 2 TrERUSimbe...								
	80	90	100	110	120	130	140	
1. KF640053 Simulium bezzii Sim-37...	CCTTAGTATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	CA	CCTGGTTC	ACTTATTGG	GATGATCAAATTTATAATGTA			
2. KF640052 Simulium bezzii Sim-28...	CCTTAGTATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	CA	CCTGGTTC	ACTTATTGG	GATGATCAAATTTATAATGTA			
3. KF640057 Simulium kiritshenkoi S...	CCTTAGAATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	CTTATTGG	AGATGATCAAATTTATAATGTA			
4. KF640050 Simulium bezzii Sim-3...	CCTTAGTATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	CA	CCTGGTTC	ACTTATTGG	GATGATCAAATTTATAATGTA			
5. KF640059 Simulium kiritshenkoi ...	CCTTAGAATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	CTTATTGG	AGATGATCAAATTTATAATGTA			
6. KF640058 Simulium kiritshenkoi S...	CCTTAGAATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	CTTATTGG	AGATGATCAAATTTATAATGTA			
7. KF640036 Simulium aureum Sim...	CTAGTATACTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	CTAGTATACTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	CTAGTATACTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	CTAGTATACTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	CTAGTATGCTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	CTAGTATACTAATTCGAGCA	GAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	TAAATGGGGATGAC	CA	GATTATAAC	GTA
13. S. bezzii Cytoform 3 TrERUSimbe...	CCTTAGTATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	CA	CCTGGTTC	ACTTATTGG	GATGATCAAATTTATAATGTA			
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	CCTTAGAATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	ACACCC	TGGTTC	CTTATTGG	AGATGATCAAATTTATAATGTA			
15. S. bezzii Cytoform 2 TrERUSimbe...	CCTTAGTATACTAATTCGAGCTGAATTAGG	CA	CCTGGTTC	ACTTATTGG	GATGATCAAATTTATAATGTA			
	150	160	170	180	190	200	210	
1. KF640053 Simulium bezzii Sim-37...	ATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACC	ATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
2. KF640052 Simulium bezzii Sim-28...	ATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACC	ATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
3. KF640057 Simulium kiritshenkoi S...	ATTGTACAGCA	CATGCTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
4. KF640050 Simulium bezzii Sim-3...	ATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACC	ATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
5. KF640059 Simulium kiritshenkoi ...	ATTGTACAGCA	CATGCTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
6. KF640058 Simulium kiritshenkoi S...	ATTGTACAGCA	CATGCTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
7. KF640036 Simulium aureum Sim...	ATTGTTACAGCA	CATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT		
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	ATTGTTACAGCTCATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	ATTGTTACAGCTCATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	ATTGTTACAGCTCATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	ATTGTTACAGCTCATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	ATTGTTACAGCA	CATGCA	ATTGTAATAATTTT	TTTTTATAGTAATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT		
13. S. bezzii Cytoform 3 TrERUSimbe...	ATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACC	ATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	ATTGTACAGCA	CATGCTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACCAATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			
15. S. bezzii Cytoform 2 TrERUSimbe...	ATTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAAATAATTT	TTTTTATAGTTATACC	ATTATAA	TGGAGGATT	TGGAAAT			

	220	230	240	250	260	270	280	290
1. KF640053 Simulium bezzi Sim-37...	GATTAGT	CCTCTAATATTAGG	GCCCCGTGATATAGCTTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
2. KF640052 Simulium bezzi Sim-28...	GATTAGT	CCTCTAATATTAGG	GCCCCGTGATATAGCTTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
3. KF640057 Simulium kiritschenkoi S...	GATTAGT	GCCCTAATACTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
4. KF640050 Simulium bezzi Sim-3...	GATTAGT	CCTCTAATATTAGGAGCCCCGTGATATAGCTTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT				
5. KF640059 Simulium kiritschenkoi ...	GATTAGT	GCCCTAATACTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
6. KF640058 Simulium kiritschenkoi S...	GATTAGT	GCCCTAATACTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
7. KF640036 Simulium aureum Sim...	GA	TGTACCTTAATGTTAGG	GCCCCGTGATATAGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	GA	TGTACCTTAATGTTAGGAGCCCCGTGATATAGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT				
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	GA	TGTACCTTAATGTTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	GA	TGTACCTTAATGTTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	GA	TGTACCTTAATGTTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri...	GA	TGTACCTTAATGTTAGG	GCCCCGTGATATAGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	GATTAGT	CCTCTAATATTAGGAGCCCCGTGATATAGCTTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT				
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	GATTAGT	GCCCTAATACTAGGAGCCCCGTGA	ATGGCTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT			
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	GATTAGT	CCTCTAATATTAGGAGCCCCGTGATATAGCTTTT	CCTCGAATAAAATAATAAGTTTT	TGTAATACT				
	300	310	320	330	340	350	360	
1. KF640053 Simulium bezzi Sim-37...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGC	AGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATGAACAGTTTA					
2. KF640052 Simulium bezzi Sim-28...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGC	AGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATGAACAGTTTA					
3. KF640057 Simulium kiritschenkoi S...	TCCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGCTAGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGCAGGAACAGGATG	ACAGTTTAC						
4. KF640050 Simulium bezzi Sim-3...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGC	AGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATGAACAGTTTA					
5. KF640059 Simulium kiritschenkoi ...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGCTAGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATG	ACAGTTTAC					
6. KF640058 Simulium kiritschenkoi S...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGCTAGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATG	ACAGTTTAC					
7. KF640036 Simulium aureum Sim...	ACCACTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATAGT	GAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTAC						
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	ACCGCTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATAGT	GAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTAC						
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	ACCACTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATAGT	GAAGCAGGAGCAGGAACAGG	GAACAGTTTAC					
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	ACCACTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATAGT	GAAGCAGGAGCAGGAACAGG	GAACAGTTTAC					
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	ACCACTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATAGT	GAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTAC						
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri...	ACCACTCTTAACCTCTATTATTAGCTAGTAGTATA	GAAGCAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTAC						
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGC	AGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATGAACAGTTTA					
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGCTAGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGCAGGAACAGGATG	ACAGTTTAC						
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	TCCTCCTTCCTTAACCTTTTATTAGC	AGTAGTATAGTAGAAGCAGGAGC	GAACAGGATGAACAGTTTA					
	370	380	390	400	410	420	430	
1. KF640053 Simulium bezzi Sim-37...	CCCCCTATCTTCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTTC	GTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCAT	TAGCCG					
2. KF640052 Simulium bezzi Sim-28...	CCCCCTATCTTCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTTC	GTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCAT	TAGCCG					
3. KF640057 Simulium kiritschenkoi S...	CCCACTATCTTC	GGAATTGCCCATGCTGGAGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTAGC	CG					
4. KF640050 Simulium bezzi Sim-3...	CCCCCTATCTTCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTTC	GTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCAT	TAGCCG					
5. KF640059 Simulium kiritschenkoi ...	CCCCCACTATCTTC	GGAATTGCCCATGCTGGAGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTAGC	CG					
6. KF640058 Simulium kiritschenkoi S...	CCCCCACTATCTTC	GGAATTGCCCATGCTGGAGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTAGC	CG					
7. KF640036 Simulium aureum Sim...	CCCCCTATCTATCAGGAATGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCG						
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	CCCCCACTATCTATCAGGAATGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCA						
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	CCCCCACTTCTATCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCG						
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	CCCCCACTTCTATCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCG						
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	CCCACTTCTATCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCG						
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri...	CCCCCACTATCTATCAGGAATGCCCATGCTGGAGCTCAGT	AGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTGCG						
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	CCCCCTATCTTCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTTC	GTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCAT	TAGCCG					
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	CCCACTATCTTC	GGAATTGCCCATGCTGGAGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCATCTAGC	CG					
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	CCCCCTATCTTCAGGAATTGCCCATGCTGGAGCTTC	GTTGATTAGCTATTTTTTCTCTCAT	TAGCCG					

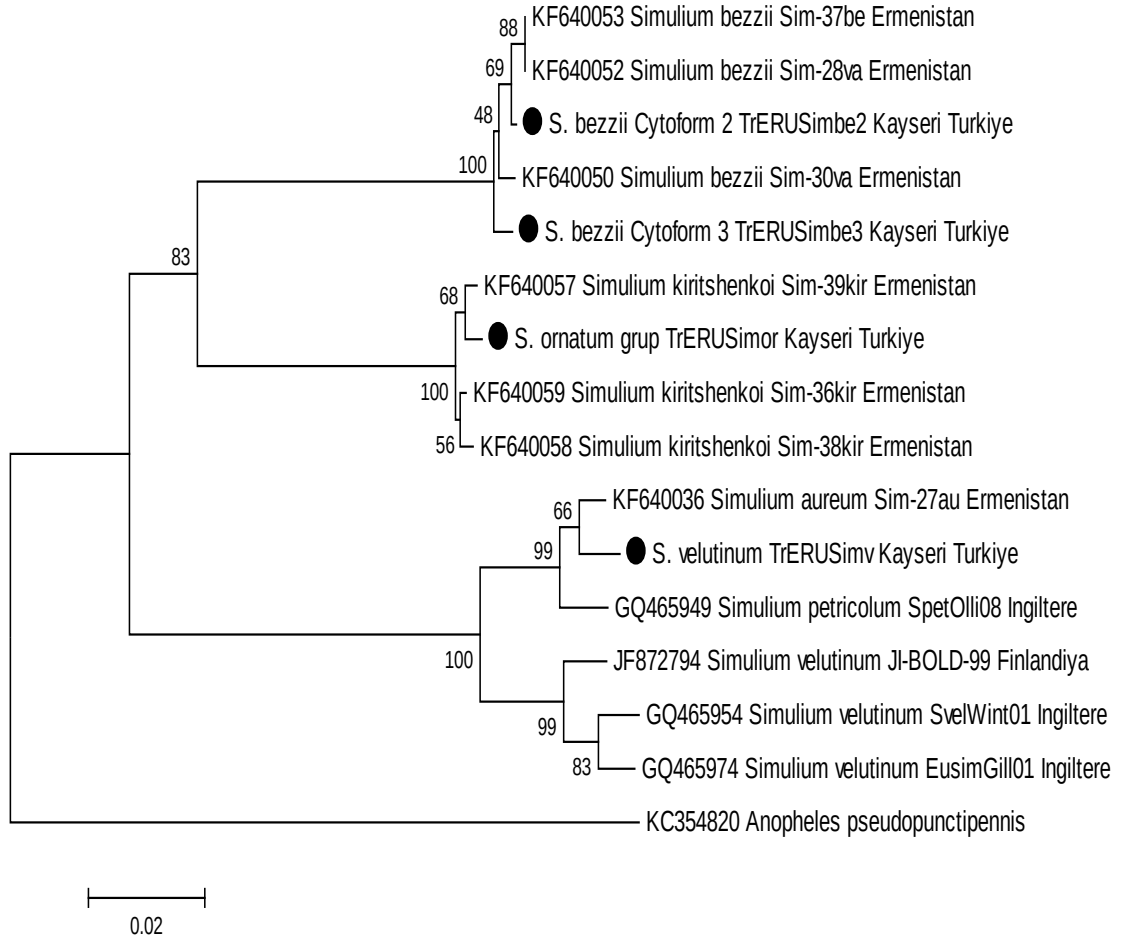
	440	450	460	470	480	490	500	510
1. KF840053 Simulium bezzi Sim-37...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
2. KF840052 Simulium bezzi Sim-28...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
3. KF840057 Simulium kirtshenkoi S...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
4. KF840050 Simulium bezzi Sim-3...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
5. KF840059 Simulium kirtshenkoi ...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
6. KF840058 Simulium kirtshenkoi S...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
7. KF840036 Simulium aureum Sim...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
9. JF872794 Simulium velutinum JfB...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	GAATTTCTCT	AATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAAC	AATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	GAATTTCTCTATTTTAGGAGC	GTAAATTTTATTACAAC	TATTATTAATATACGATCAAA	TGGAATTACTTT				
	520	530	540	550	560	570	580	
1. KF840053 Simulium bezzi Sim-37...	TGACCGAATGCC	TTATTGTTGATCAGTGT	ATTACAGCGTATTA	TACTTTTATCTCT	CCTGTA	CTA		
2. KF840052 Simulium bezzi Sim-28...	TGACCGAATGCC	TTATTGTTGATCAGTGT	ATTACAGCGTATTA	TACTTTTATCTCT	CCTGTA	CTA		
3. KF840057 Simulium kirtshenkoi S...	TGA	CGAATACCTCTTTTGTTGATCAGTAGTAATTAC	GCCTTTACTACTTTATCTCTCCCTGTATTA					
4. KF840050 Simulium bezzi Sim-3...	TGACCGAATACCT	TTATTGTTGATCAGTGT	ATTACAGCGTATTA	TACTTTTATCTCT	CCTGTA	CTA		
5. KF840059 Simulium kirtshenkoi ...	TGA	CGAATACCTCTTTTGTTGATCAGTAGTAATTAC	GCCTTTACTACTTTATCTCTCCCTGTATTA					
6. KF840058 Simulium kirtshenkoi S...	TGA	CGAATACCTCTTTTGTTGATCAGTAGTAATTAC	GCCTTTACTACTTTATCTCTCCCTGTATTA					
7. KF840036 Simulium aureum Sim...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
9. JF872794 Simulium velutinum JfB...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGTAATTAC	AGCAGTATTACTCTTTTATCTCTCCCTGTATTA						
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	TGACCGAATACCTTTATTGTTGATCAGTAGT	ATTACAGCGTATTA	TACTTTTATCTCT	CCTGTA	CTA			
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	TGA	CGAATACCTCTTTTGTTGTCAGTAGTAATTAC	GCCTTTACTACTTTATCTCTCCCTGTATTA					
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	TGACCGAATGCC	TTATTGTTGATCAGTGT	ATTACAGCGTATTA	TACTTTTATCTCT	CCTGTA	CTA		
	590	600	610	620	630	640	650	
1. KF840053 Simulium bezzi Sim-37...	GCTGG	GCTATTACAATACCTTTTAACAGA	CGAAATTTAAACACTTCTTTCTT	GACCC	GCAGGAGGAGGAG			
2. KF840052 Simulium bezzi Sim-28...	GCTGG	GCTATTACAATACCTTTTAACAGA	CGAAATTTAAACACTTCTTTCTT	GACCC	GCAGGAGGAGGAG			
3. KF840057 Simulium kirtshenkoi S...	GCTGGAGCTAT	ACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			
4. KF840050 Simulium bezzi Sim-3...	GCTGG	GCTATTACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			
5. KF840059 Simulium kirtshenkoi ...	GCTGGAGCTAT	ACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			
6. KF840058 Simulium kirtshenkoi S...	GC	GGAGCTATACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			
7. KF840036 Simulium aureum Sim...	GC	GGAGCTATTACATA	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG		
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	GCTGGAGCTATTACATA	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG			
9. JF872794 Simulium velutinum JfB...	GC	GGAGCTATTACATACT	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG		
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	GC	GGAGCTATTACATACT	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG		
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	GC	GGAGCTATTACATACT	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG		
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	GC	GGAGCTATTACATA	TTAACAGACCGAAATTTAAACACTTCTTT	TTTGACCCAGCAGG	GG	GGAG		
13. S. bezzi Cytoform 3 TrERUSimbe...	GCTGG	GCTATTACAATACCTTTTAACAGA	CGAAATTTAAACACTTCTTTCTT	GACCC	GCAGGAGGAGGAG			
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	GCTGGAGCTAT	ACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			
15. S. bezzi Cytoform 2 TrERUSimbe...	GCTGG	GCTATTACAATACCTTTTAACAGACCGAAATTTAAAC	ACTCTTTCTTTGACCC	GC	GGAGGAGGAG			

	660	670	680	690	700	710
1. KF640053 Simulium bezzii Sim-37...	ACCCTATTCTTTA	CAACATTTA				
2. KF640052 Simulium bezzii Sim-28...	ACCCTATTCTTTA	CAACATTTA				
3. KF640057 Simulium kiritshenkoi S...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTA					
4. KF640050 Simulium bezzii Sim-3...	ACCCTATTCTTTA	CAACATTTA				
5. KF640059 Simulium kiritshenkoi ...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTA					
6. KF640058 Simulium kiritshenkoi S...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTA					
7. KF640036 Simulium aureum Sim-...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTA					
8. GQ465949 Simulium petricolum S...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTT					
9. JF872794 Simulium velutinum JI-B...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTT					
10. GQ465954 Simulium velutinum S...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTT					
11. GQ465974 Simulium velutinum E...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTT					
12. S. velutinum TrERUSimv Kayseri ...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGGTCACCCTGAAGTTTA					
13. S. bezzii Cytoform 3 TrERUSimb...	ACCCTATTCTTTA	CAACATTTATT	TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA			
14. S. ornatum grup TrERUSimor Kay...	ACCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGGTCACCCTGAAGTTTA					
15. S. bezzii Cytoform 2 TrERUSimb...	ACCCTATTCTTTA	CAACATTTATT	TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA			

Şekil 4.19. Araştırma yöresinde incelenen Erciyes dağı izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *Simulium* izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin alignmentları

Şekil 4.19’da görüleceği üzere mt-COI gen bölgesine göre *Simulium* türleri ve izolatları arasında çeşitli nükleotid değişimleri belirlenmiştir. Erciyes dağı izolatları ile GenBank’a kayıtlı diğer bazı *Simulium* izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.20’de verilmiştir. Filogenetik analiz sonucu araştırma yöresinde belirlenen *S. bezzii* cytoform 2 ve cytoform 3 izolatları arasında %0,8 genetik farklılık saptanmıştır. Aynı zamanda *S. bezzii* izolatları dünyada GenBank’a kayıtlı diğer *S. bezzii* izolatları ile %0,6±0,2 genetik farklılık belirlenmiştir. *S. bezzii* TrERUSimb2 cytoform 2 izolatu en yüksek identikliği %99,7 ile Ermenistan’dan izole edilen *S. bezzii* Sim37-be ve Sim28-va izolatları ile gösterirken TrERUSimb3 izolatu en yüksek identikliği %99,3 ile yine Ermenistan’dan *S. bezzii* Sim30-va izolatu ile göstermiştir. Araştırma sahasında izole ettiğimiz *Simulium ornatum* grup TrERUSimor izolatu *S. kiritshenkoi* izolatlarına filogenetik olarak yakın bulunmuş olup en yüksek identikliği %99,5 ile Ermenistan’dan izole Sim39-kir izolatu ile göstermiştir. *S. velutinum* ERUSimv izolatu en yüksek identikliği %98,9 ile Ermenistan’dan izole edilen *S. aureum* Sim27-au izolatu ile gösterirken GenBank’a kayıtlı İngiltere ve Finlandiya’dan izole edilen diğer *S. velutinum* izolatları ile %4,5±0,8 genetik farklılık göstermiştir. Aynı akarsuda tespit edilen *S. bezzii* ve *S. ornatum* grup izolatları arasında %9,6±1,2, *S. bezzii*

ve *S. velutinum* arasında $13,9 \pm 1,4$ ve *S. ornatum* grup ve *S. velutinum* izolatları arasında ise $13,5 \pm 1,4$ genetik farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. Erciyes dağı izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer *Simulium* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli). Dış grup olarak *Anopheles pseudopunctipennis* (KC354820) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diptera dizisi Nematocera dizi bölümünde yer alan ve dünyanın her bölgesinde görülebilen önemli ailelerden birisi de Simulidae (Kara sinekler, Blackflies) ailesidir. Simulidae ailesinde bu güne kadar 2101'i yaşayan, 12'si ortadan kalkmış (fossil) toplam 2113 tür tarif edilmiş ve bunların 1697'si *Simulium* soyunda yer almıştır (1).

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 (1, 5-7).

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 manada öneme sahiptir. Nitekim Kayseri ilinde Yamula Barajı Hidroelektrik santralının 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte Orta Kızılırmak Havzasının Kayseri ve Nevşehir ilinden geçen bölümünde simuliid popülasyonunda afet boyutunda bir artış meydana gelmiş ve bu afete karşı kontrol ve mücadele programı başlatılmıştır.

Diğer yandan esasen Türkiye’de günümüze kadar simuliid sinekler ve onların etkileri üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmaların önemli bir kısmı da daha çok geleneksel olarak morfolojik identifikasyon temelinde yapılmış olup kromozomal, moleküler ve genotipleme çalışmaları henüz çok sınırlıdır.

Mevcut araştırmada, konvansiyonel olarak morfolojik, sitogenetik bazda kromozomal analizler, PCR ve sekans analizleriyle filogenetik genotiplendirme çalışmaları yapılarak Erciyes dağı akarsularında örnekleme yapılan simuliid türlerinin *S. bezzi* Cyt 2, *S. bezzi* Cyt 3, *S. ornatum* grup ve *S. velutinum* türleri oldukları identifiye edilmiştir. Araştırma yöresinde morfolojik ve kromozomal analizler sonucu identifiye edilen *S. ornatum*, *S. ornatum* grup içerisinde değerlendirilmiştir. Bu grup içerisinde bulunan türler özellikle larval dönemlerinde çok benzer morfolojik özellikler göstermekte olup teşhisleri zor olmaktadır. *S. ornatum* grup içerisinde bulunan *S. intermedium*, *S. trifasciatum* ve *S. ornatum* türlerinin larval dönemlerinin yüksek oranda değişiklik göstermesi nedeniyle larval özelliklerine göre teşhis etmenin zor olduğu bildirilmiştir (58, 59).

S. ornatum grup içinde 25 tür ve bu türlere ait 90 alt tür bulunmaktadır. Bu grup Dünyada ve Türkiye’de yayılış göstermektedir (60). Benzer şekilde Gazyağcı (26), Kızılırmak Havzası’nda yer alan Kırıkkale ve Ankara illeri ile sınırlanan bölgelerden geçen Kızılırmak Nehri ve kollarında belirlenen ayrı istasyonlardan (Kalecik, Bala, Yahşihan, Merkez (Kırıkkale), Bahşılı, Keskin, Karakeçili, Çelebi, Sulakyurt) topladığı larva, son dönem larva ve pupalarda morfolojik identifikasyon çalışmasında *S. petricolum*, *S. equinum*, *S. pseudequinum*, *S. lineatum*, *S. balcanicum*, *S. erythrocephalum* ve *S. alajense* tür düzeyinde (7 tür), *S. angustipes* ve *S. ornatum* ise grup düzeyinde (2 grup) teşhis etmiş olup toplanan larva ve pupa örnekleri arasında en yaygın türün *S. petricolum* (% 25.73), en az görülen türün ise *S. alajense* (% 0.02) olduğunu rapor etmiştir. Öte yandan Başören ve Kazancı (27) 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.

Bu çalışmada Erciyes dağı küçük akarsularında 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 (12, 15, 20, 21, 27, 61). Buna mukabil *S. ornatum* grubunun ise Fırat, Göksu, Kızılırmak, Büyük Menderes nehir havzaları, Namnam akarsuyu (Köyceğiz havzası), Yeşilırmak nehir havzası, Köyceğiz koruma alanı (Muğla ili), Yedigöller milli parkı ve Sakarya nehir havzasında yayılış gösterdiği iddia edilmiştir (12, 15, 20, 21, 26, 27, 61, 62). Öte yandan *S. velutinum* türünün ise Büyük Menderes nehrinde sınırlı bir yayılış gösterdiği rapor edilmiştir (20, 21).

Diğer yandan Türkiye'de bugüne kadar simuliid sinekler üzerine yapılmış sitokromozomal ve moleküler tabanlı identifikasyon ve klasifikasyon araştırmaları iki çalışma ile sınırlıdır. Bu iki araştırmadan ilkinde Yeşilöz (25), 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 diğer araştırmada ise İnci ve ark (28) 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.

Türkiye'de bugüne kadar varlığı ileri sürülen yaklaşık 50 simuliid türü sadece geleneksel morfometrik incelemelerle rapor edilmiştir (2, 12, 14-24, 26). Mevcut çalışmada ise Erciyes dağı akarsularında 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 simulid 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 iyi bir şekilde çözülmüş ve desteklenmiştir (5, 31, 63). Polytene kromozomların analizi ile nominal türlerin 28 farklı kromozom çiftinde doğal hibridizasyon belirlenmiştir. *Simulium damnosum* complex içindeki türler arasında doğal hibridizasyon sıklığı yaklaşık 0.0009- 0.001 olarak belirlenmiş (64, 65), ayrıca deneysel hibridizasyon da başarılmıştır (66). Diğer yandan doğal *Simulium* popülasyonlarında sıra dışı derecede polimorfizm belirlenmiştir. Polimorfizmlerin büyük bölümü inversiyonlardır. Bu inversiyonlardan %97'si paracentric inversiyonlardır (67). 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 (68). Öte 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 analizi için daha çok özelliğin incelenmesine imkân sağlamıştır. Bu teknikler genel olarak nükleik asitler (genellikle DNA), proteinler (enzimler ve yapısal proteinler) ve ikincil metabolitler (örn; lipidler 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 (69). İkincil metabolitler ise enzimatik faaliyetler sonucu ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bunlar, genetik temelden bir adım daha uzakta bulunurlar. Sitogenetik, morfolojik (70, 71) ve moleküler (31) 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; mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (35, 36, 45-47, 53, 54). Cytochrome c oxidase enzimi, bakteri ve mitokondride bulunan geniş transmembran protein kompleksidir. Mitokondri membranında yer alan elektron transport zincirindeki en son enzimidir. Her dört cytochrome c molekülünden de elektron alır ve bunları bir oksijen molekülüne dönüştürür. Bu enzim, moleküler oksijenin iki molekül suya çevrilmesinden sorumludur. Bu süreçte su oluşturmak için iç sıvı fazdan 4 protona bağlanır. Buna ilaveten membran boyunca bu 4 protonun translokasyonunu da sağlar. Neticede ATP sentezinde proton elektrokimyasal potansiyelinin transmembran farklılığını belirlemeye yardımcı olur. Böylece ATP sentezi gerçekleşir. Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (72). Simuliid türler üzerine GenBank'ta mt-COI gen bölgesinin araştırıldığı farklı ülkelerden çeşitli kayıtlar bulunmaktadır. Pramula ve ark., (45), *Gomphostilbia* altsoyundaki 13 türden oriyental karasinekte (Oriental black fly) mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin farklılıkları üzerine yaptıkları filogenetik araştırmada, intraspesifik genetik farklılığı, ortalama %2,75 (%0-9.28) interspesifik genetik uzaklığı ise %0.34-16.05 olarak belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar (45) mt-COI gen bölgesine göre DNA barkodlamasının cryptik biyo farklılığı (biodiversity) belirlemede ve geleneksel taksonomiye kolaylaştırmada önemli olduğunu kaydetmişler, morfolojik kriterlere göre belirlenen *Gomphostilbia* altsoyundaki tür gruplarının monophyletic olmadığını ve bu soydaki klasifikasyonun tekrar değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Rivera ve ark. (54), Nearctic simuliid türleri içerisinde morfolojik olarak farklı 65 tür ve kardeş tür içeren tür kompleksinde genetik varyasyonu, mt-COI gen bölgesine göre araştırmışlar, benzer türler arasında genetik varyasyonu %14.93 olarak saptarken morfolojik farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise %0.72 olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar (54) DNA barkodlamanın simuliidlerdeki cryptic çeşitliliğin araştırılmasında ve tür

identifikasyonunda etkili bir yöntem olduğunu kaydetmişlerdir. Mevcut araştırmada da yukarıda bildirilen çalışmalara (45, 54, 72) paralel olarak araştırma yöresinden elde edilen simuliid izolatlarının mt-COI gen bölgesine intraspesifik polimorfik alanların varlığı saptanmış, mt-COI gen bölgesinin filogenetik analizlerine göre farklı türler arasında intra ve interspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Ayrıca mevcut çalışmada, filogenetik analizler sonucu araştırma yöresinde belirlenen *S. bezzii* cytoform 2 ve *S. bezzii* cytoform 3 izolatları arasında %0,8 genetik farklılık saptanmış olup *S. bezzii* izolatları ile dünyada GenBank'a kayıtlı diğer *S. bezzii* izolatları arasında %0,6±0,2 genetik farklılık belirlenmiştir.

Bu araştırmada identifiye edilen izolatlardan *S. bezzii* TrERUSimbe2 cytoform 2 izolatı, en yüksek identikliği %99,7 ile Ermenistan'da larvalardan izole edilen *S. bezzii* Sim37-be ve Sim28-va izolatları ile benzerlik gösterirken, TrERUSimbe3 izolatı ise en yüksek identikliği %99,3 ile yine Ermenistan'da larvalardan izole edilen *S. bezzii* Sim30-va izolatı ile göstermiştir.

Öte yandan bu çalışmada Erciyes dağından izole edilen izolatlardan *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatı *S. ornatum* grup içerisinde bulunan *S. kiritshenkoi* izolatlarına filogenetik olarak yakın bulunmuş olup en yüksek identikliği %99,5 ile Ermenistan'dan izole edilen Sim39-kir izolatı ile göstermiş; *S. velutinum* ERUSimv izolatı ise en yüksek identikliği %98,9 ile Ermenistan'dan izole edilen *S. aureum* Sim27-au izolatı ile gösterirken GenBank'a kayıtlı İngiltere ve Finlandiya'dan izole edilen diğer *S. velutinum* izolatları ile de %4,5±0,8 genetik farklılık göstermiştir.

Mevcut çalışmada Erciyes dağından izole edilen *S. bezzii* ve *S. ornatum* grup izolatları arasında %9,6±1,2; *S. bezzii* ve *S. velutinum* arasında 13,9±1,4 ve *S. ornatum* grup ve *S. velutinum* izolatları arasında ise %13,5±1,4 genetik farklılık tespit edilmiştir.

Insektlerdeki ribozomal DNA diğer ökaryotlarda olduğu gibi birbirinden önceden “nontranscribed spacers (NTS)” olarak bilinen intergenik spacerlar (IGS) ile ayrılmış birbirini takip eden ünitelerden oluşmuştur. Her ünite; sırasıyla 18S, 5.8S, ve 28S ribozomal RNA'yı kodlayan genler ile spacerlardan [external transcribed spacer (ETS) ve internal transcribed spacers 1 (ITS1) ve 2 (ITS2)] oluşur (73). Kodlanmayan bölgeler ITS-1 ve ITS-2, kodlanan 18S, 5.8S, ve 28S rDNA genleri arasında yer alır. ITS-1, küçük subünite 18S ve 5.8S subuniteleri birbirinden ayırırken, ITS-2, büyük subünite 5.8S ve 28S gen bölgelerini ayırır. 18S, 5.8S, ve 28S kodlanan gen bölgeleri, yüksek

düzeyde korunmuş olup üst düzey filogenilerin inşasında yaygın olarak kullanılır (74, 75). Bunun aksine kodlanmayan gen bölgeleri ITS-1 ve ITS-2 yüksek düzeyde değişkenlik gösterir ve kodlanan bölgelere göre daha hızlı oranda değişim gösterir (76). Nükler rDNA'da bulunan intergenik spacer ITS-2, birçok simuliid türünde tek bir kromozom üzerinde yerleşmiş (63) bir gen bölgesi olup, birçok organizmanın filogenetik çalışmalarında moleküler araçlara büyük bir katkısı olmuştur. ITS-2 sekans kıyaslamaları birbirine çok yakın türlerin ayrımında (77,78), popülasyon farklılıklarında (79, 80), tür içinde veya türler arasındaki farklılıkların ortaya konmasında (44, 81) ve evrimsel ilişkilerin yeniden oluşturulmasında (41, 53, 81, 82-86) oldukça kullanışlı olmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz *Simulium* izolatlarının klonlama çalışmalarında bazı izolatların vektöre insert olmaması nedeni ile yalnızca iki izolat sekanslanmıştır ve sekans sonucu değerlendirilmiştir. *S. bezzii* Cyt2 izolatının ITS-2 gen bölgesinin filogenetik analizi üzerine Dünya'da GenBank'a kayıtlı bir kayıt bulunmamaktadır. Çalışma bu yönü ile Erciyes Dağı akarsularından izole ettiğimiz *S. bezzii* Cyt2 izolatı ITS-2 gen bölgesi yönünden Dünya'da GenBank'a kayıdı gerçekleştirilen ilk izolat olmuştur.

Çalışmamızda filogenetik analizlerde hedef gen bölgelerinden biri olarak belirlediğimiz ITS-2 gen bölgesinin filogenetik analizi sonucu *S. bezzii* TrERUSimbe3 izolatı GenBank'ta ITS-2 gen bölgesi yönünden kayıtlı *Simulium* izolatlarından en yüksek filogenetik yakınlığı %96,2 ile İngiltere'de larvalardan izole edilen *S. ornatum* grubuna dâhil izolatlarla (GenBank (GenBank aksesyon: EU429857, EU429811) göstermiştir. Araştırma yöresinde karakterize edilen *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatı ise en yüksek identikliği %99,7 ile aynı grupta yer alan ve İngiltere'de pupalardan izole edilen *S. trifasciatum* (GenBank aksesyon: EU429913, EU429919) ve larvalardan izole edilen *S. ornatum* (GenBank aksesyon: EU429817) izolatları ile göstermiştir. Aynı zamanda Erciyes dağı akarsularından izole ettiğimiz *S. bezzii* TrERUSimbe3 ve *S. ornatum* grup TrERUSimor izolatları arasında ise $3,7 \pm 1,0$ genetik farklılık belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Erciyes dağı akarsularında toplanan simulid larva örnekleri üzerinde bireysel analiz temelinde morfometrik, kromozomal ve moleküler analiz metotlarıyla birbirini doğrulama esasıyla ve bir arada kullanılarak identifikasyon, karakterizasyon ve filogeni çalışması yapılmıştır. Analizler sonucunda Erciyes dağı

akarsularında *S. bezzii* cyt2, *S. bezzii* cyt3, *S. velutinum* ve *S. ornatum* grup türlerinin varlığı ortaya konmuştur.

Ayrıca bu çalışmayla Türkiye’de ilk kez *S. bezzii* cyt2, *S. bezzii* cyt3, *S. velutinum* ve *S. ornatum* izolatlarının mitokondriyal gen bölgesine göre karakterizasyonları yapılarak filogenileri ortaya konmuş ve GenBank kayıtları gerçekleştirilerek moleküler taksonomiye yerleşimleri sağlanmıştır. Aynı zamanda araştırma yöresinden izole edilen *S. bezzii* Cyt 2 ve *S. ornatum* grup izolatlarının ribozomal gen bölgesine göre moleküler analizleri sonucunda karakterizasyonları yapılarak GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

İlaveten Erciyes dağı akarsularından izole edilen *S. bezzii* Cyt 2 izolatının ribozomal ITS-2 gen bölgesi Dünya’da GenBank’a kaydı gerçekleştirilen ilk izolat olmuştur. Mevcut çalışma, Türkiye’de *Simulium* türlerinin epidemiyolojisi ile yaygın tür ve/veya alttürlerin genotiplerinin ortaya konması açısından model olma niteliğinde olup bu alanda daha kapsamlı sitogenetik kromozomal, morfolojik ve moleküler kombine araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Adler PH, Crosskey RW (2011). World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory. <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> (10.11.2011)
2. Yılmaz A, İnci A, Tunçbilek ŞA, et al. Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (*Simulium* (*Wilhelmia*) *lineatum*) (Diptera: Simuliidae) İstilası. E Ü Vet Fak Derg 2007; 4: 91-95.
3. Adler PH, Crosskey RW (2009). World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory. <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> (09.10.2011)
4. Myburgh E, Nevill EM. Review of blackfly (Diptera: Simuliidae) Control in South Africa. Onderstepoort J Vet Res 2003; 70: 307-316.
5. Adler PH, Currie DC, Wood DM. The Black Flies (Simuliidae) of North America. Cornell University Press in Association with the Royal Ontario Museum, USA, 2004: 941.
6. Gray EW, Adler PH, Coscaron-Arias C, et al. Development of the first blackfly (Diptera: Simuliidae) Management program in Argentina and comparison with other programs. J Am Mosq Control Assoc 1999; 15: 400-406.

7. Stoops CA, Adler PH. Feeding behavior of larval blackflies (Diptera: Simuliidae) with and without exposure to *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. J Vector Ecol 2006; 31: 79-83.
8. Beaty BJ, Marquardt WC: The Biology of Disease Vectors. Fort Collins, University Press of Colorado, 1996.
9. Crosskey RW (1990). The Natural History of Blackflies. John Wiley & Sons, England.
10. Kim KS, Tsuda Y, Yamada A. Blood meal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan. J Med Entomol 2009; 46: 1230-4.
11. Imura T, Sato Y, Ejiri H, et al. Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol Res 2010; 106: 543-547.
12. Özbek H, Hayat R, Aslan İ. Erzurum'un bazı ilçelerinde simuliid (Diptera, Simuliidae) salgını. Türk Entomol Derg 1995; 19: 37-42.
13. Akarsu GA, Güngör Ç, Yergök HİÇ, et al. Bir idrar örneğinde *Simulium* larvası. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003; 56: 131-134.
14. Kazancı N, Clergue-Gazeau M. Simuliidae de Turquie. I: remieresdonneesfaunistiques et biogeographiques (Diptera, Simuliidae). Annales de Limnologie 1990; 26: 45-50.
15. Clergue-Gazeau M, Kazancı N. Türkiye Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası II: Çeşitli akarsu sistemlerinden toplanmış türlere ekolojik bir yaklaşım. Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 1992; 13: 17-32.
16. Balık S, Ustaoglu MR, Özbek M, et al. Yelköprü Mağarası (Dikili, İzmir) ve yakın çevresinin sucul faunası hakkında bir ön araştırma. EÜ Su Ürünleri Dergisi 2002; 19: 221-225.
17. Şirin Ü, Sahin Y. New records of blackflies (Diptera, Simuliidae) for the Turkish fauna. Zoology in the Middle East 2005; 36: 99-104.
18. Crosskey RW, Zwick H (2007). New faunal records with taxonomic annotations for the Blackflies of Turkey (Diptera: Simuliidae). Aquatic Insects 2007; 29: 21-48.
19. Zwick H. On a small collection of wild-caught adult black flies (Diptera: Simuliidae) from Turkey. Entomologist's Monthly Magazine 2007; 143: 100.

20. Kazancı N, Ertunç Ö. Bazı Simuliidae (Insecta: Diptera) türlerinin habitat özellikleri. EÜ Su Ürünleri Dergisi 2008a; 25: 319-323.
21. Kazancı N, Ertunç Ö. On the Simuliidae (Insecta, Diptera) fauna of Turkey. Review of Hydrobiology 2008b; 1: 27-36.
22. Ertunç Ö, Türkmen G, Kazancı N. Research on Simuliidae (Insecta: Diptera) fauna of Yedigöller National Park (Bolu, Turkey). Review of Hydrobiology 2008; 2: 81-92.
23. Ertunç Ö. Türkiye'nin Batısındaki Bazı Akarsuların Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2009:104.
24. Kazancı N, Ertunç Ö. Simuliidae (Insecta, Diptera) türlerinin Yeşilırmak Nehri Havzası (Türkiye)'nin sucul habitat kalitesini belirlemede indicator olarak kullanılmaları. Review of Hydrobiology 2010; 3: 27-36.
25. Yeşilöz H. Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir Bölümünde Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu, Yüksek Lisans tezi, ERU Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Parazitoloji AD, Kayseri, 2011.
26. Gazıyağcı AN. Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehrinde Simuliidae Türlerinin Yayılışı, Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Parazitoloji AD, Kırıkkale 2011.
27. Başören Ö, Kazancı N. Contribution to the knowledge of Simuliidae (Diptera, Insecta) fauna of Turkey: Eastern Black Sea Region. Int Rev Hydrobiol 2012; 2: 121-130.
28. 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.
29. Crosskey RW. Simuliid taxonomy. In: Laird M (ed) Black flies: the future for biological methods in integrated control. Academic Press, London 1981; 3-18.
30. Jitklang S, Kuvangkadilok C, Baimai V, et al. Cytogenetics and morpho taxonomy of the *Simulium (Gomphostilbia) ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Zoo taxa 2008; 1917:1-28.

31. Moulton JK. Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). *Syst Entomol* 2000; 25: 95-113.
32. Moulton JK. Can the current molecular Arsenal adequately track rapid divergence events within Simuliidae (Diptera)? *Mol Phylogenet Evol* 2003; 27: 45-57.
33. Xiong B, Kocher TD. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morpho species of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* 1991; 34: 306-311.
34. Pruess KP, Zhu X, Powers TO. 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* 1992; 29: 644-651.
35. Higazi TB, Boakye DA, Wilson MD, et al. Cyto taxonomic and molecular analysis of *Simulium (Edwardsellum) damnosum sensulato* (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan. *J Med Entomol* 2001; 37: 547-553.
36. Kruger A, Hennings IC. Molecular phylogenetics of black flies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 39:83-90.
37. Phayahasena S, Colgan DJ, Kuvangkadilok C, et al. Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. *Genetica* 2010; 138:633-648.
38. Conflitti IM, Kratochvil MJ, Spironello M, et al. Good species behaving badly: Non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae). *Mol Phylogenet Evol* 2010; 57: 245-257.
39. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2003a; 270:313-321.
40. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2003b; 270: 96-99.

41. LaRue B, Gaudreau C, Bagre HO, et al. Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in blackflies (Diptera:Simuliidae). *Mol Phylogenet Evol* 2009; 53:749-757.
42. Brockhouse CL, Vajime CG, Marin R, et al. Molecular identification of onchocerciasis vector sibling species in blackflies (Diptera:Simuliidae). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 628-634.
43. Krueger A, Kalinga AK, Kibweja, AM, et al. 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* 2006; 11: 1066-1074.
44. Tang J, Toè L, Back C, et al. Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera:Simuliidae) complex. *Mol Biol Evol* 1996; 13: 244-252.
45. Pramual P, Wongpakam K, Adler P. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). *Genome* 2011; 54: 1-9.
46. Tang Jand, Unnasch TR. Discriminating PCR artifacts using DHDA (directed heteroduplex analysis). *BioTechniques*1995a; 19: 902-905.
47. Tang JM, Toe L, Back C, et al. Mitochondrial alleles of *Simulium damnosum* sensulato infected with *Onchocerca volvulus*. *Int J Parasitol* 1995b; 25:1251-1254.
48. Krüger A, Gelhaus A, Garms R. Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum* and their relationship with West African species of the complex (Diptera: Simuliidae). *Insect Mol Biol* 2000; 9:101-108.
49. Riley CM, Fusco R. Field efficacy of Vectobac-12AS and Vectobac-24AS against black fly larvae in new Brunswick streams (Diptera: Simuliidae). *J Am Mosq Cntrol Assoc* 1990; 6: 43-6.
50. Regis L, da Silva SB, Melo-Santos MA. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95:207-210.

51. Das SC, Nath DR, Bhuyan M, et al. Field trial of abate and Teknar for *Simulium* (Diptera: Simuliidae) control in India. J Am Mosq Control Assoc 1990; 6:135-137.
52. 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.
53. Thanwisai A, Kuvangkadilok C, Baimai V. Molecular phylogeny of blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. Genetica 2006; 128:177-204.
54. Rivera J, Currie DC. Identification of Nearctic blackflies using DNA barcoding (Diptera: Simuliidae). Mol Ecol Res 2009; 9: 224-236.
55. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41: 95-98.
56. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com> (18.04.2014).
57. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution 2011.
58. Bass J. 1998. Last instar larvae and pupae of the Simuliidae of Britain and Ireland: a key with brief ecological notes. In Elliott J. M. (ed.) Freshwater Biological Association Scientific Publication 55: 21–91.
59. Bernotienė R. On the biology of *Simulium ornatum* group (Diptera: Simuliidae). Naujos Ir Retos Lietuvos Vabzdžių Rūšys. 22 tomas.
60. Adler PH, Crosskey RW (2014). World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the taxonomic and geographical inventory. <http://www.clemson.edu/cafls/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>
61. Şirin Ü. 2002. Türkiye Simuliidae tür listesi ve yayılışları. In: Demirsoy A (eds), Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası, 5th ed., Meteksan, Ankara, p: 819-823
62. Kazancı N, Ertunç Ö. Use of Simuliidae (Insecta: Diptera) species as indicators of aquatic habitat quality of Yeşilırmak River Basin (Turkey). Int Rev Hydrobiol 2010; 3: 27-36.

63. Rothfels KH. 1979. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). *Annu Rev Entomol* 1979; 24: 507-539.
64. Post RJ. Natural interspecific hybridisation of *Simulium sanctipauli* s.l. with *Simulium squamosum* and *Simulium yahense* (Diptera: Simuliidae). *Tropenmed Parasitol* 1984; 35: 58-60.
65. Boakye DA, Mosha FW. Natural hybridization between *Simulium sanctipauli* and *S. sirbanum*, two sibling species of the *S. damnosum* complex. *Med Vet Entomol* 1988; 2:397-399.
66. Meredith SEO, Boakye DA, Raybould JN et al. Experimental hybridization between members of the *Simulium damnosum* complex. *Med Vet Entomol* 1987; 1: 193-199.
67. Bedo DG. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* Skuse (Diptera: Simuliidae). I. Sibling speciation. *Chromosoma* 1977; 64: 37-65.
68. Gryaznov AI. Morphological adaptations of bloodsucking blackflies to their hosts. *Entomol Rev* 1992; 71: 143-145.
69. Pasteur N, Pasteur G, Binhomme F, et al. *Practical Isozyme Genetics*. Ellis Horwood Ltd, Chichester 1988; 215.
70. Grenier P, Rageau J. Remarque's sur la classification des Simuliidae. *Bull Soc Pathol Exot* 1960; 53: 727-742.
71. Currie DC. Phylogeny of Primitive Simuliidae (Insecta: Diptera: Culicimorpha). Ph.D. dissertation, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1988.
72. Khalimonchuk O, Rödel G. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 2005; 5: 363-88.
73. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*. 1991;66: 411-53.
74. Nirmala X, Hypsa V, Zurovec M, 2001. Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNA in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Mol Biol* 2001; 10: 475-485.
75. Shi M, Chen XX, Achterberg C. Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rRNA, 28S rDNA D2, 18S rDNA gene sequences and morphological characters. *Mol Phylogenet Evol* 2005; 37: 104-116.

76. Schlotterer, C, Hauser MT, Haeseler AV. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Mol Biol Evol 1994; 11: 513–522.
77. Walton C, Handley M, Kuvangkadilok C, et al. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. Med Vet Entomol 1999; 13: 24-32.
78. Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, et al. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. Insect Mol Biol 2000; 9: 369-374.
79. Fritz GN, Conn J, Cockburn A et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mol Biol Evol 1994; 11: 406-416.
80. Marrellin MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, et al. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 1999; 36: 679-684.
81. Malafronte RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 1999; 36: 631-634.
82. Depaquit J, Ferte H, Le'ger N. et al. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. Insect Mol Biol 2000; 9: 293-300.
83. Weekers PHH, De Jonckheere JF, Dumont HJ. Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insect: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone. Mol Phylogenet Evol 2001; 20: 89-99.
84. Oliverio M, Cervelli M, Mariottini P. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). Mol Phylogenet Evol 2002; 25: 63-69.

85. Toma T, Miyagi I, Crabtree MB, et al. Investigation of the *Aedes* (*Stegomyia*) *flavopictus* complex (Diptera: Culicidae) in Japan by sequence analysis of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. J Med Entomol 2002; 13: 461-468.
86. Young I, Coleman AW. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Mol Phylogenet Evol 2004; 30: 236-242.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Ünl. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 12.12.2012

Toplantı Sayısı: 12

Karar No: 12/124

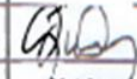
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

12.12.2012

tarhinde

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

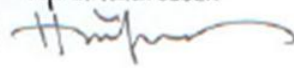
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	Vet. Fakültesi	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Veteriner Fakültesinden Prof. Dr. Abdullah İNCİ tarafından sunulan "Erciyes Dağı Akarsularında Simulium Türlerinin Araştırılması ve Moleküler Klasifikasyonu" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Tarih : 12.12.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası :



ASLINA AYKIRI
Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ahmet DEMİRCİOĞLU

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 02 Ocak 1968, Avanos

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 542 6238515

email: vetahmet@mynet.com

Yazışma Adresi: ERU Sağlık Bilimleri Ens. Veteriner Parazitoloji ABD/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Mucur Lisesi	1985
Lisans	Selçuk Ü. Veteriner Fakültesi	1991

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
1992-	Avanos Belediyesi	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce