



# **Sultan Sazlığı Ekosisteminde Kanatlı Haemosporidialarının Moleküler Ekolojisi**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 114 O 646**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Bilal DİK  
Doç. Dr. Önder DÜZLÜ  
Dr. Arzu GÜRSOY ERGEN

Bursiyerler:

Biyolog Mübeccel OKUR  
Biyolog Zekiye KOÇER

Haziran 2017  
KAYSERİ

## ÖNSÖZ

Apicomplexa anaç altında kanatlılarda enfeksiyona yol açan Haemosporidia takımındaki *Hemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Plasmodium* soylarındaki türler, özelleşmiş organellerden oluşan ve konak hücreye penetrasyonda önemli olan bir apikal kompleks yapıya sahip olup vektörlerle bulaştırılmaktadır. Vektör-kaynaklı hastalıkların bulaşma dinamiklerinde vektörlerin biyolojik ve ekolojik özellikleri önemli rol oynar. Vektör popülasyonları üzerine ekolojik çalışmalar, farklı kanatlı topluluklarında haemosporidian parazitlerin yayılışı ve bulaşma dinamikleri açısından kilit role sahiptir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar kanatlı haemosporidian etkenlerinin konak spesifikliğı düzeyinde geniş çeşitlilik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bazı haemosporidian nesilleri belirli kuş ailelerinde görülürken diğer bazıları bütün Aves sınıfında yayılış gösterebilmektedir. Geçmişte birçok *Hemoproteus* ve *Leucocytozoon* türünün rölatif olarak konak spesifikliğı gösterdiğini ve aynı ailedeki kuş türleri ile sınırlı olduğu, *Plasmodium* türlerinin ise daha geniş konak spektrumuna sahip olduğu ve karakterlerini değiştirerek çeşitli kanatlı familyalarını enfekte edebildiğı kabul edilmiştir. Ancak günümüzde moleküler biyolojik tekniklerin kanatlı haemosporidianlarının teşhisinde ve karakterlerinin belirlenmesinde kullanılmaya başlanması ile birlikte bu etkenlerin konak özgün ya da generalist özellikte olmaları revizyon altına alınmıştır. Bu amaçla kurulan MalAvi (<http://mbio-serv4.mbioekol.lu.se/avianmalaria/>) veri tabanında Dünyanın farklı bölgelerinden kanatlı ve/veya vektör konaklardan izole edilmiş haemosporidian parazitler başta mitochondrial cytochrome b (mt-cytb) gen bölgesi karakterleri bazında kayıt altına alınmaya başlanmıştır. Bu şekilde farklı coğrafyalarda tespit edilmiş kanatlı haemosporidian parazitlerinin bir arada moleküler filogenetik klasifikasyonuna olanak sağlanmış ve şu ana kadar elde edilen veriler ile global tür çeşitliliğinin geçmişte bilinenden çok daha yüksek olduğu ve bu takım altında binlerce tür bulunabileceğı gün yüzüne çıkmıştır. Bu açıdan başta mt-cytb sekans karakterizasyonu olmak üzere moleküler veriler temelinde, genetik farklılıklarla ortaya çıkarılan bu parazitler genel bir terimle kanatlı haemosporidian nesilleri (lineage) olarak tarif edilmiş ve her bir nesil izole edildiğı kanatlı ve/veya insekt konak temelinde isimlendirilerek veri tabanlarına kayıtları sağlanmıştır. Günümüze kadar bu nesillerden çok az bir kısmının morfolojik ve gelişim özellikleri temelinde tür tanımlaması yapılabilmektedir. TÜBİTAK tarafından 114 O 646 kod numarası ile desteklenen bu araştırma projesiyle yabani kanatlılardan ötücü kuşlar (Passeriformes) ve diğer bazı non-passerin kanatlılarda enfeksiyona yol açan haemosporidian etkenlerinin (*Hemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Plasmodium*) Kayseri il sınırları içindeki Sultan Sazlığı ekosisteminde kanatlı konak ve vektörler (Culicidae ve Ceratopogonidae) bazında moleküler ekolojisi araştırılmıştır.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| KAPAK.....                                                                                                                                                                        | i   |
| ÖNSÖZ.....                                                                                                                                                                        | ii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                                                                                 | iii |
| TABLO LİSTESİ .....                                                                                                                                                               | v   |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                                                                                                                                               | vii |
| ÖZET .....                                                                                                                                                                        | xi  |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                     | xii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                                                                    | 1   |
| 2. LİTERATÜR BİLGİ.....                                                                                                                                                           | 3   |
| 2.1 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Taksonomi, Morfoloji ve Biyolojisi .....                                                                                                  | 3   |
| 2.2 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Epidemiyolojisi .....                                                                                                                     | 7   |
| 2.3 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Teşhisi.....                                                                                                                              | 11  |
| 2.4 Moleküler Veriler Işığında Kanatlı Haemosporidianlarında Global Çeşitlilik.....                                                                                               | 14  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                                                                                                          | 17  |
| 3.1 Saha Çalışmaları.....                                                                                                                                                         | 17  |
| 3.1.1 Sultan Sazlığı Ekosisteminde Kuş Örneklemesi ve Kan Örneklerinin Toplanması.....                                                                                            | 17  |
| 3.1.2 Sultan Sazlığı Ekosisteminde İnsekt (Diptera) Örneklerinin Toplanması.....                                                                                                  | 20  |
| 3.2 Laboratuvar Çalışmaları.....                                                                                                                                                  | 20  |
| 3.2.1 Perifer Kan Frotilerinin Boyanması ve Analizi.....                                                                                                                          | 20  |
| 3.2.2 İnsekt (Diptera) Örneklerinin İdentifikasyonu .....                                                                                                                         | 21  |
| 3.2.3 Kanatlı Kan Örnekleri ve İnsekt (Diptera) Örneklerinden Genomik DNA izolasyonu.....                                                                                         | 21  |
| 3.2.4 Kanatlı Kanları ve İnsektlerden Elde Edilen Genomik DNA İzolatlarında Haemosporidian Parazitlerin Mithochondrial Cytochrome b (Mt-cytb) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ..... | 22  |

|           |                                                                                                                                                                      |            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.5     | Moleküler İdentifikasyon ve Genotipleme için Sivrisinek ve <i>Culicoides</i> Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ..... | 22         |
| 3.2.6     | Dişi Sivrisinek ve <i>Culicoides</i> Örneklerinde Kan Beslenme Analizlerinde Kanatlı Mt-cytb Gen Bölgesinin Amplifikasyonu .....                                     | 23         |
| 3.2.7     | Sekans ve Filogenetik Analizler .....                                                                                                                                | 24         |
| 3.2.8     | Real Time PCR Analizleri .....                                                                                                                                       | 27         |
| 3.3       | İstatistiksel Analiz .....                                                                                                                                           | 29         |
| <b>4.</b> | <b>BULGULAR.....</b>                                                                                                                                                 | <b>30</b>  |
| 4.1       | Sultan Sazlığı Yöresinde Örneklenen Kuş Türleri ve Özellikleri .....                                                                                                 | 30         |
| 4.2       | Sultan Sazlığı Yöresinde İnsekt (Diptera) Türleri .....                                                                                                              | 35         |
| 4.2.1     | <i>Culicoides</i> Örneklerinin Morfolojik ve Moleküler Analiz Sonuçları .....                                                                                        | 36         |
| 4.2.2     | Sivrisinek Örneklerinin Morfolojik ve Moleküler Analiz Sonuçları .....                                                                                               | 43         |
| 4.3       | Sivrisinek ve <i>Culicoides</i> Türlerine Ait Örneklerin Kan Beslenme Analiz Sonuçları ...                                                                           | 48         |
| 4.4       | Kanatlı ve İnsekt Örneklerinde Haemosporidian Parazitlerin Analiz Sonuçları .....                                                                                    | 52         |
| 4.4.1     | Kanatlı Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu.....                                                          | 52         |
| 4.4.2     | <i>Culicoides</i> ve Sivrisinek Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu.....                                  | 98         |
| 4.4.3     | Kanatlı ve insekt örneklerinde moleküler olarak karakterize edilen Haemosporidian parazitlerin filogenetik analizleri .....                                          | 104        |
| 4.5       | Haemosporidian Parazitlerin Real Time PCR Analiz Sonuçları .....                                                                                                     | 113        |
| <b>5.</b> | <b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                                                                                                       | <b>119</b> |
| <b>6.</b> | <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                                               | <b>146</b> |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1</b> Günümüze kadar tür identifikasyonu sağlanan kanatlı haemosporidian türlerinin taksonomideki yeri.....                                                             | 3  |
| <b>Tablo 3.1</b> Haemosporidian mt-cytb gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen ve TaqMan real time PCR için primer ve prob sekansları .....                                      | 28 |
| <b>Tablo 4.1</b> 2015-2016 yılları arazi çalışmalarında halkalanan türler, sistematik yerleri, IUCN kategorileri ve statüleri .....                                                | 30 |
| <b>Tablo 4.2</b> 2015 yılı arazi çalışmasında yakalanan kuş türleri ve sayıları .....                                                                                              | 32 |
| <b>Tablo 4.3</b> 2016 yılı arazi çalışmasında yakalanan kuş türleri ve sayıları .....                                                                                              | 33 |
| <b>Tablo 4.4</b> 2015-2016 yılları arasında yakalanan kuşların yağ skoru ortalaması, tarsus, gaga, kanat, kuyruk uzunluğu ortalamaları (cm) ve ağırlık ortalamaları (gr) .....     | 34 |
| <b>Tablo 4.5</b> 2015-2016 yılları arasında araştırma sahasında identifiye edilen <i>Culicoides</i> türlerinin dağılımı.....                                                       | 36 |
| <b>Tablo 4.6</b> Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan <i>Culicoides</i> türlerinde belirlenen haplotipler .....                           | 37 |
| <b>Tablo 4.7</b> <i>Culicoides</i> türlerinde belirlenen haplotiplerin mt-COI sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre identiklik oranları .....                             | 40 |
| <b>Tablo 4.8</b> 2015-2016 yılları arasında araştırma sahasında identifiye edilen sivrisinek türlerinin dağılımı.....                                                              | 43 |
| <b>Tablo 4.9</b> Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan sivrisinek türlerinde belirlenen haplotipler .....                                  | 44 |
| <b>Tablo 4.10</b> Sivrisinek türlerinde belirlenen haplotiplerin mt-COI sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre identiklik oranları .....                                   | 45 |
| <b>Tablo 4.11</b> Kan emmiş dişi sivrisinek ve <i>Culicoides</i> bireysel örneklerden elde edilen genomik DNA izolatlarının kanatlı kanı yönünden moleküler analiz sonuçları ..... | 48 |
| <b>Tablo 4.12</b> <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların kanatlı mt-cytb sekans analizlerine göre kan beslenmesinde konak türlerinin dağılımı .....                           | 51 |
| <b>Tablo 4.13</b> Sivrisinek türlerine ait izolatların kanatlı mt-cytb sekans analizlerine göre kan beslenmesinde konak türlerinin dağılımı .....                                  | 52 |
| <b>Tablo 4.14</b> İncelenen kuşlarda Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları .....                                                                                  | 54 |

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 4.15</b> İncelenen yerli kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler prevalansı .....                                                  | 56  |
| <b>Tablo 4.16</b> İncelenen göçmen kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler prevalansı .....                                                 | 57  |
| <b>Tablo 4.17</b> Göçmen ve yerli kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin dağılımının istatistiksel analizi .....                                     | 57  |
| <b>Tablo 4.18</b> Sekans analiz sonuçlarına göre kuş türlerinde belirlenen Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu .....                  | 59  |
| <b>Tablo 4.19</b> İncelenen <i>Culicoides</i> ve sivrisinek örneklerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları .....                    | 99  |
| <b>Tablo 4.20</b> Sekans analiz sonuçlarına göre <i>Culicoides</i> ve sivrisinek türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu ..... | 101 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.1</b> <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü .....                                                                     | 37 |
| <b>Şekil 4.2</b> Çalışmada belirlenen <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....                                                                                                                                   | 39 |
| <b>Şekil 4.3</b> <i>Culicoides</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri.....                                                                                                          | 42 |
| <b>Şekil 4.4</b> Sivrisinek türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü .....                                                                            | 43 |
| <b>Şekil 4.5</b> Çalışmada saptanan sivrisinek türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....                                                                                                                                            | 45 |
| <b>Şekil 4.6</b> Sivrisinek izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri.....                                                                                                                 | 47 |
| <b>Şekil 4.7</b> Ergin dişi <i>Culicoides</i> örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı amplikonların jel elektroforezde görünümü .....                                                      | 48 |
| <b>Şekil 4.8</b> Ergin dişi sivrisinek örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı amplikonların jel elektroforezde görünümü .....                                                             | 49 |
| <b>Şekil 4.9</b> pJET1.2/blunt Cloning Vector DNA'sı içerisinde hedef kanatlı mt-cytb sekansı .....                                                                                                                                                                        | 50 |
| <b>Şekil 4.10</b> BLASTn algoritması kullanılarak kanatlı mt-cytb sekanslarının identifikasyonu .....                                                                                                                                                                      | 50 |
| <b>Şekil 4.11</b> Bazı <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> ve <i>Leucocytozoon</i> pozitif kanatlı örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü..... | 53 |
| <b>Şekil 4.12</b> <i>Haemoproteus nucleococondensus</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                                                                                                                                                              | 62 |
| <b>Şekil 4.13</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri.....                                                                                                                                                                                  | 63 |
| <b>Şekil 4.14</b> <i>Plasmodium lutzii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                                                                                                                                                                          | 64 |
| <b>Şekil 4.15</b> <i>Plasmodium</i> sp. eritrositik gelişim dönemleri (trofozoit) .....                                                                                                                                                                                    | 65 |
| <b>Şekil 4.16</b> <i>Plasmodium relictum</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                                                                                                                                                                         | 66 |
| <b>Şekil 4.17</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler) .                                                                                                                                                        | 66 |
| <b>Şekil 4.18</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri (makrogametositler) .....                                                                                                                                                             | 67 |
| <b>Şekil 4.19</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                                                                                                                                                                 | 67 |
| <b>Şekil 4.20</b> <i>Plasmodium homonucleophilum</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit).....                                                                                                                                                                  | 68 |
| <b>Şekil 4.21</b> <i>Plasmodium ashfordi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit) .....                                                                                                                                                                        | 69 |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.22</b> <i>Plasmodium elongatum</i> 'un eritrositik gelişim dönemleri (trofozoitler) .....                          | 69 |
| <b>Şekil 4.23</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                    | 70 |
| <b>Şekil 4.24</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametosit).....           | 70 |
| <b>Şekil 4.25</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit).....                       | 71 |
| <b>Şekil 4.26</b> <i>Haemoproteus payevskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                      | 72 |
| <b>Şekil 4.27</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                    | 73 |
| <b>Şekil 4.28</b> <i>Haemoproteus fringillae</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri (genç gametosit ve makrogametosit). ..... | 74 |
| <b>Şekil 4.29</b> <i>Haemoproteus belopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                    | 75 |
| <b>Şekil 4.30</b> CXPIP23 ( <i>Plasmodium</i> sp.) eritrositik gelişim dönemleri.....                                         | 76 |
| <b>Şekil 4.31</b> IXOMIN03 ( <i>Plasmodium</i> sp.) eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit). .....                        | 76 |
| <b>Şekil 4.32</b> <i>Haemoproteus lanii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri.....                                           | 77 |
| <b>Şekil 4.33</b> <i>Haemoproteus lanii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri.....                                           | 78 |
| <b>Şekil 4.34</b> <i>Haemoproteus lanii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit), (x100) .....                    | 78 |
| <b>Şekil 4.35</b> <i>Haemoproteus lanii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit) .....                            | 79 |
| <b>Şekil 4.36</b> <i>Haemoproteus lanii</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri.....                                           | 79 |
| <b>Şekil 4.37</b> <i>Leucocytozoon balmorali</i> 'nin gelişim dönemi (makrogametosit). .....                                  | 80 |
| <b>Şekil 4.38</b> <i>Haemoproteus attenuatus</i> 'un eritrositik gelişim dönemleri.....                                       | 81 |
| <b>Şekil 4.39</b> <i>Plasmodium homonucleophilum</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (meront).....                             | 81 |
| <b>Şekil 4.40</b> <i>Haemoproteus motacillae</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                       | 82 |
| <b>Şekil 4.41</b> <i>Haemoproteus motacillae</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri.....                                      | 83 |
| <b>Şekil 4.42</b> <i>Haemoproteus passeris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri .....                                        | 84 |
| <b>Şekil 4.43</b> <i>Haemoproteus passeris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri (makrogametositler).....                     | 84 |
| <b>Şekil 4.44</b> <i>Plasmodium relictum</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                            | 85 |
| <b>Şekil 4.45</b> <i>Haemoproteus passeris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri .....                                        | 85 |
| <b>Şekil 4.46</b> <i>Haemoproteus passeris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler) .....           | 86 |
| <b>Şekil 4.47</b> <i>Haemoproteus paranucleophilus</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit) .....                  | 87 |
| <b>Şekil 4.48</b> <i>Leucocytozoon sakharoffi</i> 'nin gelişim dönemleri .....                                                | 88 |
| <b>Şekil 4.49</b> <i>Plasmodium relictum</i> 'un eritrositik gelişim dönemleri.....                                           | 88 |
| <b>Şekil 4.50</b> <i>Plasmodium relictum</i> 'un eritrositik gelişim dönemleri.....                                           | 89 |



|                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.51</b> <i>Haemoproteus passeris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri .....                                                                                                                                                                                     | 89  |
| <b>Şekil 4.52</b> <i>Haemoproteus palloris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri. ....                                                                                                                                                                                     | 90  |
| <b>Şekil 4.53</b> <i>Haemoproteus majoris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri .....                                                                                                                                                                                      | 91  |
| <b>Şekil 4.54</b> <i>Plasmodium ashfordi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (trofozoit) .....                                                                                                                                                                             | 91  |
| <b>Şekil 4.55</b> <i>Leucocytozoon berestneffi</i> 'nin gelişim dönemleri.....                                                                                                                                                                                             | 92  |
| <b>Şekil 4.56</b> <i>Haemoproteus hirundinis</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler) .....                                                                                                                                                      | 93  |
| <b>Şekil 4.57</b> <i>Plasmodium homonucleophilum</i> 'un eritrositik gelişim dönemi (trofozoit).....                                                                                                                                                                       | 93  |
| <b>Şekil 4.58</b> <i>Haemoproteus pastoris</i> 'in eritrositik gelişim dönemleri .....                                                                                                                                                                                     | 94  |
| <b>Şekil 4.59</b> <i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemleri .....                                                                                                                                                                             | 95  |
| <b>Şekil 4.60</b> <i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit).....                                                                                                                                                                | 96  |
| <b>Şekil 4.61</b> <i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                                                                                                                                                               | 97  |
| <b>Şekil 4.62</b> <i>Haemoproteus parabelopolskyi</i> 'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit) .....                                                                                                                                                               | 97  |
| <b>Şekil 4.63</b> Bazı <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> ve <i>Leucocytozoon</i> pozitif insekt örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. .... | 98  |
| <b>Şekil 4.64</b> Bazı <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> ve <i>Leucocytozoon</i> izolatlarına ait jelpürifiye mt-cytb gen bölgesi amplikonların jel elektroforezde görünümü. ....                                                                                    | 100 |
| <b>Şekil 4.65</b> Araştırmada kanatlı konak ve vektörlerde belirlenen <i>Plasmodium</i> tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BA ve ML analizine göre filogenetik ilişkileri. ....                                                                                  | 106 |
| <b>Şekil 4.66</b> Araştırmada kanatlı konak ve vektörlerde belirlenen <i>Haemoproteus</i> tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BA ve ML analizine göre filogenetik ilişkileri. ....                                                                                | 110 |
| <b>Şekil 4.67</b> Araştırmada kanatlı konaklarda belirlenen <i>Leucocytozoon</i> tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BA ve ML analizine göre filogenetik ilişkileri. ....                                                                                         | 112 |
| <b>Şekil 4.68</b> Sybergreen Real Time PCR'da genomik DNA ve linearize plazmid DNA izolatlarında belirlenen amplifikasyon eğrileri .....                                                                                                                                   | 113 |
| <b>Şekil 4.69</b> Sybergreen Real Time PCR'da genomik DNA ve linearize plazmid DNA izolatlarına ait amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü .....                                                                                                                       | 113 |
| <b>Şekil 4.70</b> Sybergreen Real Time PCR'da erime eğrisi analizlerinde <i>Haemoproteus</i> nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları. ....                                                                                                        | 114 |
| <b>Şekil 4.71</b> Sybergreen Real Time PCR'da erime eğrisi analizlerinde <i>Plasmodium</i> nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları. ....                                                                                                          | 115 |

|                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.72</b> Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde <i>Leucocytozoon</i> nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları. ....                                                                 | 115 |
| <b>Şekil 4.73</b> Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde <i>Haemoproteus</i> , <i>Plasmodium</i> ve <i>Leucocytozoon</i> nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısılarının birlikte görünümü. .... | 116 |
| <b>Şekil 4.74</b> Sybergreen Real Time PCR’da <i>Haemoproteus</i> linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı .....                                                                                | 117 |
| <b>Şekil 4.75</b> Sybergreen Real Time PCR’da <i>Plasmodium</i> linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı .....                                                                                  | 117 |
| <b>Şekil 4.76</b> Sybergreen Real Time PCR’da <i>Leucocytozoon</i> linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı .....                                                                               | 118 |

## ÖZET

Sultan Sazlığı ekosisteminde 2015 ve 2016 yıllarının Mayıs - Eylül ayları arasında iki sezon boyunca yürütülen bu çalışmada kanatlı haemosporidian parazitlerin, vektör-konak-parazit bütününde moleküler ekolojisi araştırılmıştır. Saha çalışmaları boyunca uygun sis ağırları ile altı dizi içerisinde 23 aileye ait 39 türden toplam 565 kuş yakalanıp halkalanmış ve kan örnekleri alınmıştır. Yine eş zamanlı olarak araştırma yöresinde uygun insekt tuzakları ile toplam 6526 *Culicoides* ve 3670 sivrisinek örneği toplanmıştır. Çalışma ile Sultan Sazlığı ekosisteminin başta Passerin kuş popülasyonlarında *Haemoproteus* ve *Plasmodium* nesillerinin bulaşma dinamikleri açısından ideal bir ortam oluşturduğu belirlenmiş ve her iki soya bağlı nesillerin ilgili ekosistemde genetik çeşitliliğinin yüksek olduğu, *Leucocytozoon* nesillerinin ise sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Morfolojik ve moleküler analizler ile potansiyel vektörler ve kuş türlerinde *Plasmodium* soyunda 18, *Haemoproteus* soyunda 38 ve *Leucocytozoon* soyunda da 10 parazit nesli tanımlanmış ve bunların sırasıyla iki, dört ve yine dörtü Dünyada ilk kez karakterize edilerek veri bankalarına kayıtları sağlanmıştır. Bunun yanında her üç soy için bulunan bazı nesiller araştırma yöresindeki bazı kuş türleri ile potansiyel vektörlerden ilk kez tanımlanmıştır. Bununla birlikte çalışma ile birçok patojenin bulaşma dinamiklerinde önem arz eden çeşitli sivrisinek ve *Culicoides* türlerinin genetik karakterleri ortaya konmuş ve DNA barkodları sağlanarak Türkiye ve bazıları da Dünya için özgün veriler olarak genetik veri tabanlarında kayıtları sağlanmıştır. Ayrıca bu kanla beslenen insektlerin yörede kan beslenmelerinde konak spektrumları üzerine de özgün veriler elde edilmiş ve başta *Cx. pipiens* kompleks ve *Culicoides* türleri olmak üzere belirlenen ornitofilik beslenme karakteri ile Passerin kuşlar için patojenlerin naklinde potansiyel risk oluşturdukları görülmüştür. Bunun yanında proje ile *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin soy bazlı ayrımı için sybergreen tabanlı real time PCR metodolojisi geliştirilmiş ve bu tekniğin araştırma yöresinde belirlenen haemosporidian enfeksiyonların kanatlı ve vektörlerde identifikasyonunda sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sultan Sazlığı, Haemosporidia, kuş, vektör insekt, moleküler ekoloji

## ABSTRACT

The molecular ecology of avian haemosporidians on the basis of vector-host-parasite association was investigated in this study that was conducted in Sultan Marshes during two seasons of May-September of the years 2015 and 2016. A total of 565 bird species belonging to six order, 23 family and 39 species were caught with suitable mist nets, ringed and blood samples were collected. A total of 6526 *Culicoides* and 3670 mosquito specimens were also collected by suitable traps at the same time periods. It was determined that Sultan Marshes ecosystem serves an ideal condition for transmission dynamics of *Haemoproteus* ve *Plasmodium* lineages especially for Passerine bird communities and genetic variability of the lineages belonging to both genus was high, whereas the lineages of *Leucocytozoon* were limited. Totally 18, 38 and 10 parasite lineages belonged to *Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* genus, respectively were identified in bird species and potential vectors via morphological and molecular analyses in which two, four and also four lineages, respectively were firstly characterized in the World and deposited into the data banks. In addition, some lineages in each genus were also characterized for the first time from some bird and insect species found in the region. Beside this, genetic characterization of several mosquito and *Culicoides* species, important for transmission dynamics of several pathogens, was revealed and their DNA barcodes were provided and recorded in to the genetic data bases as a unique data for Turkey and some for the World. Furthermore, unique data also provided on the host preferences in blood meals of these hematophagous insects in the region and it was determined that mainly *Cx. pipiens* complex and *Culicoides* species possessed risk for transmission of pathogens to Passerine birds with their ornithophilic character. Also sybergreen based real time PCR assay was developed in the project in order to identify *Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon* lineages on the base of genus and the sensitivity and specificity of this technique was evaluated as high for the identification of the haemosporidian infections in avian and vector species determined in the research area.

**Key words:** Sultan Marshes, Haemosporidia, birds, vector insect, molecular ecology

## 1. GİRİŞ

Ötücü kuşlar (Passeriformes), özel ses yapılarına sahip çok sayıda kanatlı türünü içeren kuşlar (Aves) sınıfının en geniş takımını oluşturmaktadır. Bu takımda 110 familyada 5000'in üzerinde tür identifiye edilmiştir. Passerin kuşlarda haemosporidian ve coccidian (*Isospora*, *Atoxoplasma* ve *Sarcocystis*) çeşitli protozonlar enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonlar arasında haemosporidian protozoonlar büyük öneme sahiptir. Haemosporidianların tüm gruplarında evrimsel açıdan en yüksek tür çeşitliliği passerin kuşlarda belirlenmiş olup günümüze kadar identifiye edilen Haemosporidian türlerinden %42'si Passeriformes takımında bulunmaktadır. Ötücü kuşlar genel özellikleri itibarıyla hızlı gelişmekte, bir merkezden yayılma özelliğinde olup üçüncü çağın memeli ve maymunların gelişmiş olduğu dönemi boyunca (Miyosen dönem) dünya üzerinde hızlı bir yayılım göstermişlerdir (Valkiunas, 2005). Bu yayılım süreci günümüzde de devam etmekte olup Antarktika dışında tüm kıtalarda görülmektedir. Kanatlı türlerindeki çeşitlenme ile birlikte taşıdıkları parazit türlerinde de doğal olarak farklılaşmalar meydana gelmiştir. Passerin kuşlardaki zengin haemosporidian tür kompozisyonu daha çok bu ikincil orijinle ilişkili görülmektedir. Bu açıdan passerin kuşlar ve onların haemosporidian parazitleri, hem kanatlı konak hem de buna bağlı olarak parazit nesillerinin çok çeşitlilik göstermesiyle evrimsel parazitolojinin kurallarını tanımlamada en iyi model olarak kabul edilmişlerdir (Valkiunas, 2005). Türkiye'nin iklimi ve coğrafi konumu kuş çeşitliliği açısından son derece önemlidir. Türkiye Palearktik bölgeyle Afrika arasında göç eden kuşların göç yolları üzerinde önemli bir köprü rolü üstlenmektedir. Milyonlarca kuş, her yıl Türkiye üzerinden geçerek kıtalararası yolculuklarını sürdürmektedir. Bunlardan büyük bir kısmı dinlenmek, kuluçka yapmak veya kışı geçirmek üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bulunan sulak alanlara gelmektedirler. Sultan Sazlığı Afrika, Avrupa ve Asya arasındaki göçmen kuşların kullandığı iki ana göç yolunun kesişme noktasında bulunmakta olup yerli türlerin yanı sıra ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde olmak üzere senede iki kere gerçekleşen kuş göçü, bu ekosistemin zengin bir kuş faunasına sahip olmasını sağlamaktadır. Sultan Sazlığı ayrıca şu ana kadar saptanmış 301 kuş türüne ev sahipliği yapması ile Avrupa ve Ortadoğu'nun en önemli sulak alanlarından birisi olma özelliğine sahiptir. Bu proje ile Sultan Sazlığı ekosisteminde araştırma sezonlarında passerin ve bazı non-passerin kuşlarda haemosporidian etkenler konvansiyonel parazitolojik (kan frotilerinin incelenmesi, morfolojik identifikasyon) ve moleküler tabanlı teşhis yöntemleri ile araştırılmış, ekosistemde morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla yaygınlık gösteren Culicidae ve Ceratopogonid sinekler belirlenmiş; vektörlük potansiyelleri açısından kan emmiş ergin dişi sineklerde konak türü tayini için moleküler yöntemlerle kan beslenme analizleri gerçekleştirilmiştir. Potansiyel vektör sinek türlerinde haemosporidian etkenler moleküler olarak araştırılmıştır. Kanatlı konak ve

insektlerde belirlenen haemosporidian nesillerinin mithochondrial cytochrome b gen bölgelerinin karakterizasyonu ile vektör-konak-parazit filogenetik ilişkisinin ve moleküler populasyon genetiklerinin GenBank ve MalAvi veri tabanlarında şu ana kadar kayıtlı nesillerle birlikte değerlendirilerek bilimsel çıktılar elde edilmiş, ayrıca çalışma ile belirlenen yeni orijinal haemosporidian nesilleri dünya biyolojik klasifikasyonuna kazandırılmıştır. Proje ile ayrıca kanatlı konak ve vektörlerde *Hemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Plasmodium* etkenlerinin soy spesifik kantitatif teşhis amacıyla real time PCR tekniği geliştirilmiş ve etkinlik düzeyi referans izolatlarla birlikte değerlendirilmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİ

### 2.1 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Taksonomi, Morfoloji ve Biyolojisi

Kanatlı Haemosporidian parazitlerin güncel taksonomisi Pubmed Taxonomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) veri tabanı temelinde mevcut identifiye edilmiş türlerle birlikte Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1** Günümüze kadar tür identifikasyonu sağlanan kanatlı haemosporidian türlerinin taksonomideki yeri

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sınıflandırma</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Superkingdom: Eukaryota                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Kingdom: Chromalveolata                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Süperfilum: Alveolata                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Filum: Apicomplexa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sınıf: Aconoidasida                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Takım: Haemosporida                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Aile: Haemoproteidae                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Soy: <i>Haemoproteus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Tür: <i>H. anatolicum</i><br><i>H. antigonis</i><br><i>H. attenuatus</i><br><i>H. balmoralis</i><br><i>H. belopolskyi</i><br><i>H. caucasica</i><br><i>H. chelodinae</i><br><i>H. coatneyi</i><br><i>H. columbae</i><br><i>H. danilewskyi</i><br><i>H. elani</i><br><i>H. enucleator</i><br><i>H. erythrogravidus</i><br><i>H. fringillae</i><br><i>H. gavrillovi</i><br><i>H. hirundinis</i><br><i>H. homobelopolskyi</i><br><i>H. ilanpapernai</i><br><i>H. iwa</i><br><i>H. jenniae</i><br><i>H. kopki</i><br><i>H. lanii</i><br><i>H. macrovacuolatus</i><br><i>H. magnus</i><br><i>H. majoris</i><br><i>H. manwelli</i><br><i>H. mesnili</i><br><i>H. micronuclearis</i><br><i>H. minutus</i><br><i>H. motacillae</i><br><i>H. multipigmentatus</i> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>H. multivolutinus</i><br><i>H. noctuae</i><br><i>H. nucleofascialis</i><br><i>H. pallidulus</i><br><i>H. pallidus</i><br><i>H. palloris</i><br><i>H. parabelopolskyi</i><br><i>H. paranucleophilus</i><br><i>H. passeris</i><br><i>H. pastoris</i><br><i>H. payevskyi</i><br><i>H. picae</i><br><i>H. ptyodactylii</i><br><i>H. sacharovi</i><br><i>H. sanguinis</i><br><i>H. sylvae</i><br><i>H. syrnii</i><br><i>H. tartakovskyi</i><br><i>H. turtur</i><br><i>H. vacuolatus</i><br><i>H. witti</i> |
| Soy: <i>Parahaemoproteus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Tür: <i>P. bukaka</i><br><i>P. vireonis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Aile: Leucocytozoidae                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Soy: <i>Leucocytozoon</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Tür: <i>L. buteonis</i><br><i>L. caulleryi</i><br><i>L. dubreuilii</i><br><i>L. fringillinarum</i><br><i>L. gentili</i><br><i>L. lovati</i><br><i>L. macleani</i><br><i>L. majoris</i><br><i>L. pterotenuis</i><br><i>L. quynzae</i><br><i>L. sabrazei</i><br><i>L. schoutedeni</i><br><i>L. simondi</i><br><i>L. squamatus</i><br><i>L. toddi</i><br><i>L. ziemanni</i>                                                                                                                                 |
| Aile: Plasmodiidae                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Soy: <i>Plasmodium</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Alt Soy: <i>Giovannolaia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Tür: <i>P. circumflexum</i><br><i>P. homocircumflexum</i><br><i>P. lophurae</i><br><i>P. polare</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Alt Soy: <i>Haemamoeba</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Tür: <i>P. cathemerium</i><br><i>P. gallinaceum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>P. lutzi</i><br><i>P. relictum</i><br><i>P. tejerai</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Alt Soy: <i>Huffia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Tür: <i>P. Elongatum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Alt Soy: <i>Novyella</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Tür: <i>P. ashfordi</i><br><i>P. delichoni</i><br><i>P. globularis</i><br><i>P. homopolare</i><br><i>P. juxtannucleare</i><br><i>P. lucens</i><br><i>P. megaglobularis</i><br><i>P. multivacuolaris</i><br><i>P. nucleophilum</i><br><i>P. parahexamerium</i><br><i>P. paranucleophilum</i><br><i>P. rouxi</i><br><i>P. unalis</i><br><i>P. vughani</i> |
| Alt Soy: <i>Huffia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Tür: <i>P. Elongatum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Tür: <i>P. cuculus</i><br><i>P. guanggong</i><br><i>P. streptopelia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

Zorunlu heteroksen olan haemosporidian parazitlerin yaşam döngüleri oldukça karmaşıktır. Gelişimleri sırasında konaklarını ve üreme şekillerini değiştirerek morfolojik ve fonksiyonel açıdan çeşitli gelişim safhaları oluştururlar. Parazitler, omurgalı hayvan (kuş) ve vektörler (kan emici dipteranlar, Insecta: Diptera) olmak üzere iki konak grubunda gelişim gösterirler. Seksüel siklus gametogoni ve takiben gelişen sporogoni safhaları vektör sineklerde geçmektedir. Beslenme esnasında vektörler sporozoitleri kanatlılara inokule ederler ve agamik basamağa geçerler. Bu basamak, ekzoeritrositik meront veya şizont safhası olarak bilinir. Merontlardaki multiple veya agamoz bölünmenin bir sonucu olarak uninükleer merozoitler şekillenir. Ekzoeritrositik merozoitler yeni bir merogoni safhasını ve/veya kan hücrelerinde seksüel siklusun gelişimini oluşturan gametositler veya gamontların gelişimini indükler. Gametositler, morfolojik olarak farklı yapıları makrogametosit ve mikrogametositler olup seksüel potansiyele sahip gametleri (unizogamet) üretirler. Makrogametleri üreten hücreler makrogametosit, mikrogametleri oluşturanlar da mikrogametosit olarak bilinirler. Makrogametositler seksüel dimorfik karakterlerinden ötürü genellikle kolaylıkla mikrogametlerden ayırt edilebilirler. Makrogametosit çekirdekleri nükleolusa sahipken mikrogametlerde bu oluşum yoktur. Haemoproteidae ve Plasmodiidae ailelerindeki türler ayrıca pigment granüllerine (hemozin)

sahiptirler. Gametositlerdeki seksüel dimorfizm haemosporidian parazitlerin ayırt edici özelliklerinden biridir. Gametositler vektörler için enfektifdir (Valkiunas, 2005).

Kanatlılardaki enfeksiyon şu şekilde meydana gelmektedir: 1-Prepatent evre; bu safhada parazitler kandokusu dışında dokulara yerleşirler ve çok sayıda merozoitin oluşumunu sağlayacak şizontları geliştirirler. 2-Akut safha; bu dönemde çok sayıda merozoit kan dokusuna ulaşır ve kan hücrelerini enfekte eder ki, bu evre kanda parazitlerin görülmesi ve paraziteminin keskin bir şekilde artmasıyla karakterizedir, 3-Kriz safhası; parazitemi pik safhaya ulaştığında görülür, 4- Kronik safha ve 5-Latent enfeksiyon; parazitemi keskin bir şekilde düşer ve daha sonra konağın immun sistemine bağlı olarak parazitler elimine olur (Valkiunas, 2005).

Genel bir kural olarak parazitler kuşlarda daimi bir şekilde kalırlar. Bir kuş bir kere enfekte olduktan sonra yıllarca parazitin taşıyıcılığını yapar ve böylelikle potansiyel bir enfeksiyon kaynağı adayı olur. Vektörler enfekte kanatlılardan beslendikten kısa bir süre sonra gametositler vektörün bağırsaklarında gametogeneze uğrar ve oogami tip seksüel safha şekillenir. Gametogenezin şekillenmesinde oksijen ve karbondioksit konsantrasyonları, en belirgin uyarıcı görevi görmektedir. Bir makrogametosit bir makrogamet üretirken diğer yandan bir mikrogametosit de exflagellation safhasına geçer. Fertilizasyon hücre dışında şekillenir ve zigot teşekkül eder. Takiben zigot uzamış ve hareketli bir ookinete dönüşür. Ookinet, vektörün peritrofik membranına penetre olur ve bağırsak epitellerine geçer. Ookinet, bazal laminaya geçerek burada ookist şekline dönüşür. Ookist oluşum safhası süresince (sporogoni) ookistler içerisinde sayısız uzamış ve çekirdeksiz cisimcikler (sporozoitler) şekillenir. Daha sonra sporozoitler, hemosele geçer ve vektörün tükürük bezi hücrelerine penetre olurlar. Kanatlılar için enfektif form, sporozoit formudur. Vektör sineğin tükürük bezindeki sporozoitler, kan emme esnasında omurgalı konaklara nakledilirler. Zigot safhası hariç bütün gelişim dönemlerinde haemosporidian parazitler haploid karakterdedir. Yalnızca zigot diploid kromozoma sahiptir (Valkiunas, 2005). Ceratopogonidler ve Hippoboscidler kanatlı haemoproteidlerin vektörüdürler (Valkiunas, 2005).

Kanatlı malaryası etkeni *Plasmodium* parazitlerinin vektörleri sivrisineklerdir (Diptera: Culicidae). Bu dipteranların yalnızca dişileri kanla beslenmekte olup enfeksiyonun yayılmasından sorumludurlar. Vektör türlerinin büyük çoğunluğu *Culex*, *Aedes* ve *Culiseta* soylarına aittir. *Anopheles* soyundaki türler de belirli türlerin vektörüdürler. Ekzoeritrositer merogoni kanatlıların mezodermal hücrelerinde şekillenmektedir. Eritositik merontlar ise eritrositlerde meydana gelmektedir (Corradetti vd., 1970).

Leucocytozoid türlerin biyolojisinde simuliid sinekler (Diptera: Simuliidae) ana vektörlük yapmaktadır. Yalnızca tek *Leucocytozoon* türü (*Leucocytozoon caulleryi*) vektör olarak Ceratopogonid sinekleri kullanmaktadır. Kanatlılardaki ekzoeritrositik merogoni karaciğer parankim hücreleri (hepatositler), makrofajlar ve diğer retikuloendotelial hücrelerde meydana gelmektedir. Gametositler ve diğer gelişim evrelerinin hiçbirinde malaryal pigment (hemozoin) bulunmaz. Gametositler eritroblastlarda, eritrositlerde ve mononükleer lökositlerde gelişir. Merogoni kan hücrelerinde meydana gelmez (Valkiunas, 2005).

## 2.2 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Epidemiyolojisi

Kanatlı haemosporidian parazitleri evcil ve yabani kanatlılarda oldukça yaygın bir şekilde görülmektedir. *Haemoproteus* türleri, özellikle Coraciiformes, Piciformes ve Galliformes dizilerinde, morfolojik çeşitlilik bakımından yüksek bir çeşitliliğe sahiptir. Ancak bu türler, Passeriformes dizisinde yer alan kuşlarda daha yaygın olarak görülmektedir. Ayrıca en fazla tür sayısı da Passeriformes dizisinden bildirilmiştir (Bennett, 1993). Diziler arasında tespit edilen bu farklılığın, vektör sineklerin dağılımı, yaygınlığı ve kuşların yaşama alanları ile doğrudan ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Atkinson vd., 2009). Örneğin, deniz ve sahil kuşlarında *Haemoproteus* prevalansının diğer kuşlara göre daha düşük oranda belirlenmesi, hippoboscid veya ceratopogonid sineklerin bu kuşları daha sınırlı enfeste edebilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Mendes vd., 2005). Bunun yanında düşük prevalans değerlerinin, konak dirençliliği ve immun yanıtla da ilgili olabileceği rapor edilmiştir (Ricklefs, 1992; Sol vd., 2003). *Haemoproteus* türleri, hippoboscid veya ceratopogonid vektör sinekler tarafından kan emme esnasında alınmaktadır. Ancak parazitin vektör sinek tarafından başarılı bir şekilde nakledilebilmesi, sporogoni evresinin tamamlanması, sporozoitlerin üretilmesi ve tükürük bezlerine ulaşmasına bağlıdır. Nitekim, bu safha bazı zamanlarda çeşitli faktörlere bağlı olarak tamamlanamadığı ve dolayısıyla naklin gerçekleşmediği yapılan araştırmalarda rapor edilmiştir (Atkinson, 1991; Valkiunas vd., 2002). Ancak bu faktörler henüz tam olarak çözümlenememiştir (Atkinson vd., 2009). Hippoboscid sineklerle nakledilen *Haemoproteus* türlerinin aynı şekilde ceratopogonid sineklerle de nakledilebilme olasılığı deneysel olarak ispatlanamamasına rağmen Bobwhite bıldırcınlarından izole edilen *Haemoproteus lophortyx*'te yapılan çalışmalarda, bu parazit türünün *Culicoides bottimeri*, *Stilbometopa impressa* ve *Lynchia hirsuta* türü sineklerle nakledildiği ve dolayısıyla hem hippoboscid hem de ceratopogonid sineklerle aynı parazit türünün naklinin mümkün olabildiği bildirilmiştir (O'Roke, 1930; Tarshis, 1955; Mullens vd., 2006). Ancak Valkiunas (2005), *H. lophortyx* için vektör ceratopogonid sineklerde parazit taramasının yeterli ölçüde yapılamadığını dolayısıyla öne sürülen hipotezin tartışmalı

olduğunu kaydetmiştir. *Haemoproteus* türleri ve vektör spesifiteleri ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise (Bennett ve Peirce, 1990), matemli kumrulara (*Zenaida macroura*) *Haemoproteus* türleri araştırılmış ve *Haemoproteus sacharovi*'nin bu konaklarda yüksek prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmada *H. sacharovi*'nin vektörü olarak bilinen hippoboscid sineklerin konak üzerinde veya çevresinde çok nadir olarak bulunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar (Bennett ve Peirce, 1990) *H. sacharovi*'nin naklinde ceratopogonid sineklerin de rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak bu hipotez, diğer bilimsel çalışmalarla desteklenememiş ve yapılan son filogenetik çalışmalarda bu *Haemoproteus* türünün vektör spesifitelerinin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulanmıştır (Martinsen vd., 2008). Ceratopogonid sinekler tarafından nakledilen *Haemoproteus* türleri mevsimsel olarak kanatlı konaklara bulaşmakla birlikte bu bulaşma daha çok bahar ve yaz aylarında gerçekleşmektedir (Bennett ve Fallis, 1960). Ancak subtropikal iklimlere sahip bölgelerde bulaşma, uygun vektör sineklerin varlığıyla birlikte yıl boyunca da meydana gelebilmektedir (Atkinson vd., 1988). Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde hippoboscid sineklerle nakledilen *H. columbae*'nin kanatlı konaklara bulaşması yine mevsimsel olmakla birlikte özellikle vektör sineklerin popülasyonlarıyla yakından ilişkilidir. Genellikle sonbahar ve kış aylarında bulaşma oranlarında artış görülürken vektör popülasyonunun düşmesiyle birlikte bulaşma oranlarında da önemli derece düşüş meydana gelmektedir (Klei ve DeGiusti, 1975). Tropik ve subtropik bölgelerde yapılan sınırlı sayıda çalışmalardan elde edilen veriler, hippoboscid sineklerin popülasyonlarının değişmemesi durumunda, *Haemoproteus* türlerinin bulaşma ve prevalans değerlerinin de yıl boyunca sabit kaldığını göstermiştir (Ayala vd., 1977; Sol vd., 2000).

Kanatlı konakların uzun mesafeli, kıtalararası göçleri ve göç davranışları, avian haemosporidianların yaşam sikluslarını önemli derecede etkilemektedir (Laird, 1960; Waldenström vd., 2002; Hasselquist vd., 2007). Nearktik ve Palearktik bölgelerde yapılan araştırmalardan elde edilen sınırlı veriler; kanatlı haemosporidian parazitlerin göçmen kuşlara, göç ettikleri üreme alanlarında, tropik ve subtropik bölgelerdeki kışlama alanlarında veya her iki alanda birden bulaşabildiğini ortaya koymuştur. Böylece bulaşmanın gerçekleşebilmesinde, belirli coğrafik alanların etkili olduğu ve coğrafik alanlardaki vektör-parazit ilişkilerinin de bulaşmada önem arz ettiğini anlaşılmıştır (Valkiunas ve Iezhova, 2001; Hellgren vd., 2004b; Hasselquist vd., 2007). Bununla birlikte haemosporidian parazitlerin çeşitliliğinde; parazitlerin konak spesifitesi (Bennett vd., 1993b), konağın immun yanıtı (Ricklefs, 1992), genotipi (Bonneaud vd., 2006), yaş ve cinsiyeti (Davidar ve Morton, 1993; Powers vd., 1994; McCurdy vd., 1998), konak türlerinin coğrafik dağılımı (Tella vd., 1999), konağın göç edip etmediği (Bennett ve Fallis, 1960; Peirce ve Mead, 1978; Figuerola ve Green, 2000; Smith vd., 2004),

tüy rengi (Yezerinac ve Weatherhead, 1995) ve konağın yiyecek arama ile yuva yapma davranışları (Greiner vd., 1975; Garvin ve Remsen, 1997) gibi birçok iç ve dış faktörün etkisi olduğu ortaya koymuştur.

*Plasmodium* türleri kozmopolitan bir yayılışa sahip olup Antartika hariç tüm zoocoğrafik alanlardan bildirilmiştir. *Plasmodium* türleri ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde parazitin diğer kıtalara oranlara Avustralya'dan daha az rapor edildiği görülmüştür. Ancak bu durumun söz konusu kıtada diğer kıtalara kıyasla daha az örnekleme yapıldığından kaynaklandığı düşünülmüştür (Bennett vd., 1993a; Valkiunas vd., 2005a). *Plasmodium* soyunda yer alan *P. elongatum*, *P. relictum*, *P. circumflexum*, *P. vauhani*, *P. cathemerium*, *P. nucleophilum*, *P. rouxi*'nin oldukça geniş bir konak dağılımı gösterdiği ve kozmopolit bir yayılışa sahip oldukları bildirilmiştir (Atkinson vd., 2009). *Plasmodium* enfeksiyonları Struthioniformes, Coliiformes ve Trogoniformes dizileri hariç tüm kanatlı dizilerinden bildirilmiştir. Ancak bu dizilerde yer alan kuş türlerinin sadece yarısı enfeksiyonlar yönünden araştırılabilmiştir (Herman vd., 1976; Bennett, 1981; Bishop ve Bennett, 1992). En yüksek çeşitliliğe sahip olan diziler ise Galliformes, Columbiformes ve Passeriformes olarak belirlenmiştir (Valkiunas vd., 2005a). Kanatlı *Plasmodium* etkenleri arasında en geniş konak yelpazesine sahip olan *P. relictum*, şimdiye kadar 70 farklı kanatlı ailesinden bildirilmiştir (Atkinson vd., 2009). Geniş bir konak ağına sahip olan *Plasmodium* türlerinin çoğu, kanatlı konaklarda soy spesifik bir karakteristik göstermelerine rağmen bu durum için istisnalar oldukça fazladır. Dolayısıyla *Plasmodium* türlerinin kanatlı konaklarda, soya özgü bir karakteristik gösterip göstermediği tartışmalı bulunmuştur (Atkinson vd., 2009). *Plasmodium* türlerinin ayrımı; konak dağılımları, vektörleri ve eksoeritositik doku evrelerinin gelişme karakterlerine göre yapılabilmektedir. Günümüze kadar 40'tan fazla tür identifiye edilmesine rağmen bu sayı, var olan türlerin biyolojik karakterlerinin tekrar gözden geçirilmesi ve yeni türlerin tanımlanması ile birlikte gün geçtikçe artmaktadır. Moleküler metotların kullanıldığı ve mithochondrial genlerin sekanslandığı son taksonomik araştırmalar sonucunda, *Plasmodium* soyunda yer alan çok sayıda yeni nesil tanımlanmıştır (Bensch vd., 2004). Ancak çoğu araştırmada moleküler olarak karakterize edilen bu nesillerin eritrositik morfolojileri, doğal vektörleri veya karakteristik yaşam siklusları gibi konvansiyonel metotlar kullanılarak elde edilebilecek morfolojik ve biyolojik tanımlamalara yer verilmemiştir (Valkiunas vd., 2007b). Moleküler ve konvansiyonel yöntemlerin birlikte kullanıldığı çalışmalarda, *Plasmodium* soyunda yer alan beş altsoyun (*Haemaphysoba*, *Huffia*, *Bennettinia*, *Novyella* ve *Giovannolaia*) yaşam siklusları ve tarihleriyle ilgili birçok önemli veri ortaya konmuştur (Atkinson vd., 2009). Taksonomik ve filogenetik araştırmalar, söz konusu parazitlerin hızlı bir şekilde evrimleştiğini ve bu nedenle klasifikasyonlarının gelecek yıllarda tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir (Atkinson vd., 2009).

Altmıştan fazla culicine ve anopheline sivrisinek türünün, çeşitli *Plasmodium* türlerinin gelişiminde vektörlük görevi yaptığı deneysel olarak ispatlanmış olmasına rağmen (Huff, 1965) doğal yaşamda yapılan araştırmalarda çok az sayıda sivrisinek türü doğal vektör olarak saptanabilmiştir. Örneğin, laboratuvar çalışmalarında, 4 farklı soyda (*Culex*, *Aedes*, *Culiseta* ve *Anopheles*) yer alan 20'den fazla anopheline ve culicine sivrisinek türünün *P. relictum*'u nakledebildiği belirlenmiş ancak California ve Hawaii'de, doğal yaşamda yapılan çalışmalarda sadece üç sivrisinek türünün (*Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* ve *Culex stigmatasoma*) *P. relictum*'un doğal vektörü olduğu rapor edilmiştir (Reeves vd., 1954; LaPointe vd., 2005). Ilıman iklime sahip bölgelerde kanatlı *Plasmodium* nesillerinin bulaşması genellikle bahar ve yaz aylarında meydana gelirken tropik bölgelerde bu durumun ne zaman meydana geldiği hakkında çok az veri mevcuttur. *Plasmodium*'un bulaşmasında mevsimsel dönemlerin çok etkili olduğu görülse de enfeksiyonun meydana gelebilmesi ve bulaşmanın tam anlamıyla gerçekleşebilmesi için aynı habitatta uygun vektör ve uygun konağın bulunması gerektiği görülmektedir (Pérez-Tris ve Bensch, 2005; Hellgren vd., 2007b).

Leucocytozoidler, Antartika hariç dünya çapında yaygınlık gösteren parazitlerdir (Valkiunas, 1996; Valkiunas, 2005). Günümüze kadar identifiye edilen *Leucocytozoon* türlerinin çoğu Holarktik, Ethiopian ve Oriental zoocoğrafik bölgelerden bildirilirken, çok az sayıda tür Neotropikal ve Avustralya bölgelerinden rapor edilmiştir. Evcil ve yabani kanatlılarda leucocytozoonosis'e neden olduğu bildirilen şimdiye kadar sekiz türün tür identifikasyonu yapılmıştır. Bu türler arasında *L. simondi*, su kuşlarından; *L. marchouxi*, güvercin ve kumrulardan, *L. toddi* ise yırtıcı kuşlardan bildirilmiştir. Söz konusu bu üç türün özellikle Holarktik bölgede yüksek oranda bir yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu üç tür arasında en yaygın olan türün *L. toddi* olduğu ve bu türün Holarktik, Oriental ve Ethiopian bölgelerin yanında az da olsa Neotropikal bölgede de bulunduğu rapor edilmiştir. *L. marchouxi* ve *L. toddi*'nin ise Oriental ve Ethiopian bölgelerde yayılım gösterdiği bildirilmiştir (Atkinson vd., 2009). Leucocytozoidlerin coğrafik bölgelerdeki yayılımını etkileyen en önemli faktör, vektör popülasyonunun oluşabilmesi ve devamlılığı için gerekli olan uygun akarsu ve nehirlerin bölgede mevcut olma durumudur (Desser ve Bennett, 1993; Valkiunas vd., 2005b). *Leucocytozoon* türleri, Clements (2000) tarafından tanımlanan 28 kanatlı dizisinin 22'sinden ve 204 kanatlı ailesinin 113'ünden rapor edilmiştir. Öte yandan, bu parazitler, en çok Passeriformes (8 tür), Galliformes (7 tür) ve Coraciiformes (4 tür)'den bildirilmiştir. Diğer kanatlı dizilerinden ise sadece 1, 2 veya 3 adet tür bildiri yapılmıştır. *Leucocytozoon* vektörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda *L. caulleryi* dışında 35 *Leucocytozoon* türünün simuliid vektörleri deneysel çalışmalarla tür bazlı olarak ortaya konmuştur (Chang, 1975; Greiner, 1991; Valkiunas vd., 2005b). Bazı *Leucocytozoon* türleri birden çok Simuliid türü tarafından

nakledilebilirken bazı Simuliid türler de birden çok *Leucocytozoon* türünü nakledebilmektedir. *Leucocytozoon* türlerinin bulaşması diğer vektör kaynaklı enfeksiyonlarda olduğu gibi temel anlamda uygun vektörlerin mevcudiyeti ve bu vektörlerin kan emdiği kanatlı konağın periferik dolaşımında yeterli sayıda gametositi alabilmelerine bağlıdır. Ilıman iklime sahip bölgelerde vektör-konak-parazit uyumunun ideal olduğu bahar yükselmesi adı verilen zamanlarda bulaşma, başarıyla gerçekleştirilebilmektedir (Desser vd., 1968; Khan ve Fallis, 1970). Uygun çevresel şartlar, sıcaklık, nem, yağış ve oksijen bakımından zengin akarsuların varlığı gibi abiotik faktörler *Leucocytozoid* parazitlerin bulaşmasında önemli role sahiptirler. Özellikle simuliid sineklerin üreyebileceği akarsuların varlığı bulaşma için kritik bir öneme sahiptir (Adler vd., 2004). Yapılan araştırmalar, durgun su yataklarının doğal veya yapay olarak değişmesi ve akışkan bol oksijenli bir hale dönüşmesiyle artan simuliid popülasyonunun *Leucocytozoon* enfeksiyonlarının prevalansında artışlara yol açtığını ortaya koymuştur (Bennett vd., 1982). Bunun yanında, abiyotik faktörlerin çeşitliliği sonucunda, lökositozoidlerin yayılışı ve bulaşmasının vektör popülasyonunun da durumuna bağlı olarak kuzey iklimlerde sınırlı zaman aralıklarında, güney iklimlerde ise yıl boyunca devam ettiği bildirilmiştir (Atkinson ve van Riper lli, 1991; Forrester vd., 2003).

### 2.3 Kanatlı Haemosporidian Parazitlerin Teşhisi

*Haemoproteus* türlerinin teşhisinde gold standart yöntem, Giemsa-boyalı preparatlarda altın-kahverengi veya siyah pigment granülleriyle birlikte eritrositik gametositlerin belirlenmesi ve *Plasmodium* türlerine özgü eritrositik merontların bulunmamasıdır. Tür identifikasyonları geleneksel olarak intra-eritrositik gametositlerin morfolojilerinin belirlenmesine ve konak özgünlüğüne dayanmaktadır. Ancak bu durum, ilerleyen zaman içerisinde yoğun bir revizyona alınacak gibi görülmektedir. Moleküler teknikler soyların ayırımında ve yegane parazit nesillerinin identifikasyonunda kullanılmaya başlanmıştır. Sahip oldukları yüksek duyarlılık, bu teknikleri çok düşük parazitemiye sahip kuşların identifikasyonunda oldukça değerli kılmaktadır. Ancak bu teknikler henüz bireysel türlerin identifikasyonu noktasında geliştirilmeye ihtiyacı bulunmaktadır. Ancak güncel çalışmalar yakın zamanda bu durumun uygulanabilir olacağını desteklemektedir (Hellgren vd., 2007a; Valkiunas vd., 2007a).

*Haemoproteus* türlerinin, özellikle dolaşımdaki gametosit sayısının düşük olduğu kronik enfeksiyonlar ve *Plasmodium*'un intrasellüler meront karakteristiğinin mevcut olup olmadığının belirlenemediği durumlarda kanatlı *Plasmodium* türlerinden ayırımında zorluk çekilebilir. Parazit mithochondrial genomundan belirli bölgeleri amplifiye etmek amacıyla dizayn edilen çeşitli primer setleri *Haemoproteus* ve *Plasmodium*'u *Leucocytozoon*'dan (Hellgren vd., 2004b) veya PCR ürünlerinin restrüksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu her üç soy da birbirinden

(Beadell ve Fleischer, 2005) ayırt edebilmektedir. Ancak bireysel parazit nesillerinin identifikasyonu ve filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi için PCR ürünlerinin sekanslanması gerekmektedir (Atkinson vd., 2009).

*Haemoproteus* antijen yapısı olarak *Plasmodium*'dan farklı gözükmetedir. Ham antijen ekstraktları Kaya güvercinlerinde *H. columbae* için ELISA testi geliştirilmesinde kullanılmıştır (Graczyk vd., 1994a). Bu serolojik testin diğer kanatlı haemoproteidlerle spesifite ve sensitivitesi bilinmemekle beraber düşük yoğunlukta enfekte kanatlılarda soy düzeyinde teşhis için kullanışlı olabileceği ileri sürülmüştür (Atkinson vd., 2009).

*Plasmodium* türlerinin teşhisinde yine gold standard yöntem, Giemsa-boyalı preparatların incelenmesi ve eritrositik merontlar ve gametositlerle birlikte altın-kahverengi veya siyah pigment granüllerin belirlenmesidir. Tür identifikasyonları geleneksel olarak intra-eritrositik gametosit ve merontların ölçü ve yapılarının incelenmesi, olgun merontlar tarafından üretilen merozoit sayısı, konak eritrosit yapısındaki değişiklikler ve konak dağılımı, sivrisinek türlerine duyarlılık, morfoloji ve ekzoeritrositik merontların lokasyonu gibi diğer biyolojik özellikler temelinde yapılmaktadır (Garnham, 1966; Valkiunas, 2005). Çoğu identifikasyonların kan frotilerinden yapılması dolayısıyla yaşam siklusu özelliklerinin bilinemeyebileceği ve dolayısıyla parazit morfolojisinin yeteri düzeyde değerlendirilebilmesi için bir frotide yeterli olgun merontların ve gametositlerin bulunmasının zorunlu olduğu vurgulanmaktadır. Detaylı teşhis anahtarları ve tür tarifleri Valkiunas (2005), tarafından revize edilmiş ve bu monografi kanatlı *Plasmodium* türlerinin ayrımı için en güncel kaynağı oluşturmıştır.

Eritrositik merontların bulunmadığı durumlarda, her ne kadar *Haemoproteus* gametositleri sıklıkla biraz daha kalın ve daha stabil olsa da, *Plasmodium* gametositlerini *Haemoproteus* gametositlerinden ayırt edebilmek oldukça zor hale gelebilir. *Plasmodium* türlerinin dolaşımda merontlarının olması buna karşın *Haemoproteus* türlerinin olmaması faktörü, eğer şüpheli kanatlıdan alınan kanın deneysel subinokülasyonu için duyarlı evcil veya kafes yabani kanatlı varsa bilinmeyen bir *Plasmodium* türünün izole ve identifiye edilmesinde kullanılabilir. Enfekte konağın kanı intravenöz, intraperitoneal veya intramuskuler olarak steril konağa verilir ve enjeksiyondan birkaç hafta sonra inokülasyon yapılan konaktan kan frotileri hazırlanır. Eğer konak parazitlere duyarlı ise, sıklıkla akut enfeksiyon gelişir ve morfolojik analizler için merontlar ile gametositler hazır olarak bulunabilir. Paraziteminin yükseldiği dönemde de enfekte kan stabilatları hazırlamak için deneysel enfekte hayvandan kan alınır. Alınan enfekte kan, gliserin veya dimethyl sulfoxide (DMSO) gibi cryoprotectan maddeler ile belirli bir final konsantrasyonda olacak şekilde muamele edilerek porsiyonlanıp sıvı nitrojen (-196 °C)



dondurularak ileri çalışmalarda kullanılmak için stabilat olarak muhafaza edilebilir (Garnham, 1966).

Kanatlı malaryasının moleküler teşhisinde, ribozomal ve mithochondrial genler bazında moleküler yöntemlerdeki yeni gelişmelerin bu problematik konun çözümüne katkı sağlayacağına inanılmaktadır. Yüksek duyarlılıklarına karşın PCR yöntemleri halen özellikle çok düşük parazitemili enfeksiyonları teşhiste yetersiz kalabilmektedir (Jarvi vd., 2002). Bunun yanında son zamanlarda geliştirilen real-time PCR yöntemlerinin teşhiste uygulanmaya başlanmasıyla bu problemlerin çözümüne katkı sağlanmıştır .Moleküler teşhisteki güncel hızlı gelişmeler kanatlı *Plasmodium* türlerinin mithochondrial nesil bazında identifikasyonunu mümkün kılacak gözükmektedir (Valkiunas vd., 2007b). *Plasmodium* antijenik olarak *Haemoproteus*'tan farklı gözükmektedir. *P. relictum* ham antijen ekstraktları kafes ve yabani penguenlerde ELISA testi geliştirilmesinde kullanılmıştır (Graczyk vd., 1994a; Graczyk vd., 1994b). Standart immunoblotting teknikleri de yabani ve deneysel enfekte passerinlerde *Plasmodium* antikorlarının identifiye edilmesinde çalışılmıştır (Atkinson vd., 2001). Ne ELISA ne de immunoblotting teknikleri *Plasmodium* türlerinin ayırımında yeterli bulunmalarına karşın mikroskopi veya PCR'da gözden kaçacak düşük yoğunlukta enfeksiyon taşıyan kanatlılarda soy düzeyinde teşhislerin sağlanması kullanışlı olabileceği bildirilmiştir (Atkinson vd., 2001).

*Leucocytozoon* enfeksiyonlarının teşhisi geleneksel olarak Giemsa-boyalı perifer kan frotilerinde karakteristik gametositlerin belirlenmesiyle yapılmaktadır (Valkiunas, 2005). Gametositlerin morfolojik ve metrik karakteristikleri, konak faktörü ve uygun açıklayıcı literatürler kullanılarak tür identifikasyonları yapılabilir. Bu amaçla Valkiunas (2005) tarafından hazırlanmış olan monografi en açıklayıcı ve kapsamlı identifikasyon bilgilerini içermektedir. Leucocytozoonosis'in teşhisinde klinik belirtilerin (zellikle anemi) gözlemlenmesi, tipik makro ve histolojik lezyonların varlığı, ve *Leucocytozoon* spp. gametositlerinin kanda varlığı bütününde ele alınmalıdır (Wobeser, 1997). Genç kuşlarda şekillenen ölüm, parazitemi yokluğunda da ortaya çıkabilir. Buna karşılık, leucocytozoonosis belirtisi olmayan kuşlarda da parazitemi görülebilir (Herman vd., 1975; Wobeser, 1997). 1970'li yılların başlarından başlamak üzere tavuklarda *L. caulleryi*'ye karşı agar gel precipitation (Morii, 1972), counter-immunoelectrophoresis (Fujisaki vd., 1980), immunofluorescence (Fujisaki vd., 1981; Isobe ve Akiba, 1982), ELISA (Isobe ve Suzuki, 1986, 1987), immunoblot analizi (Isobe vd., 1998) ve latex agglutination test (Ito ve Gotanda, 2005) gibi bazı serolojik testler geliştirilmiştir. Diğer *Leucocytozoon* türlerine karşı ise her hangi bir serolojik test geliştirme çalışması günümüze kadar bulunmamaktadır.

Moleküler testler ile geleneksel geçerli morfolojik türlerin bağlantılı olarak incelenmesi ile yakın zamanda bu organizmaların ekolojisi ve kriptik veya alt türlerin tanımlanması için önemli teşhis araçlarının geliştirilebileceği kaydedilmiştir (Martinsen vd., 2006; Sehgal vd., 2006).

#### **2.4 Moleküler Veriler Işığında Kanatlı Haemosporidianlarında Global Çeşitlilik**

Kanatlı malarya'sı (*Plasmodium* spp.) ve diğer haemosporidianlar (*Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* spp.) vektör kaynaklı kan parazitlerinin çeşitlilik gösteren bir grubu olup birçok kanatlı familyasında yaygın olarak bulunurlar (Valkiunas, 2005). Kanatlı haemosporidianların yaşam geçmişleri, morfoloji ve klasifikasyonları geleneksel olarak ışık mikroskopisi ile çalışılmıştır (Valkiunas, 2005). Ancak moleküler yöntemlerin enfeksiyonların identifikasyonunda kullanılmaya başlanması araştırmalarda artışa yol açmış ve parazitlerin genetik çeşitliliği ve konak özgünlüğü üzerine etkileyici bakış açıları getirmiştir (Hellgren vd., 2009; Ventim vd., 2012). Bunun yanında enfeksiyonların araştırılmasında nested PCR primerlerinin dizaynı saptama etkinliğini artırmış ve bu da özellikle tipik olarak düşük düzey parazitemi bulunan kronik enfeksiyonlarda fayda sağlamıştır (Waldenström vd., 2004). Moleküler çalışmalar günümüze kadar 2700'ün üzerinde yegane kanatlı haemosporidian neslini ortaya çıkarmış ve dolayısıyla bu sonuçlar da nesillerin coğrafik dağılımının kayıt altına alınmasını ve araştırmaların disipline edilmesini kolaylaştırmak için koordine bir veri bankasının (Mal- Avi <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) oluşturulmasında yönlendirici olmuştur (Bensch vd., 2009). Bu hızlı gelişen alandaki yeni görüşler ortaya çıkarılırken, primer olarak moleküler ve mikroskobik metodların avantaj ve dezavantajları üzerinde yoğunlaşmıştır (Braga vd., 2011; Alfonso, 2012). Örneğin, miks türlerle oluşan haemosporidian enfeksiyonların yaygın PCR yöntemleriyle büyük oranda gözden kaçırıldığı dolayısıyla bu noktada miks enfeksiyonların identifikasyonu ve tarif edilmesinde kullanılan mevcut moleküler metodolojilerin sınırlı kaldığı vurgulanmıştır (Valkiunas vd., 2006; Martinez vd., 2009).

Kanatlı haemosporidian mt-cytb sekansları temelinde biyocoğrafik bölgeler boyunca heterojenik olarak dağılım gösteren yüksek çeşitlilikte parazit nesilleri ortaya çıkarılmıştır. Kanatlı haemosporidianları için sıcaklık ve yağış, parazit gelişimini ve vektör beslenme fırsatlarını teşvik ederek parazit farklılaşmasına yardımcı olabilen önemli abiotik değişkenlerdir (Beier, 1998; Santiago-Alarcon vd., 2012b). Ancak, tropikal takım adalarında kanatlı haemosporidian çeşitliliğinin sınırlı olması, iklimsel şartların tek başına çeşitliliği yönlendiremeyeceği tezini desteklemektedir. Bundan ziyade haemosporidian çeşitliliğinin, kanatlı ve/veya vektör konak çeşitliliği ile daha yakın ilişkili olabileceği kaydedilmiştir (Grenyer vd., 2006; Foley vd., 2007). Nitekim, birçok vektörün çok çeşitli kanatlı konak türünden

beslenebilmesi (Ejiri vd., 2011; Santiago-Alarcon vd., 2012a) bu parazitlerin yeni konakları enfekte edebilmesi için fırsatları artırmakta (Örn., konak değişimi) ve bu durum da daha çok tür zenginliği yüksek olan vektör-konak sistemlerinde gerçekleşmektedir. Filogenetik ve moleküler çalışmalar, potansiyel konakların filogenetik olarak orijinal konağa yakın olduğu durumlarda kanatlı haemosporidianlarının konak değişim (host-switching) işlevinin (Poulin, 2011) daha kolay ve yaygın olduğunu göstermiştir (Ricklefs vd., 2004; Krizanauskiene vd., 2006). Vektör ve konak uygunluğunun yanı sıra mikroskopi ile birlikte uygulanan moleküler teknikler kanatlı haemosporidianların evrimsel tarihçesinin daha iyi anlaşılabilmesini sağlayan parazit çeşitliliğinin genetik ve morfolojik açıklamasına yüksek katkı sağlamıştır (Martinsen vd., 2006; Palinauskas vd., 2007). Ancak birçok konak parazit topluluklarındaki çalışma eksikliği, bu parazitlerin gerçek çeşitliliğinin yeterli düzeyde anlaşılmasını güçleştirmektedir (Braga vd., 2011). Birçok moleküler tabanlı araştırmada mikroskobik analizlerin kullanılmaması miks enfeksiyonların gözden kaçırılmasına yol açmakta olup bu durum haemosporidian çeşitliliği üzerine bilgileri kısıtlayan bir faktör olarak etki göstermektedir (Valkiunas vd., 2006; Valkiunas vd., 2008). Perifer kan froti incelemelerinin moleküler analizlerle birlikte yürütülmesinin, kanatlı konaklardaki enfeksiyonların karakterize edilmesinde en ideal yaklaşım olduğu vurgulanmıştır (Clark vd., 2014).

Vektörlerde haemosporidian enfeksiyonlarının analizi üzerine çalışmaların yetersizliği, parazit nesillerinin gerçek çeşitliliğinin ve haemosporidian bulaşma dinamiklerinin anlaşılmasını sınırlamaktadır (Santiago-Alarcon vd., 2012b). Örneğin, Güney Malezya'da yürütülen moleküler çalışmalarda vektörlerde yüksek sayıda *Plasmodium* ve *Haemoproteus* spp. nesilleri identifiye edilmiş ve bunların bölgedeki kanatlı konaklardan henüz izole edilemediğinin altı çizilmiştir (Ishtiaq vd., 2008; Ishtiaq vd., 2010). Seksüel reproduksiyonun vektör konakta gerçekleşmesi (Valkiunas, 2005) sebebiyle, vektörler haemosporidian türlerin reproduktif izolasyonu için zorunludur (Gager vd., 2008). Bu açıdan vektör uygunluğunun teyit edilmesi oldukça önemli bir kriterdir. Bu teyit, mikroskobik analizlerle sporozoitlerin görülmesi ile sağlanmaktadır. Diğer yandan vektör uygunluğu açısından insektlerin baş/toraks (sporozoit gelişimi) ve abdomenlerinin (kan besleme ile alınan haemosporidian nesilleri) diseke edilerek ayrı moleküler analizleriyle de destekleyici veriler elde edilebilmektedir (White vd., 2006; Ishtiaq vd., 2008; Njabo vd., 2011). Vektör konak spesifitesi üzerine çalışmaların da, kanatlı konaklar arasında nesil dağılımının yönlendirilmesinde, vektörlerin rolünü belirlemeye yardımcı olduğu kaydedilmiştir (Medeiros vd., 2013). Ancak vektörlerin beslenme modelleri kompleks olabilir. Nitekim bazı türler konak mevcudiyetine göre beslenme tercihlerini ayarlayabilir (Santiago-Alarcon vd., 2012b). Bazı araştırmalar nesiller arasında vektör konak özgünlüğü için bir eylem olduğunu öne çıkarmış ve bu durumun da vektörlerin kanatlı konaklara

kendi diyetlerine özgü olan nesillerin geçişini kısıtlamak suretiyle ekolojik bariyerler olarak fonksiyon gösterebildiğini ortaya çıkarmıştır (Ejiri vd., 2008; Hellgren vd., 2008). Bu durum, farklı habitatlarda parazit prevalanslarındaki farklılıkların uygun vektörlerin varlığı veya yokluğu ile güçlü bir şekilde ilişkili olabileceğini göstermektedir (Mendes vd., 2005; Svensson ve Ricklefs, 2009; Yohannes vd., 2009). Parazit nesilleri arasındaki vektör-konak (vektör sinek türü) özelleşmesi ve bunun parazit farklılaşmasını yönlendirilmesindeki rolü üzerine ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Santiago-Alarcon vd., 2012b; Clark vd., 2014).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Saha Çalışmaları

##### 3.1.1 Sultan Sazlığı Ekosisteminde Kuş Örneklemesi ve Kan Örneklerinin Toplanması

Sultan Sazlığı, Kayseri ilinin güneyindeki Develi Ovası'nda 17.200 hektarlık bir alanı kaplamaktadır. Sazlık 38°.05 - 38°.40 kuzey ve 35°.00–35°.35 doğu koordinatlarında bulunmakta ve konum olarak; Erciyes Dağı'nın güneybatısında olup, Kızılırmak Havzasında bulunan Develi Kapalı havzasının en alçak kesimlerinde yer almaktadır. Sulak alanın büyük çoğunluğu Yeşilhisar İlçesinin sınırları içinde bulunmaktadır.

Çalışmada, kuşların göç ve üreme dönemleri dikkate alınarak 2015 ve 2016 yıllarının Mayıs - Eylül ayları arasında iki sezon boyunca Sultan Sazlığı ekosisteminin farklı noktalarında uygun sis ağıları (mist nets) kurularak kuş örneklemesi gerçekleştirilmiştir. Kuşların örneklenmesi ve kan toplanması için gerekli izinler Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (12.02.2014 tarih ve 14/37 Karar No) ve Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden (06.03.2014 tarih ve 72784983-488.04-51950 sayı) alınmıştır. Çalışmada naylon ipten örülmüş, siyah renkli sis ağıları kullanılmış olup ağların ağ gözü açıklığı düğümünden düğüme 16 mm , uzunluğu 7 m. ve 12 m'dir. Sis ağıları, araştırma alanında yoğun çalı, saz önleri gibi uygun noktalar belirlenerek dikine yerleştirilen iki alüminyum direğe gerilerek oluşturulmuştur. Direklerin ayakta devrilmeden durması için, zeminin durumuna göre demirden ya da tahtadan kazıklar kullanılarak belirli bir açı verilip ip yardımıyla sabitlenmiştir. Sis ağıları, Güney Doğu Avrupa Kuş Göç Ağı (SEEN) metodolojisine göre gün doğumundan gün batımına kadar tüm gün açık bırakılmış ve periyodik olarak her saat başı kontrol edilmiştir (Busse, 2000).

Saha çalışmaları boyunca uluslararası işbirlikleri çerçevesinde Erciyes Üniversitesi Vektörler ve Vektörlerle Bulaşan Hastalıklar Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından düzenlenen "Impact of Environmental Changes on Population Dynamics of Insect Pests and Vector-Borne Diseases" konulu uluslararası katılımlı konferansa konuşmacı olarak katılan ve akabinde bölgeyi ziyaret eden kanatlı haemosporidiaları ve morfolojik identifikasyonları üzerine dünyada önde gelen bilim insanlarından birisi olan Litvanya Doğa Araştırma Merkezi, Ekoloji Enstitüsünden Prof. Dr. Gediminas VALKUNAS, yine vektörler üzerine en önemli uzmanlardan olan Prof. Dr. Peter H. ADLER (Clemson Üniversitesi, Entomoloji, Toprak ve Bitki Bilimleri Departmanı, A.B.D) ve Dr. Elmer W. GRAY'ın (Georgia Üniversitesi Entomoloji Departmanı, A.B.D) konu ile ilgili teknik, metodoloji ve uygulanabilirlik açısından katkıları alınmıştır. Takip eden süreçte yine kanatlı haemosporidialarının moleküler ekolojisi

üzerine en önemli bilim insanlarından birisi olan ve dünyadaki mevcut tüm haemosporidian nesillerinin DNA barkodlarının yer aldığı MalAvi veri tabanının (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) kurucularından birisi olan İsveç Lund Üniversitesi Moleküler Ekoloji ve Evrim Departmanından Prof. Dr. Staffan BENSCH farklı dönemlerde saha çalışmalarına katılmış ve konu ile ilgili görüş ve deneyimlerini araştırma ekibiyle paylaşmıştır. Yurt dışı bilim insanlarından alınan görüş ve öneriler ile Sultan Sazlığı Ekosisteminde non-passerin bazı kanatlı komünitelerinin de (saha çalışmalarında bu kanatlıların halihazırda sis ağlarına takıldığı belirlenmiştir) örneklenmesi ile ekosistemdeki haemosporidian nesil çeşitliliği ve bulaşma dinamikleri üzerine daha özgün verilerin sağlanabileceği gündeme gelmiş ve dolayısıyla takiben 2016 yılı saha çalışmalarında söz konusu non-passerin kuşların da örneklenmesi ve örneklenerek passerin kuş sayısının artırılması için gerekli izin Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden (04.01.2016 tarih ve 63981849-488.04-298 sayı) alınmıştır.

**Halkalama:** Sis ağları yardımı ile yakalanan kuşların bacak çaplarına göre sol tarsuslarına 2 mm, 2,5 mm, 2,8 mm, 3,3 mm, 3,5 mm, 4,2 mm, 7 mm ve 9 mm çapında üzerinde geri bildirim adresi bulunan alüminyum halkalar takılmıştır. Kullanılan halkalar Ulusal Halkalama Programı çerçevesinde Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden temin edilmiş olup, standart bilgilerini üstünde yazılı olduğu EURING (Avrupa Halkalama Birliği) onaylı halkalardır. Halkalama işlemi Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü ve Güney Doğu Avrupa Kuş Göç Ağı (SEEN) tarafından verilmiş lisans sahibi halkacı Dr. Arzu GÜRSOY ERGEN tarafından yapılmıştır. Dr. ERGEN, OMÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından verilmiş "Kuş Halkalama ve Kuş Verisi Toplama" sertifikasına da sahiptir.

**Tür teşhisi:** Yakalanan örneklerin tür ve eşey tayinleri, bu türlerle ilgili literatürlerden (Heinzel vd., 2002; Jonsson, 2006; Svensson, 2006; Svensson vd., 2006) elde edilen verilerle örneklerin karakterleri karşılaştırılarak yapılmıştır. Örneklerin teşhisleri, çalışma sırasında arazide, halkalama işlemleri sırasında yapılmıştır.

**Yaş ve cinsiyetin belirlenmesi:** Kuşlar halkalandıktan sonra yaşı ve cinsiyeti belirlenmiştir. Yaş tayini için primer örtü tüyleri (birincil örtü tüyleri) ile sekonder örtü tüylerinin (ikincil örtü tüyleri) renk kontrastına, primer tüylerinin uçları ile kuyruk tüylerinin uçlarının sivri veya yuvarlak oluşuna ve özellikle sonbahar göç döneminde kuşların kafa kemikleşmesine bakılmıştır (Svensson, 2006).

**Ölçümler:** Sırasıyla her kuşun kanat formülü alınıp, kanat, kuyruk, tarsus ve gaga uzunluğu ölçülmüştür. Bütün ölçümler SEEN standartlarına uygun olarak 30 cm'lik (1 mm hassasiyet) duraksız cetvel ya da kumpas ile yapılmıştır.

- a. Kanat uzunluğu: Karpal eklem ile en uzun birincil uçuş teleğinin ucuna kadar olan mesafe ölçülmüştür (Busse, 2000).
- b. Kuyruk uzunluğu: Pygostyl (kuyruk teleklerinin çıkış noktası) ve kuyruk uç teleği arasındaki mesafe ölçülmüştür. Cetvelin bir ucu kuşun kuyruk telekleri üzerine yerleştirilip diğer ucu da ölçümü yapan kişinin karnına dayanmak suretiyle, kuş ile cetvel arasındaki açı 90° olacak şekilde kuş tutularak ölçüm alınmıştır (Busse, 2000).
- c. Kanat formülü: En uzun olan birincil uçuş tüyünün (kanat ucu), kısa olan diğer birincil uçuş tüylerine mesafeleri ölçülmüştür. Çoğu Passeriformes üyesinde, birincil uçuş tüyünün ilki genelde körelmiş ya da çok kısa olduğundan, birincil uçuş tüylerinin; ikincisi ile sekizincisi arasında bulunan tüylerin birbirleri arasındaki mesafeler ölçülmüştür. Ayrıca birinci sekonderin de ölçümü yapılmıştır (Busse, 2000).
- d. Yağ skoru: 8'li skalaya göre yağ skoru tanımlanmıştır (Busse, 2000).
- e. Kas skoru: 4'lü skalaya göre kas skoru tanımlanmıştır (Busse, 2000).

**Ağırlık:** Ağırlık 0,1 gr hassiyetli elektronik tartı ile ölçülmüştür.

**Kayıt:** Alınan ölçüler özel kayıt defterlerine kaydedilmiştir.

**Kan Örneklerinin Alınması:** Örneklenen ve halkalanan kuşların kanat altı venasından vücut ağırlığının % 1'ini geçmeyecek şekilde kan örneklemeleri yapılmış (Şekil 3.13) ve sonrasında örneklenen kuşlar yetkili halkalamacı tarafından değerlendirilip serbest bırakılmıştır. Heparinli mikrokapillar hematokrit tüplerine alınan kan örneklerinden sahada her kuş örneği için üç ayrı froti hazırlanmış ve prosedürüne uygun olarak metanol ile tespit edildikten sonra laboratuvara getirilmiştir. Heparinli mikrokapillar hematokrit tüplerine alınan kan örneklerinden bir kısmı moleküler analizler için SET Buffer (pH: 8.0; Titriplex III (EDTA) 186,12 g+ Tris 6,05 g + Sodium Chloride 8,76 g + 750 ml Steril Deiyonize Su) ile 1/10 oranında sulandırılarak mikrosantrifüj tüpleri içerisine alınmış (Hellgren vd., 2004a) ve laboratuvara getirildikten sonra genomik DNA izolasyonuna kadar -20°C'de muhafaza altına alınmıştır.

### 3.1.2 Sultan Sazlığı Ekosisteminde İnsekt (Diptera) Örneklerinin Toplanması

Araştırma sahasında *Culicoides* ve sivrisinek (Culicidae) örneklemeleri kuş örneklemelerine paralel olarak yürütülmüştür. *Culicoides* ve Culicidae örneklerin toplanması amacıyla “CDC Mini Light Trap, With Photo Cell & Air Gate 6VDC (Bioquip Inc., 2836BQX)”, “EVS Black CO<sub>2</sub> Light Trap, 4W Black Light Tube (Bioquip Inc., 2801BL)”, “Heavy Duty EVS CO<sub>2</sub> Mosquito Trap (Bioquip Inc., 2801A)” ve Onderstepoort ışık tuzakları kullanılmıştır. CO<sub>2</sub>’li tuzakların hazneleri kuru buz ile doldurulmuştur. Tuzaklar 17.30-19.00 saatleri arasında aktive edilmiş ve ertesi gün 07.00-08.30 saatleri arasında geri toplanmıştır. Sivrisinek örneklemede ayrıca pilli aspiratörlerden (D-Cell Aspirator Bioquip Inc., 2809D) de yararlanılmıştır. Simuliid örneklerin toplanması amacıyla söz konusu CO<sub>2</sub> tuzakları araştırma sahasında farklı noktalarda gündüz saatlerinde (10.00-17.00) aktive edilmiş ve yöredeki bazı küçük dere yatakları kontrol edilmiştir. Ayrıca araştırma sahasında yakalanan kuş türleri üzerinde Hippoboscid sineklerin varlığı araştırılmıştır.

Yakalanan örnekler saha çalışma istasyonunda öncelikle tutuldukları fileler içerisinde -20°C’de derin dondurucuya konularak insektlerin ölmesi sağlanmış ve tekniğine uygun olarak stereo mikroskopta incelenerek içerisinde Culicidae ve *Culicoides* örnekleri ayıklanmıştır. Ayıklanan örnekler identifikasyon ve moleküler analizler için %70 alkol içerisine alınmış ve kayıtları sağlanarak laboratuvara intikal ettirilmiştir.

## 3.2 Laboratuvar Çalışmaları

### 3.2.1 Perifer Kan Frotilerinin Boyanması ve Analizi

Laboratuvarda kan frotilerinin %10 (pH: 7,2) Giemsa Buffer ile protokole (Valkiunas, 2005) uygun olarak boyamaları gerçekleştirilmiştir. Kan frotilerinin incelenmesi önerilen protokole (Valkiunas, 2005) göre moleküler analiz sonuçları pozitif bulunan izolatlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Perifer kan frotileri dijital kamera ataçmanlı ışık mikroskobunda (Olympus BX51) 40, 60 ve 100X objektifler kullanılarak haemosporidian parazitlerin gelişme dönemleri yönünden incelenmiş ve gerekli ölçüm, analiz ve görüntüleme işlemleri CellSens Standard 1.13 (Olympus) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen haemosporidian gelişim dönemlerine göre identifikasyon çalışmaları ilgili teşhis anahtarlarına (Valkiunas, 2005) göre yapılmıştır. Bununla birlikte proje yürütücüsü Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM ve ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Dr. Arif ÇİLOĞLU oluşturulan işbirliği çerçevesinde Malaria RCN (Research Coordination Network, USA) finansal desteği ile Litvanya’ya Doğa Araştırma Merkezi, Ekoloji Enstitüsünden Prof. Dr. Gediminas



VALKUINAS'ın laboratuvarına ziyarette bulunmuşlar ve bazı pozitif örneklerle ait sürme preparatları haemosporidian türleri yönünden analizlerini gerçekleştirmişlerdir.

### **3.2.2 İnsekt (Diptera) Örneklerinin İdentifikasyonu**

Saha çalışmalarında toplanan ve ayıklanarak %70 alkol içerisinde alınan sivrisinek ve *Culicoides* örneklerinin identifikasyonları dijital kamera ataçmanlı stero-mikroskop (Olympus SZX-16) altında sivrisinek (Darsie ve Samanidou-Voyadjoglou, 1997; Schaffner, 2001) ve *Culicoides* türleri (Rawlings, 1996; Mathieu vd., 2012) için ilgili teşhis anahtarlarına göre yapılmış ve görüntüleme işlemleri CellSens Standard 1.13 (Olympus) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İdentifiye edilen örneklerde dişi ve erkekler ayrılmış, toplanma tarihi ve türe göre kategorize edilerek %70 alkol içerisinde moleküler analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3 Kanatlı Kan Örnekleri ve İnsekt (Diptera) Örneklerinden Genomik DNA izolasyonu**

Set buffer içerisinde 1/10 oranında sulandırılmış olan kan örneklerinden ve insekt örneklerinden genomik DNA izolasyonları, DNA ekstraksiyon kitleri (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA, Corning; GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific) ile ilgili basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilen ve morfolojik identifikasyonları sağlanan dişi *Culicoides* ve sivrisineklerden moleküler genotipleme ve kan besleme için bireysel örnekler alınmış geri kalan örneklerden haemosporidian parazitlerin araştırılması amacıyla havuzlar (~10 örnek/havuz) oluşturulmuştur. Bireysel ve havuz örneklerinin genomik DNA izolasyonundan önce sıvı azot ve steril pestleler ile ön homojenizasyonu gerçekleştirilmiş ve örneklerle lysis buffer eklenerek bir gece 56°C'de su banyosu ve/veya kuru ısıtmalı blokta inkübe edilmiştir. Final basamakta elüsyon kanatlı örnekleri için 50 µl insekt örnekleri için 35 µl'ye ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Örneklerle ait genomik DNA'lar kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bir kısım bireysel insekt örneklerinden ayrıca Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific) ile DNA izolasyonuna tabii tutulmadan direkt PCR ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4 Kanatlı Kanları ve İnsektlerden Elde Edilen Genomik DNA İzolatlarında Haemosporidan Parazitlerin Mithocondrial Cytochrome b (Mt-cytb) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Bireysel ve havuzlardan elde edilmiş genomik DNA izolatları haemosporidan parazitlerin mt-cytb gen bölgesinin 524 bp kısmını hedef alan primerler ile Nested PCR'da analiz edilmiştir. Nested PCR analizlerinin birinci basamağında haemosporidianlar için genel HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') ve HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'); ikinci basamağında *Leucocytozoon* spesifik HaemFL (5'-ATGGTGT TTT AGATACTTACATT-3') ve HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') ve *Plasmodium/Haemoproteus* spesifik HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATAT ATGCATG-3') ve HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') primerleri kullanılmıştır (Bensch vd., 2000; Hellgren vd., 2004a). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 20 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. Bazı örneklerin PCR miksi için Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo scientific) kullanılmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 2 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR basamağı için ön denatürasyon: 94°C'de 3 dk; 30 siklus (1. PCR) 35 siklus (2. PCR), denatürasyon: 95°C'de 30 s, bağlanma: 50 C'de 30 s, uzama: 72°C'de 45 s; final uzama: 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. Nested PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları ve çalışma süresince elde edilen genomik ve plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### 3.2.5 Moleküler İdentifikasyon ve Genotipleme için Sivrisinek ve *Culicoides* Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Morfolojik identifikasyonları sağlanan dişi sivrisinek ve *Culicoides* bireysel örneklerinin tür identifikasyonlarının doğrulanması ve filogenetik analizleri için mt-COI gen bölgeleri PCR'da amplifiye edilmiştir. Bireysel dişi *Culicoides* örneklerden izole edilmiş genomik DNA ekstraktları *Culicoides* genusunun mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) geninin 523 bp parsiyel kısmını amplifiye eden C1-J-1718(F) (5'-GGAGGATTTGGAA ATTGATTAGTTCC-3')

ve C1-N-2191(R) (5'-CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3') (Simon vd., 1994) primerleri ve aynı bölge için modifiye edilmiş C1-J-1718M (F) (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT-3') ve C1-N-2191M(R) (5'-CAGGTAAAATTTAAAATATAAACTTCDGG-3') (Dallas vd., 2003) primerleri ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 10-20 ng template DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol ön denatürasyon: 94°C'de 3 dk; 35 siklus, denatürasyon: 94°C'de 30 s, bağlanma: 50°C'de 30 s, uzama: 72°C'de 30 sn; final uzama: 72°C'de 7 dk olarak ayarlanmıştır.

Bireysel dişi sivrisinek genomik DNA izolatlarının mt-COI gen bölgesinin parsiyel 709 bp kısmı, LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve HCO2198 (5'-TAACTTCAGGGT GACCAAAAAATCA-3') (Hebert vd., 2003b) primerleri ile PCR'da amplifikasyona tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda, 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM her bir primer, 0,5 mM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polymerase ve 10-20 ng template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol 96 °C'de 1 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 55 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 1,5 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır (Hebert vd., 2003b).

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları ve çalışma süresince elde edilen genomik ve plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### **3.2.6 Dişi Sivrisinek ve *Culicoides* Örneklerinde Kan Beslenme Analizlerinde Kanatlı Mt-cytb Gen Bölgesinin Amplifikasyonu**

İnsektlerde kan beslenmesinde kanatlı konak tayini için, dişi sivrisinek ve *Culicoides* bireysel örnekler için ait genomik DNA izolatlarında mt-cytb gen bölgesinden yaklaşık 550 bp kısmı amplifiye eden kanatlı spesifik Avian-3 (5'-GACTGTGAYAAAATYCCMTTCCA-3') ve Avian-8 (5'-GYCTTCAITYTTTGGYTTACAAGAC-3') primerleri ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir (Kim vd., 2009). Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda; 2,5 µl 10XPCR buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl 20 pmol her bir primer, 2 µl 200 mM her bir dNTP, 1,25U Taq DNA polymerase ve 50ng/µl template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra karışım thermalcyclera ön

denatürasyon: 94°C'de 2 dk; 35 siklus, denatürasyon : 94°C'de 30s, annealing: 55°C'de 30s, extension: 72°C'de 60s (kanatlı), 90s (memeli); final extension: 72°C'de 4 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak kanatlı (şahin, tavuk) ve memeli (sığır, koyun, at, köpek) kanlarından izole edilmiş genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA ) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

### 3.2.7 Sekans ve Filogenetik Analizler

Kanatlı kanı ve insektlerden elde edilen genomik DNA izolatlarının haemosporidian parazitler yönünden PCR analizleri ile pozitif belirlenenlerine ait ampikonlar ile insekt mt-COI ampikonları ve yine insektlerden kan besleme PCR analizlerinde belirlenen mt-cytb ampikonları sekans analizleri için jel pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilmiştir. Sekans analizleri PCR analizlerinde kullanılan gen spesifik forward ve reverse primer dizileri ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca haemosporidian mt-cytb, insekt mt-COI gen bölgesi yönünden düşük kalitede bant profili sergileyen izolatlar ile kan beslenme analizlerinde olası miks türlerden kan emme durumu göz önüne alınarak kanatlı mt-cytb gen bölgesi ampikonları uygun plazmid vektöre klonlanmış ve akabinde rekombinant plazmid pürifikasyonları yapılmıştır. Klonlama ve plazmid pürifikasyon basamakları aşağıda açıklanmıştır.

#### İlgili Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin pJET1/2 Plazmidine Ligasyonu

Jel pürifikasyonu yapılmış PCR ürünlerinin klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu üreticinin önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| 2X Reaksiyon buffer          | 10 µl |
| PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek | 2 µl  |
| DNA Blunting enzim           | 1 µl  |
| Steril Deiyonize Su          | 5 µl  |
| Toplam                       | 18 µl |

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilmiş ve sonrasında hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışıma 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 22°C'de 30 dk bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır.

### **Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu**

Transformasyon için 5 µl'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan 100 µl OneShot TOP 10 chemically competent *Escherichia coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda karışım, 42 °C'de 1 dk tutulmuş ve hemen ardından buz üzerinde 3 dk bekletilmiştir. Böylece rekombinant plazmidin transformasyonu sağlanmıştır. Daha sonra karışıma oda ısısında bekletilen 250 µl S.O.C. medium (%2 Tryptone, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glikoz) eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcılı inkubatörde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı daha sonra LB (lysogeny broth) katı besiyerine ekilerek bir gece yine 37 °C'de inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyerine tekrar ekilmiştir. Besiyeri, 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

### **Klonlanmanın PCR Tarama ile Doğrulanması**

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini tespit etmek için koloni PCR taraması yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl I Taq master mix'i (Bio-Rad Hercules, CA, ABD), 0,4 µl pJET1.2 Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') ve pJET1.2 Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') primerleri ile karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlara katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılmıştır. Karışımlar steril deiyonize su ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denatürasyon: 94 °C'de 30 s, bağlanma: 60 °C'de 30 s, uzama: 72 °C'de 1 dk; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampikonlar %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

### **PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi Yerinde Çoğaltımı**

Pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler steril flasklar içinde 100 µl/ml ampicilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37°C'de 110 rpm'de çalkalayıcıda bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 ml'lik ependorflar içerisine alınarak 6000 g'de 15 dk

santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelletler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması**

Hücrel pelletlerden plazmid izolasyonu AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen, ABD) ve GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, ABD) kitleri ile ilgili prosedürlere göre yapılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid DNA lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **Restriksiyon Enzim ve PCR Analizleri**

Miniprep kitlerle saflaştırılan rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için *Ava I* ve *Xba I* (Thermo Scientific, ABD) 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 termal inaktivasyon için 65 °C'de 5 dk su banyosunda tekrar inkübe edilmiştir. Takiben, örnekler %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip klonlanan genin varlığı yönünden analiz edilmiştir. Bunun yanında ikinci bir doğrulama analizi yapılmıştır. Bu amaçla plazmid DNA'ların amplifikasyonu pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerlerinin kullanıldığı PCR analizleri ile yapılmış ve takiben elde edilen ampikonlar %1,5 'luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

Tüm hedef gen bölgesi için elde edilmiş olan pürifiye ampikonlar PCR primerleri ile rekombinant plazmid DNA'lar ise vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R10 (Kearse vd., 2012) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş

hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Haemosporidian mt-cytb gen bölgesi için elde edilen sekanslardan ayrıca PCR primerleri trimlenerek barkod bölge sekansları sağlanmıştır. Elde edilen sekansların Geneious R10 yazılımı (Kearse vd., 2012) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ve ayrıca kanatlı haemosporidian mt-cytb sekansları için MalAvi haemosporidian nesilleri sekans veri bankası (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) kullanılarak mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank ve MalAvi kayıtları sağlanmıştır. Çalışmada karakterize edilen izolatlarda DNA polimorfizmi ve haplotip yapısının belirlenmesinde DnaSP 5.10.01 (Librado ve Rozas, 2009) yazılımı kullanılmıştır. Intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) uzaklık modeli (Kimura, 1980; Nei vd., 2005) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (Tamura vd., 2013) gerçekleştirilmiştir. Haemosporidian nesillerinin, sivrisinek ve *Culicoides* türlerinin filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizleri uygulanmıştır. BI ve ML analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip belirlenen modeller filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılmıştır. BA ve ML analizleri Geneious R10 (Kearse vd., 2012) yazılımı üzerinden sırasıyla MrBayes (Huelsenbeck ve Ronquist, 2001) ve PhyML (Guindon ve Gascuel, 2003) pluginler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BA analizlerinde, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç) “burn in” olarak çıkarılmıştır. ML analizleriyle oluşturulan ağaçların güvenilirliğinin tespit edilmesinde 1000 tekrarlı Bootstrap testi kullanılmıştır.

### 3.2.8 Real Time PCR Analizleri

*Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin soy düzeyinde kantitatif identifikasyonları için mt-cytb bölgesini hedef alan primerler (Tablo 3.1) dizayn edilerek sybergreen tabanlı real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle çalışma boyunca elde edilmiş farklı konaklardan *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerine ait mt-cytb sekansları GenBank veri tabanındaki homolog bazı nesillerle birlikte Geneious R10 (Kearse vd., 2012) yazılımı üzerinden MAFFT (Kato vd., 2002) plugin kullanılarak hizalama analizlerine tabii tutulup primerler için uygun bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil 3.26). Ayrıca dizayn edilen primerlerin spesifikite konfirmasyonları primer blast veri tabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) yapılmıştır. İkincil yapılar ve primer dimer formasyonları da OligoAnalyzer3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)

ve Geneious R10 (Kearse vd., 2012) yazılımı üzerinden kontrol edilmiştir. Dizayn edilen primerlerin in silico analizlerinde mt-cytb geninin 144 bp bölgesini amplifiye ettiği ve ilgili soylara ait nesiller arasında soy bazlı olarak Tm (erime sıcaklığı) farklılıklarına yol açabilecek çeşitli nükleotid farklılıklarını (Amplifiye DNA fragmentinin %35,4'üne denk gelen toplam 51 nükleotid değişimi) içerdiği belirlenmiştir.

**Tablo 3.1** Haemosporidian mt-cytb gen bölgesinden dizayn edilen Sybergreen ve TaqMan real time PCR için primer ve prob sekansları

| Primer  | Dizilimi (5'---3')         | TM* (°C)  | Amplikon büyüklüğü |
|---------|----------------------------|-----------|--------------------|
| SyberF  | ACCWTGGGGWCAAATGAGTT       | 56,9-57,0 | 144bp              |
| SyberR2 | AATRTAAAATGTAATACRAARAATCT | 48,7-53,7 |                    |

Real time PCR analizleri CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR master mix (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, BioRad, ABD) üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 2X Master Mix           | 10 µl  |
| Forward primer (20 µM)  | 0,5 µl |
| Reverse primer (20 µM)  | 0,5 µl |
| Genomik DNA (20-30 ngr) | 1,0 µl |
| PCR Grade Deiyonize su  | 8 µl   |

Reaksiyonlar için termal profil polimeraz aktivasyonu ve ön DNA denatürasyonu için 98°C'de 3dk bir siklus, denatürasyon için 98°C'de 15sn, bağlanma için 55°C'de 20sn 40 siklus olarak ayarlanmış, akabinde melt curve analizleri için termal profil 65-95°C arası her 2sn'de 0.5°C artış olacak şekilde programlanmıştır. Erime eğrileri CFX Manager (BioRad, ABD) yazılımında analiz edilmiş ve Tm (melt temperature) değerleri elde edilen eğrilerin pik noktasına göre belirlenmiştir.

Real time PCR tekniğinin optimizasyonu ve standart eğrilerin oluşturulması için *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerine ait mt-cytb gen bölgesini ihtiva eden birer plazmid DNA seçilmiş ve sonrasında plazmid DNA'lar aşırı sarmallaşmış (supercoiled) plazmid DNA'nın olumsuz etkisinden kaçınmak için Eco88I (Aval) (Thermo Scientific, ABD) restriksiyon enzimi ile linearize hale getirilmiştir. Linearize plazmidler agaroz jelden pürifiye



edildikten sonra Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies, ABD) cihazında µg/ml düzeyinde konsantrasyonları ve safıkları ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra molar konsantrasyon düzeyinde linearize edilmiş plazmidlerin mikrolitersindeki DNA kopya sayısı belirlenmiş ve 1 µl template için  $10^7$ - $10^1$  hedef kopya olacak şekilde 10 tabanında dilüsyonları hazırlanmıştır. Dilüsyonlar yukarıdaki protokole göre iki tekrarlı çalışılmış ve Ct değerlerine göre standart eğriler oluşturulmuştur. Testin etkinliği (E) standart eğri slopuna göre ( $E = (10^{-1/\text{slope}})$ ) CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, ABD) cihazında ilgili yazılım ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir. İlgili tekniğin spesifite analizlerinde farklı kanatlı konaklardan izole edilmiş *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerine ait genomik DNA izolatları ile real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistik analizler IBM SPSS Statistics 20 yazılımında gerçekleştirilmiştir. İncelenen yerli ve göçmen kuşlardaki haemosporidian parazitlerin dağılımı non-parametrik testlerden Fisher's exact testi ile araştırılmıştır. İnsekt türlerinde minimum enfeksiyon oranlarının (MIRs) belirlenmesinde aşağıdaki standart formülasyon kullanılmıştır.

MIRs= Pozitif Baş/Toraks havuz sayısı/İncelenen toplam insekt sayısıX1000 (White vd., 2006).

#### 4. BULGULAR

##### 4.1 Sultanazade Yöresinde Örneklenen Kuş Türleri ve Özellikleri

Çalışma süresince altı dizi içerisinde 23 aileye ait 39 türden toplam 565 kuş yakalanıp halkalanmış ve kan örnekleri alınmıştır. Çalışma periyodu boyunca örneklenen ve halkalanan kuş türleri, IOC dünya kuş listesine göre (<http://www.worldbirdnames.org/>) sistematik olarak listelenerek çeşitli bilgileriyle birlikte Tablo 4.1’de verilmiştir. Ayrıca 2105 ve 2016 yıllarında saha çalışmalarında kuş türlerine göre örneklenen kuş sayıları sırasıyla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de, örneklenen kuşların yağ skoru ortalaması, tarsus, gaga, kanat, kuyruk uzunluğu ortalamaları ve ağırlık ortalamaları da Tablo 4.4’de gösterilmiştir. Çalışmada 2015 yılında halkalanan dört kuş (JB67547 *Acrocephalus scirpaceus*, FA14833, FA14811 ve FA14814 halka numaralarına sahip üç adet *Acrocephalus arundinaceus*) 2016 yılında tekrar yakalanmış (kontrol kuşu) ve kan örnekleri alınmıştır. Çalışma sırasında yakalanıp halkalanan JB 67555 halkalı *Acrocephalus melanopogon* (Bıyıklı Kamışcın) 11.11.2015 tarihinde, JB 67046 halkalı *A. melanopogon* 07.10.2016 tarihinde Agamon Gölü, Hula Vadisi İsrail’de yakalandığı ilgili araştırmacılar tarafından araştırma ekibine bildirilmiştir.

**Tablo 4.1** 2015-2016 yılları arazi çalışmalarında halkalanan türler, sistematik yerleri, IUCN kategorileri ve statüleri

| Takım           | Aile         | Bilimsel adı                | Türkçe                  | İngilizce              | IUCN | Statü   |
|-----------------|--------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|------|---------|
| Pelecaniformes  | Ardeidae     | <i>Ixobrychus minutus</i>   | Küçük Balaban           | Little Bittern         | LC   | YG      |
| Charadriiformes | Scolopacidae | <i>Tringa ochropus</i>      | Yeşil Dündükün          | Green Sandpiper        | LC   | G       |
| Coraciiformes   | Alcedinidae  | <i>Alcedo atthis</i>        | Yalıçapkını             | Common Kingfisher      | LC   | H/G/Y G |
|                 | Meropidae    | <i>Merops apiaster</i>      | Arıkuşu                 | European Bee-eater     | LC   | YG      |
| Bucerotiformes  | Upupidae     | <i>Upupa epops</i>          | İbibik                  | Eurasian Hoopoe        | LC   | YG      |
| Piciformes      | Picidae      | <i>Dendrocopos syriacus</i> | Alaca Ağaçkakan         | Syrian Woodpecker      | LC   | H       |
| Passeriformes   | Laniidae     | <i>Lanius collurio</i>      | Kızıl Sırtlı Örümcekuşu | Red-backed Shrike      | LC   | YG      |
|                 | Corvidae     | <i>Pica pica</i>            | Saksağan                | Eurasian Magpie        | LC   | H       |
|                 | Paridae      | <i>Cyanistes caeruleus</i>  | Mavi Baştankara         | Eurasian Blue Tit      | LC   | H       |
|                 | Remizidae    | <i>Remiz pendulinus</i>     | Çulhakuşu               | Eurasian Penduline Tit | LC   | H       |
|                 | Panuridae    | <i>Panurus biarmicus</i>    | Bıyıklı Baştankara      | Bearded Reedling       | LC   | H       |
|                 | Alaudidae    | <i>Galerida cristata</i>    | Tepeli Toygar           | Crested Lark           | LC   | H       |
|                 | Hirundinidae | <i>Riparia riparia</i>      | Kum Kırlangıcı          | Sand Martin            | LC   | G       |
|                 |              | <i>Hirundo rustica</i>      | Kır Kırlangıcı          | Barn Swallow           | LC   | YG      |

|  |                |                                   |                           |                            |    |      |
|--|----------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----|------|
|  | Phylloscopidae | <i>Phylloscopus trochilus</i>     | Söğütbülbülü              | Willow Warbler             | LC | YG   |
|  | Sylviidae      | <i>Acrocephalus arundinaceus</i>  | Büyük Kamışçın            | Great Reed Warbler         | LC | YG   |
|  |                | <i>Acrocephalus melanopogon</i>   | Bıyıklı Kamışçın          | Moustached Warbler         | LC | H/G  |
|  |                | <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | Kındıra Kamışçını         | Sedge Warbler              | LC | H    |
|  |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>    | Saz Kamışçını             | Eurasian Reed Warbler      | LC | YG   |
|  |                | <i>Acrocephalus palustris</i>     | Çalı Kamışçını            | Marsh Warbler              | LC | YG   |
|  |                | <i>Iduna pallida</i>              | Ak Mukallit               | Eastern Olivaceous Warbler | LC | YG   |
|  |                | <i>Sylvia atricapilla</i>         | Kara Başlı Ötleğen        | Eurasian Blackcap          | LC | YG   |
|  |                | <i>Sylvia curruca</i>             | Küçük Ak Gerdanlı Ötleğen | Lesser Whitethroat         | LC | YG   |
|  |                | <i>Sylvia crassirostris</i>       | Ak Gözlü Ötleğen          | Eastern Orphean Warbler    | LC | YG   |
|  |                | <i>Sylvia communis</i>            | Ak Gerdanlı Ötleğen       | Common Whitethroat         | LC | YG   |
|  | Locustellidae  | <i>Locustella luscinioides</i>    | Bataklık Kamışçını        | Savi's Warbler             | LC | YG   |
|  | Sturnidae      | <i>Sturnus vulgaris</i>           | Sığırcık                  | Common Starling            | LC | H    |
|  | Turdidae       | <i>Muscicapa striata</i>          | Benekli Sinekkapan        | Spotted Flycatcher         | LC | YG   |
|  |                | <i>Luscinia svecica</i>           | Mavigerdan                | Bluethroat                 | LC | G    |
|  |                | <i>Luscinia luscinia</i>          | Benekli Bülbül            | Thrush Nightingale         | LC | G    |
|  |                | <i>Saxicola rubetra</i>           | Çayır Taşkuşu             | Whinchat                   | LC | YG   |
|  |                | <i>Oenanthe isabellina</i>        | Boz Kuyrukkakan           | Isabelline Wheatear        | LC | YG   |
|  | Passeridae     | <i>Passer domesticus</i>          | Serçe                     | House Sparrow              | LC | H    |
|  |                | <i>Passer hispaniolensis</i>      | Söğüt Serçesi             | Spanish Sparrow            | LC | H    |
|  |                | <i>Passer montanus</i>            | Ağaç Serçesi              | Eurasian Tree Sparrow      | LC | H    |
|  | Motacillidae   | <i>Motacilla flava</i>            | Sarı Kuyruksallayan       | Western Yellow Wagtail     | LC | YG/G |
|  |                | <i>Motacilla alba</i>             | Ak Kuyruksallayan         | White Wagtail              | LC | H/G  |
|  | Fringillidae   | <i>Chloris chloris</i>            | Florya                    | European Greenfinch        | LC | H    |
|  | Emberizidae    | <i>Emberiza schoeniclus</i>       | Bataklık Çintesi          | Common Reed Bunting        | LC | H    |

Yaşadıkları yerlerdeki ekolojik ve mevsimsel değişimler kuşların başka bölgelere gitmesine neden olabilir. Bu nedenle kuşlar farklı statülere sahiptirler. Çalışma alanında tespit edilen kuşların statülerinin açıklanması.

**-Yerli kuş (H):** Yıl boyu aynı yerde yaşayıp, üreyen, beslenen kuşlara denir.

**-Göçmen kuş:** Belirli bir kışlama alanı ile belirli bir üreme ve barınma alanı arasında düzenli, periyodik, yaygın ve mevsimsel olarak nüfus hareketi yapan türlerdir.

**a) Yaz göçmeni (YG)** yalnızca üremek için alana gelir.

**b) Kış göçmeni (K)** ürettiği alandan kışı geçirmek üzere gelen ve o alanda üremeyen kuşlara denir.

**-Geçit Kuşu (G):** Sadece göç dönemlerinde, sonbahar ve ilkbaharda gözlenen türlerdir. Bölgeyi birkaç gün dinlenmek için kullanır ya da transit geçerler.

**Tablo 4.2** 2015 yılı arazi çalışmasında yakalanan kuş türleri ve sayıları

|    | Tür                               | Mayıs<br>2015 | Haziran-Temmuz<br>2015 | Ağustos<br>2015 | Toplam |
|----|-----------------------------------|---------------|------------------------|-----------------|--------|
| 1  | <i>Lanius collurio</i>            | 8             | -                      | 1               | 9      |
| 2  | <i>Pica pica</i>                  | -             | 1                      | 1               | 2      |
| 3  | <i>Remiz pendulinus</i>           | 2             | 10                     | 2               | 14     |
| 4  | <i>Panurus biarmicus</i>          | 2             | 21                     | 4               | 27     |
| 5  | <i>Riparia riparia</i>            | 1             | -                      | 1               | 2      |
| 6  | <i>Hirundo rustica</i>            | 2             | 23                     | 5               | 30     |
| 7  | <i>Phylloscopus trochilus</i>     | 11            | -                      | 8               | 19     |
| 8  | <i>Acrocephalus arundinaceus</i>  | 1             | 23                     | 3               | 27     |
| 9  | <i>Acrocephalus melanopogon</i>   | 2             | 39                     | -               | 41     |
| 10 | <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | 14            | -                      | -               | 14     |
| 11 | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>    | 13            | 12                     | 5               | 30     |
| 12 | <i>Iduna pallida</i>              | -             | 2                      | -               | 2      |
| 13 | <i>Sylvia atricapilla</i>         | 2             | -                      | -               | 2      |
| 14 | <i>Sylvia curruca</i>             | 1             | -                      | -               | 1      |
| 15 | <i>Sylvia crassirostris</i>       | 1             | -                      | -               | 1      |
| 16 | <i>Sylvia communis</i>            | 1             | -                      | -               | 1      |
| 17 | <i>Sturnus vulgaris</i>           | -             | 21                     | -               | 21     |
| 18 | <i>Luscinia luscinia</i>          | 1             | -                      | -               | 1      |
| 19 | <i>Oenanthe isabellina</i>        | -             | 1                      | -               | 1      |
| 20 | <i>Passer domesticus</i>          | -             | 3                      | 3               | 6      |
| 21 | <i>Passer hispaniolensis</i>      | 2             | 26                     | 8               | 36     |
| 22 | <i>Passer montanus</i>            | -             | 3                      | 1               | 4      |
| 23 | <i>Motacilla flava</i>            | -             | 6                      | -               | 6      |

|    |                             |           |            |           |            |
|----|-----------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| 24 | <i>Motacilla alba</i>       | -         | 1          | -         | 1          |
| 25 | <i>Chloris chloris</i>      | 2         | -          | -         | 2          |
| 26 | <i>Emberiza schoeniclus</i> | 1         | 8          | -         | 9          |
|    | <b>Toplam</b>               | <b>67</b> | <b>200</b> | <b>42</b> | <b>309</b> |

**Tablo 4.3** 2016 yılı arazi çalışmasında yakalanan kuş türleri ve sayıları

|    | <b>Tür</b>                            | <b>Mayıs-Haziran<br/>2016</b> | <b>Temmuz<br/>2016</b> | <b>Ağustos-Eylül<br/>2016</b> | <b>Toplam</b> |
|----|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------|
| 1  | <i>Ixobrychus minutus</i>             | 9                             | 7                      | 1                             | 17            |
| 2  | <i>Tringa ochropus</i>                | 1                             | -                      | -                             | 1             |
| 3  | <i>Alcedo atthis</i>                  | -                             | -                      | 7                             | 7             |
| 4  | <i>Merops apiaster</i>                | -                             | -                      | 1                             | 1             |
| 5  | <i>Dendrocopos syriacus</i>           | -                             | 1                      | 1                             | 2             |
| 6  | <i>Upupa epops</i>                    | 1                             | -                      | -                             | 1             |
| 7  | <i>Lanius collurio</i>                | -                             | -                      | 2                             | 2             |
| 8  | <i>Cyanistes caeruleus</i>            | -                             | -                      | 1                             | 1             |
| 9  | <i>Remiz pendulinus</i>               | -                             | 2                      | -                             | 2             |
| 10 | <i>Panurus biarmicus</i>              | 5                             | 11                     | 15                            | 31            |
| 11 | <i>Galerida cristata</i>              | -                             | 1                      | -                             | 1             |
| 12 | <i>Riparia riparia</i>                | 7                             | -                      | -                             | 7             |
| 13 | <i>Hirundo rustica</i>                | 3                             | 4                      | -                             | 7             |
| 14 | <i>Phylloscopus trochilus</i>         | -                             | -                      | 3                             | 3             |
| 15 | <i>Acrocephalus<br/>arundinaceus</i>  | 11                            | 3                      | -                             | 14            |
| 16 | <i>Acrocephalus<br/>melanopogon</i>   | 3                             | 21                     | 2                             | 26            |
| 17 | <i>Acrocephalus<br/>schoenobaenus</i> | 2                             | 1                      | 2                             | 5             |
| 18 | <i>Acrocephalus<br/>scirpaceus</i>    | 15                            | 2                      | 3                             | 20            |
| 19 | <i>Acrocephalus palustris</i>         | 3                             | -                      | -                             | 3             |
| 20 | <i>Locustella luscinioides</i>        | -                             | 1                      | -                             | 1             |
| 21 | <i>Sturnus vulgaris</i>               | -                             | 2                      | -                             | 2             |
| 22 | <i>Muscicapa striata</i>              | -                             | -                      | 2                             | 2             |
| 23 | <i>Luscinia svecica</i>               | -                             | -                      | 2                             | 2             |

|    |                              |           |           |            |            |
|----|------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 24 | <i>Saxicola rubetra</i>      | -         | -         | 3          | <b>3</b>   |
| 25 | <i>Oenanthe isabellina</i>   | 3         | 1         | -          | <b>4</b>   |
| 26 | <i>Passer domesticus</i>     | 13        | 2         | 2          | <b>17</b>  |
| 27 | <i>Passer hispaniolensis</i> | -         | 2         | 50         | <b>52</b>  |
| 28 | <i>Passer montanus</i>       | 5         | -         | 8          | <b>13</b>  |
| 29 | <i>Emberiza schoeniclus</i>  | -         | 9         | -          | <b>9</b>   |
|    | <b>Toplam</b>                | <b>81</b> | <b>70</b> | <b>105</b> | <b>256</b> |

**Tablo 4.4** 2015-2016 yılları arasında yakalanan kuşların yağ skoru ortalaması, tarsus, gaga, kanat, kuyruk uzunluğu ortalamaları (cm) ve ağırlık ortalamaları (gr)

| Türler                           | N  | Yağ Ort (SD) | Tarsus uzunluğu ort (SD) | Gaga uzunluğu ort (SD) | Kanat uzunluğu ort (SD) | Kuyruk uzunluğu ort (SD) | Ağırlık ort (SD) |
|----------------------------------|----|--------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| <i>Ixobrychus minutus</i>        | 16 | -            | 48,8±2,2                 | 49,9±2,3               | 152,7±4,7               | 47,4±3,7                 | 109,9±13,5       |
| <i>Tringa ochropus</i>           | 1  | -            | 34,97                    | 37,58                  | 151                     | 42                       | 113,7            |
| <i>Alcedo atthis</i>             | 7  | 3±0          | -                        | 41,7±2,1               | 74,6±0,9                | 32,7±1,6                 | 34,12,7          |
| <i>Merops apiaster</i>           | 1  | 2            | -                        | 42,84                  | 150                     | 99                       | 63,7             |
| <i>Upupa epops</i>               | 1  | 4            | 20,4                     | 52,9                   | 120                     |                          | 62,9             |
| <i>Dendrocopos syriacus</i>      | 4  | 2            | 21,9±0,6                 | 30,2±2,2               | 129,5±0,6               | 77,5±8,7                 | 70,6±4           |
| <i>Lanius collurio</i>           | 11 | 3±0,8        | 23,6±1,3                 | 18,1±0,5               | 92,9±2,4                | 75,6±2,9                 | 27,7±2,9         |
| <i>Pica pica</i>                 | 2  | -            | 55,2±3,9                 | 41,1±0,9               | 206±8,5                 | 250                      | 200,4            |
| <i>Cyanistes caeruleus</i>       | 1  | 2            | 17,3                     | -                      | 68                      | 54                       | 10,7             |
| <i>Remiz pendulinus</i>          | 16 | 1,1±0,5      | 14,3±0,6                 | 11±0,7                 | 54,5±1,5                | 42,7±2,3                 | 7,9±0,6          |
| <i>Panurus biarmicus</i>         | 57 | 1,7±0,7      | 20,5±1                   | 11±0,7                 | 60,8±2,6                | 78,6±8,9                 | 13,9±1,2         |
| <i>Galerida cristata</i>         | 1  | 0            | 25,9                     | 19,4                   | 110                     | 68                       | 30,2             |
| <i>Riparia riparia</i>           | 9  | 2,2±0,9      | -                        | -                      | 105,8±5,3               | 49,9±4,1                 | 12,8±1,5         |
| <i>Hirundo rustica</i>           | 37 | 2,3±0,5      | 12,4±1,6                 | 11,9±1                 | 123,3±4,3               | 78,5±18,1                | 18±1,4           |
| <i>Phylloscopus trochilus</i>    | 24 | 2,5±0,9      | 19±1                     | 11,9±0,6               | 66,5±2,9                | 48,4±3,1                 | 8,4±0,8          |
| <i>Acrocephalus arundinaceus</i> | 41 | 1,8±0,7      | 29,1±0,9                 | 22,9±1,3               | 94,4±2,7                | 71,8±3,9                 | 29,2±2,6         |
| <i>Acrocephalus melanopogon</i>  | 68 | 1,58±0,7     | 20,9±1,2                 | 14,5±1,14              | 58,5±2,1                | 44,9±3,6                 | 10,7±0,9         |

|                                   |    |         |          |          |           |          |          |
|-----------------------------------|----|---------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | 19 | 3,6±1   | 21,3±0,8 | 15,1±1,2 | 67,7±1,7  | 47,9±2,1 | 12,6±0,9 |
| <i>Acrocephalus scirpaceus</i>    | 50 | 1,8±1,1 | 22±1     | 16,2±1,7 | 64,5±1,9  | 49,4±2,9 | 10,6±0,8 |
| <i>Acrocephalus palustris</i>     | 3  | 2,7±1,2 | 22,6±1,2 | 14,6±0,1 | 68,7±1,2  | 58±2,8   | 12±0,4   |
| <i>Iduna pallida</i>              | 2  | 1,5±0,7 | 21,7±0,4 | 16,5±2,4 | 66±1,4    | 50±2,8   | 9,9±0,2  |
| <i>Locustella luscinioides</i>    | 1  | 3       | 22,1     | 15,6     | 69        | 50       | 15,7     |
| <i>Sylvia atricapilla</i>         | 2  | 2       | 21,2±0,4 | 14,4±0,4 | 79±1,4    | 62±4,2   | 16,5±2,5 |
| <i>Sylvia curruca</i>             | 1  | 2       | 19,1     | 12,9     | 67        | 55       | 10,5     |
| <i>Sylvia crassirostris</i>       | 1  | 4       | 23,8     | 17,8     | 80        | 67       | 23       |
| <i>Sylvia communis</i>            | 1  | 2       | 20,6     | 13,4     | -         | 72       | 13,2     |
| <i>Sturnus vulgaris</i>           | 23 | 2       | 30,4±1,1 | 28,4±1,5 | 128,3±3,5 | 59,3±2,6 | 74,5±3,7 |
| <i>Muscicapa striata</i>          | 2  | 3±1,4   | 14,9±0,1 | 14,6±0,2 | 89,5±0,7  | 59±2,8   | 16,3±1,3 |
| <i>Luscinia svecica</i>           | 2  | 2       | 26,8±0,3 | 13,9±1   | 73        | 53±4,2   | 15,7±0,6 |
| <i>Luscinia luscinia</i>          | 1  | 2       | 28,9     | 16,9     | 92        | 68       | 24,1     |
| <i>Saxicola rubetra</i>           | 3  | 2,7±2,3 | 22,5±0,5 | 14,6±0,5 | 76,3±2,1  | 45,3±0,6 | 16,5±2,4 |
| <i>Oenanthe isabellina</i>        | 5  | -       | 29,6±1,7 | 17,7±1,7 | 94,3±3,2  | 56±2     | 25,3±3,1 |
| <i>Passer domesticus</i>          | 22 | 2,4±0,5 | 20,2±0,7 | 16,2±0,8 | 79,6±2,4  | 56,8±2,7 | 28,8±2   |
| <i>Passer hispaniolensis</i>      | 88 | 2,5±0,8 | 20,1±0,9 | 15,9±1,4 | 78,4±2,6  | 54,2±4,1 | 28,1±2,3 |
| <i>Passer montanus</i>            | 18 | 1,9±0,9 | 17,4±0,9 | 12,8±0,7 | 69,7±2,7  | 51,1±1,9 | 19,8±2,5 |
| <i>Motacilla flava</i>            | 6  | 0,5±1,2 | 24,2±0,8 | 17,2±0,9 | 83,2±3,4  | 71,2±3,5 | 17,8±2,1 |
| <i>Motacilla alba</i>             | 1  | 2       | 22,3     | 16,5     | 87        | 81       | 19,3     |
| <i>Chloris chloris</i>            | 2  | 0,5±0,7 | 17,7±0,2 | 17,8±2,8 | 88±2,8    | 53,5±0,7 | 27,5±1,9 |
| <i>Emberiza schoeniclus</i>       | 18 | 1,8±0,7 | 21,6±0,9 | 14,9±0,9 | 84,1±3,2  | 71,3±3,9 | 23,4±2,7 |

#### 4.2 Sultan Sazlığı Yöresinde İnsekt (Diptera) Türleri

Saha çalışmaları süresince Sultan Sazlığı yöresinde çok sayıda sivrisinek ve *Culicoides* örnekleme yapılrken simuliid ve Hippoboscid örneklerine tesadüf edilmemiştir. Sivrisinek ve *Culicoides* örneklerinin morfolojik ve moleküler analiz sonuçları ile filogenetik yapılanmaları üzerine elde edilen veriler aşağıdaki bölümlerde sunulmuştur.

#### 4.2.1 *Culicoides* Örneklerinin Morfolojik ve Moleküler Analiz Sonuçları

2015 ve 2016 yılları saha çalışmalarında toplam 6526 *Culicoides* örneği (862 erkek, 5664 dişi) toplanmış olup türlerin ilgili yıllara göre dağılımı Tablo 4.5’de verilmiştir. Araştırma yöresinde her iki yıl için de en yaygın türler *C. nubeculosus* kompleks türleri olarak belirlenirken en düşük yayılımı gösteren türler ise *C. duddingstoni* ve *C. gejjelensis* bulunmuştur. *C. nubeculosus* kompleksde yer alan türlerde kanat morfolojisi büyük ölçüde simetrik bir yapı sergilemekte olup kanat morfolojisine göre tür identifikasyonları zorluk arz etmektedir (Mathieu vd., 2012). Bu amaçla ilgili komplekste belirlenen dişi örneklerin 100 tanesinin abdomeni diseke edilmiş ve şeffaflandırıldıktan sonra spermateka yapısına göre hepsinin *C. riethi* türüne ait oldukları görülmüştür (Tablo 4.5). Genotipleme için ayrılan bireysel örneklerden elde edilen sekansların analizi de bu morfolojik sonuca paralel olarak *C. riethi* türünü konfirme etmiştir. Ancak Haemosporidia incelenmesi için abdomen ve baş/toraks havuzları oluşturulduğundan bu örneklerin şeffaflandırılması mümkün olmamış ve kanat morfolojisine göre *C. nubeculosus* kompleks olarak tarif edilmişlerdir.

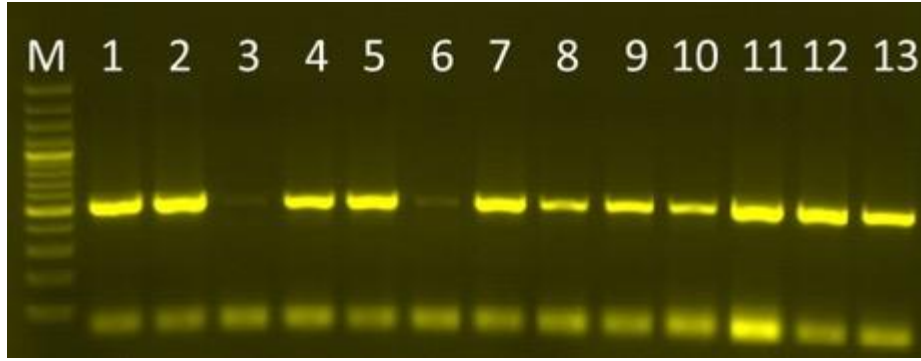
**Tablo 4.5** 2015-2016 yılları arasında araştırma sahasında identifiye edilen *Culicoides* türlerinin dağılımı

| Tür                        | 2015         |       |      | 2016         |       |      | Toplam       |       |      |
|----------------------------|--------------|-------|------|--------------|-------|------|--------------|-------|------|
|                            | Örnek sayısı | Erkek | Dişi | Örnek sayısı | Erkek | Dişi | Örnek sayısı | Erkek | Dişi |
| <i>C.nubeculosus</i> komp. | 528          | 61    | 467  | 3630         | 572   | 3058 | 4158         | 633   | 3525 |
| <i>C.riethi</i>            | 30           | 0     | 30   | 70           | 0     | 70   | 100          | 0     | 100  |
| <i>C. circumscriptus</i>   | 350          | 33    | 317  | 1156         | 98    | 1058 | 1506         | 131   | 1375 |
| <i>C. submaritimus</i>     | 319          | 27    | 292  | 245          | 41    | 204  | 564          | 68    | 496  |
| <i>C. gejjelensis</i>      | 6            | 1     | 5    | 6            | 1     | 5    | 12           | 2     | 10   |
| <i>C. duddingstoni</i>     | 11           | 2     | 9    | 14           | 3     | 11   | 25           | 5     | 20   |
| <i>C. punctatus</i>        | 24           | 3     | 21   | 31           | 6     | 25   | 55           | 9     | 46   |
| <i>C. longipennis</i>      | 20           | 4     | 16   | 27           | 1     | 26   | 47           | 5     | 42   |
| <i>C. festivipennis</i>    | 10           | 3     | 7    | 18           | 3     | 15   | 28           | 6     | 22   |



|                     |      |     |      |      |     |      |      |     |      |
|---------------------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|
| <i>C. newsteadi</i> | 12   | 2   | 10   | 19   | 2   | 17   | 31   | 4   | 27   |
| <b>TOPLAM</b>       | 1310 | 136 | 1174 | 5216 | 727 | 4489 | 6526 | 863 | 5663 |

Morfolojik identifikasyonlarla belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatlarının ilgili primerlerle mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte (553 bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.1). Elde edilen örneklere ait ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş ve sonrasında sekans analizleri için kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu yapılmıştır.



**Şekil 4.1** *Culicoides* türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-13: *Culicoides* izolatları

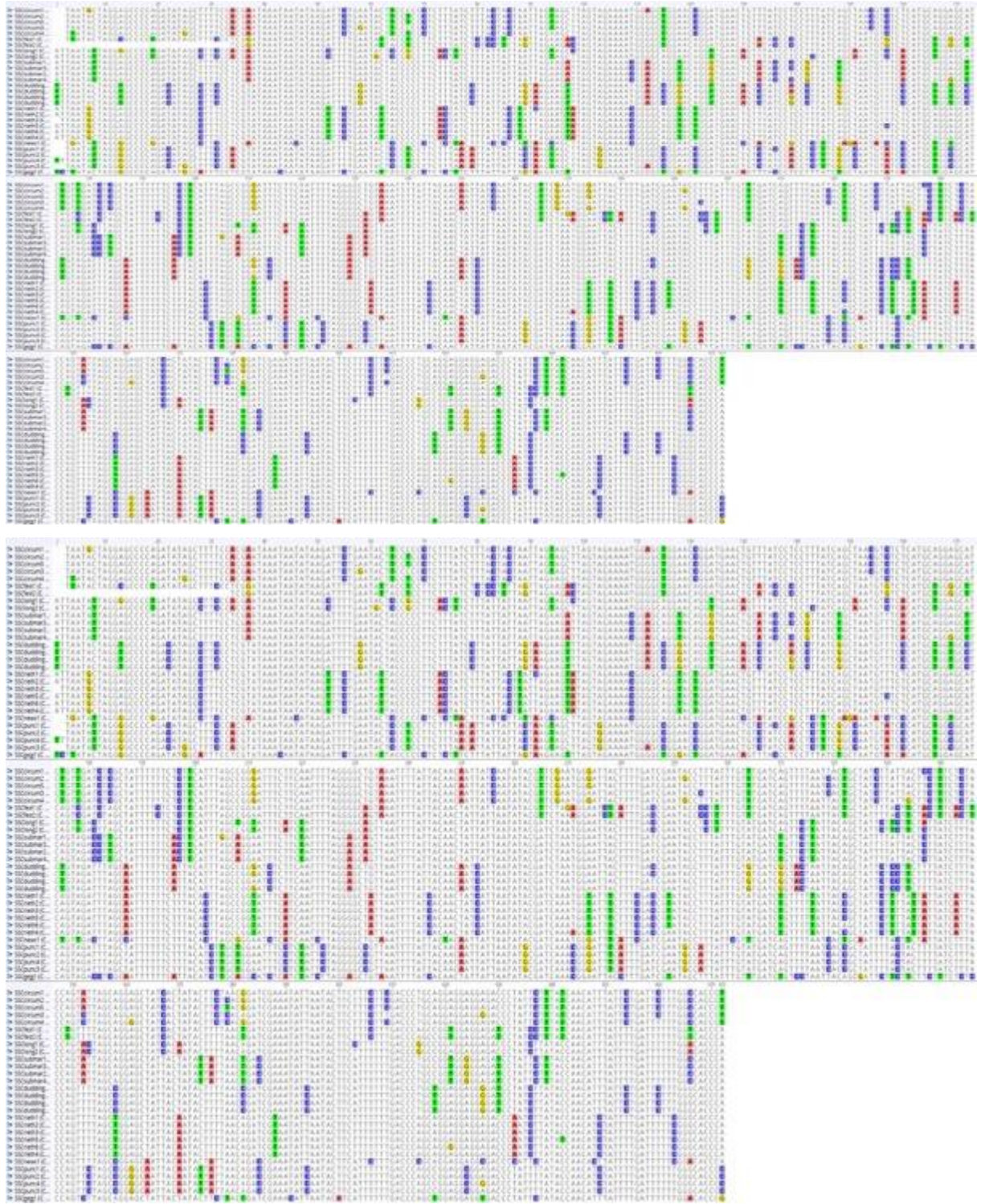
Mt-COI gen bölgesine göre mt-COI barkodlaması sağlanan ve moleküler karakterizasyonu yapılan izolatlar, morfolojik identifikasyona göre belirlenen türler, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.6** Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan *Culicoides* türlerinde belirlenen haplotipler

| Culicoides türü          | Sekanslanan izolat sayısı | Belirlenen Haplotip |        |                  |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|--------|------------------|
|                          |                           | Adı                 | Sayısı | GenBank Aksesyon |
| <i>C. circumscriptus</i> | 25                        | SSCcircum1          | 7      | MF105752         |
|                          |                           | SSCcircum2          | 6      | MF105753         |
|                          |                           | SSCcircum3          | 6      | MF105754         |
|                          |                           | SSCcircum4          | 3      | MF105755         |
|                          |                           | SSCcircum5          | 3      | MF105756         |

|                         |    |               |    |                       |
|-------------------------|----|---------------|----|-----------------------|
| <i>C. duddingstoni</i>  | 9  | SSCdudding1,3 | 6  | MF105757,<br>MF105759 |
|                         |    | SSCdudding2   | 2  | MF105758              |
|                         |    | SSCdudding4   | 1  | MF105760              |
| <i>C. festivipennis</i> | 6  | SSCfest1      | 4  | MF105761              |
|                         |    | SSCfest2      | 2  | MF105762              |
| <i>C. gejjelensis</i>   | 10 | SSCgejj1      | 10 | MF105763              |
| <i>C. longipennis</i>   | 11 | SSClong1      | 7  | MF105764              |
|                         |    | SSClong2      | 4  | MF105765              |
| <i>C. newsteadi</i>     | 7  | SSCnews1      | 7  | MF105766              |
| <i>C. punctatus</i>     | 12 | SSCpunc1      | 6  | MF105767              |
|                         |    | SSCpunc2      | 3  | MF105768              |
|                         |    | SSCpunc3      | 2  | MF105769              |
|                         |    | SSCpunc4      | 1  | MF105770              |
| <i>C. riethi</i>        | 25 | SSCrieth1     | 9  | MF105771              |
|                         |    | SSCrieth2,3   | 9  | MF105772,<br>MF105773 |
|                         |    | SSCrieth4     | 4  | MF105780              |
|                         |    | SSCrieth5     | 2  | MF105774              |
|                         |    | SSCrieth6     | 1  | MF105775              |
| <i>C. submaritimus</i>  | 20 | SSCsubmar1    | 7  | MF105776              |
|                         |    | SSCsubmar2    | 5  | MF105777              |
|                         |    | SSCsubmar3    | 4  | MF105778              |
|                         |    | SSCsubmar4    | 4  | MF105779              |

Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen türlere ait mt-COI sekansları arasında 302 (%64,0) identik bölge belirlenirken 27 farklı haplotipi ortaya koyan 158 polimorfik bölge saptanmıştır. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Culicoides* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü üzere izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan izolatlar arasında ortalama ikili hizalama identiklik oranı %85,1 belirlenmiş olup ikili hizalama analiz sonucu belirlenen farklılıklar ayrıca Tablo 4.7’de verilmiştir.

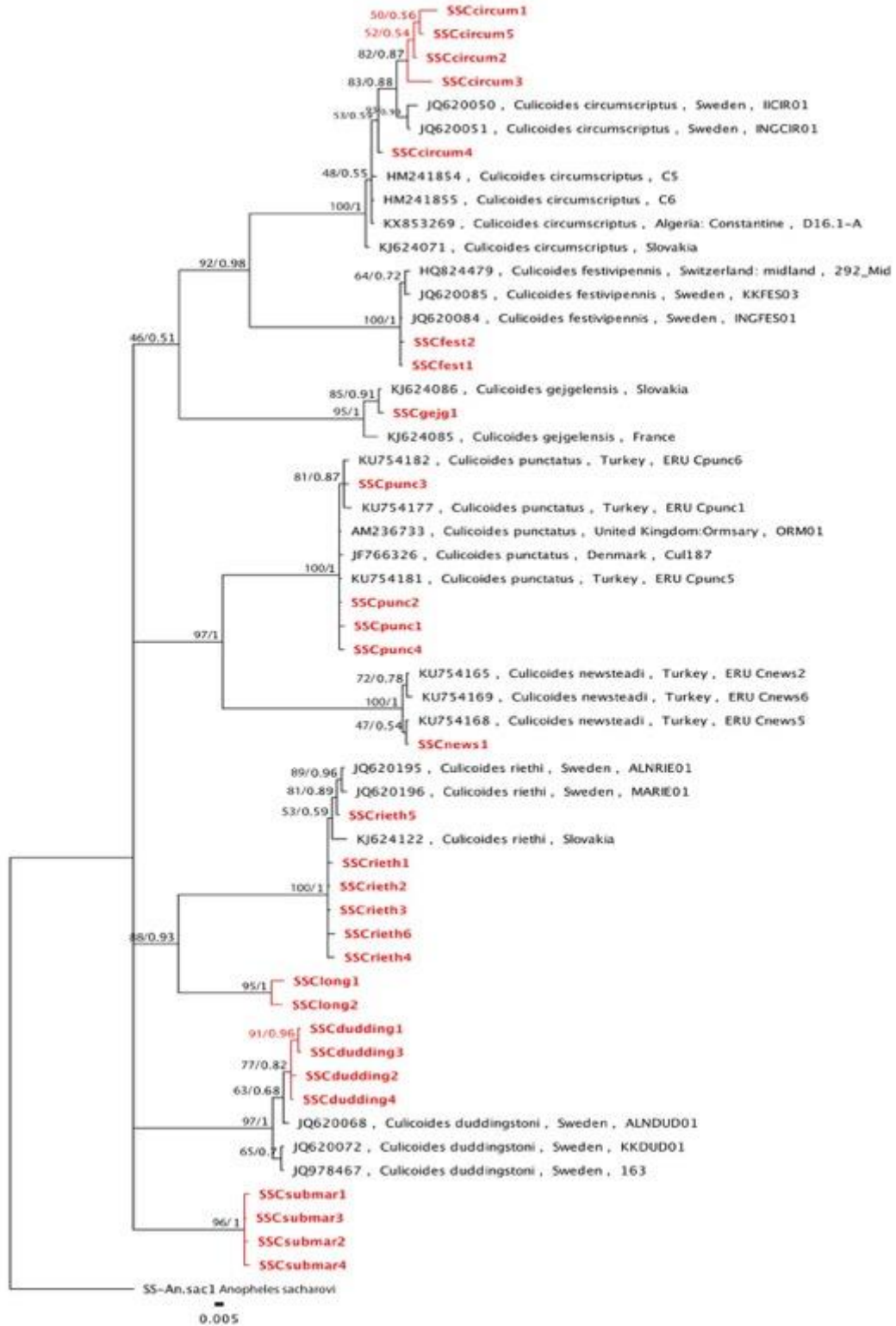


**Şekil 4.2** Çalışmada belirlenen *Culicoides* türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları





Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan türlere ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklar ve bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen türlere ait haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite  $19,3 \pm 1,7$  saptanmıştır. Çalışmada morfolojik analizlerle *C. circumscriptus* olarak identifiye edilen ve moleküler karakterizasyonla SSCcircum1-5 olarak isimlendirilen haplotipler arasında ortalama genetik farklılık  $2,1 \pm 0,5$  belirlenmiş ve filogenetik ağaç (Şekil 4.3) üzerinde görüleceği üzere SSCcircum1,2,3,5 haplotipleri bir arada küme oluşturup İsveç izolatlarına daha yakın ( $2,1 \pm 0,5$  genetik farklılık) saptanmışlardır. SSCcircum4 haplotipi ise diğer haplotiplerden genetik olarak daha uzak belirlenmiş ve en yüksek identikliği %99,6 ile Cezayir izolatıyla göstermiştir. Çalışmada karakterize edilen *C. festivipennis* SSCfest1 ve SSCfest2 haplotipleri arasında  $0,2 \pm 0,2$  genetik farklılık belirlenmiş ve bu haplotipler en yüksek identikliği %99,7 ile İsveç izolatlarıyla göstermiştir. SSCgejg1 olarak karakterize edilen *C. geigelensis* haplotipinin Slovakya izolatıyla çok yakın olduğu (%99,8), Fransa izolatıyla ise  $2,0 \pm 0,6$  genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *C. punctatus* SSCpunc1-4 haplotipleri arasında genetik farklılık  $0,4 \pm 0,2$  belirlenmiş ve SSCpunc3 haplotipi Türkiye Batı Karadeniz izolatlarından ERU Cpun1 ve ERU Cpun6 ile en yüksek identikliği gösterip (%99,6) küme oluşturmuştur (Şekil 4.3). SSCpunc1,2,4 haplotipleri ise Türkiye Batı Karadeniz izolatlarından ERU Cpun5 ile Danimarka ve İngiltere izolatlarına yüksek derecede identik belirlenmiştir (%99,9). *C. newsteadi* SSCnews1 haplotipi en yüksek identikliği %99,8 ile Türkiye Batı Karadeniz izolatlarıyla göstermiştir (Şekil 4.3). Çalışmada karakterize edilen *C. riethi* SSCrieth1-6 haplotipleri arasında genetik farklılık  $0,5 \pm 0,2$  belirlenmiş ve SSCrieth5 haplotipi İsveç izolatlarına daha yakın belirlenmiş (%99,7) ve birlikte alt küme oluşturmuştur (Şekil 4.3). SSCrieth1,2,3,4,6 haplotipleri ise İsveç ve Slovakya izolatlarına sırasıyla  $1,0 \pm 0,4$  ve  $1,3 \pm 0,5$  genetik farklılık göstermiştir. Bu çalışma ile Dünyada ilk kez mt-COI barkodlaması sağlanan *C. longipennis* için iki haplotip belirlenmiştir. SSClong1 ve SSClon2 haplotipleri arasında  $1,3 \pm 0,5$  genetik farklılık belirlenmiştir. Ayrıca *C. longipennis*'in mt-COI gen bölgesi filogenisine göre incelenen türler içerisinde *C. riethi*'ye daha yakın olduğu ve birlikte üst küme oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.3). Çalışmada karakterize edilen *C. dunningstoni* SSCdunning1-4 haplotipleri arasında genetik farklılık  $0,4 \pm 0,2$  saptanmış olup ilgili haplotipler bir arada küme oluşturmuş ve en yüksek identikliği %99,1 ile İsveç ALNDUD01 izolatıyla göstermiştir (Şekil 4.3). Yine bu çalışma ile Dünyada ilk kez mt-COI barkodlaması ile karakterize edilen *C. submaritimus* için 4 haplotip belirlenmiştir. SSCsubmar1-4 haplotipleri arasında ortalama genetik farklılık  $0,3 \pm 0,2$  belirlenmiş ve *C. submaritimus*'un incelemesi yapılan türlerden filogenetik olarak daha uzak küme oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3** *Culicoides* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri cluster kırmızı renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar sırasıyla ML bootstrap desteği ve BI posterior olasılığını göstermektedir. Dış grup olarak çalışmada karakterize edilen *A. sacharovi* SS-An.sac1 haplotipi kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

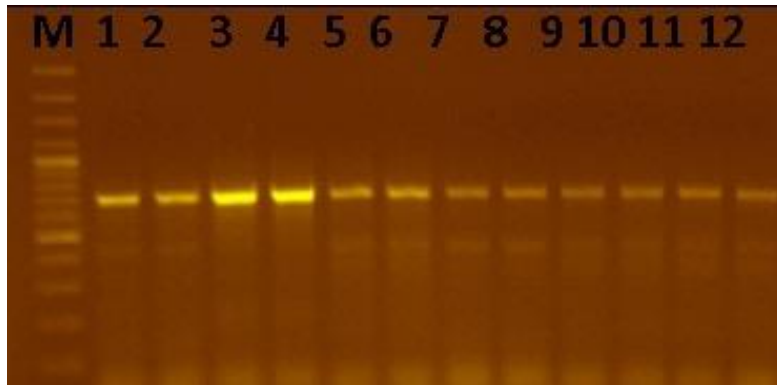
#### 4.2.2 Sivrisinek Örneklerinin Morfolojik ve Moleküler Analiz Sonuçları

2015 ve 2016 yılları saha çalışmaları toplam 3670 sivrisinek örneği (420 erkek, 3250 dişi) toplanmış olup türlerin ilgili yıllara göre dağılımı Tablo 4.8’de verilmiştir. Araştırma yöresinde her iki yıl için de en yaygın tür *An. sacharovi* belirlenmiş bunu sırasıyla *Cx. pipiens* kompleks, *An. maculipennis*, *Ae. vexans* ve *An. claviger* izlemiştir.

**Tablo 4.8** 2015-2016 yılları arasında araştırma sahasında identifiye edilen sivrisinek türlerinin dağılımı

| Tür                         | 2015         |       |      | 2016         |       |      | Toplam       |       |      |
|-----------------------------|--------------|-------|------|--------------|-------|------|--------------|-------|------|
|                             | Örnek sayısı | Erkek | Dişi | Örnek sayısı | Erkek | Dişi | Örnek sayısı | Erkek | Dişi |
| <i>An. sacharovi</i>        | 1003         | 140   | 863  | 1151         | 138   | 1013 | 2154         | 278   | 1876 |
| <i>Cx. pipiens</i> kompleks | 615          | 42    | 573  | 623          | 57    | 566  | 1238         | 99    | 1139 |
| <i>An. maculipennis</i>     | 75           | 11    | 64   | 61           | 10    | 51   | 136          | 21    | 115  |
| <i>Ae. vexans</i>           | 62           | 6     | 56   | 52           | 8     | 44   | 114          | 14    | 100  |
| <i>An. claviger</i>         | 15           | 6     | 9    | 13           | 2     | 11   | 28           | 8     | 20   |
| <b>TOPLAM</b>               | 1770         | 205   | 1565 | 1900         | 215   | 1685 | 3670         | 420   | 3250 |

Morfolojik identifikasyonlarla belirlenen örneklerle ait genomik DNA izolatlarının ilgili primerlerle mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte (709bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.4). Elde edilen örneklerle ait ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA’sına insert olduğu belirlenmiş ve sonrasında sekans analizleri için kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu amacıyla uygulanan restriksiyon enzimleri ile analizler sonucu agaroz jel üzerinde hedef insert genlerin varlığı teyit edilmiştir.



**Şekil 4.4** Sivrisinek türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü M: Marker; 1-12: sivrisinek izolatları

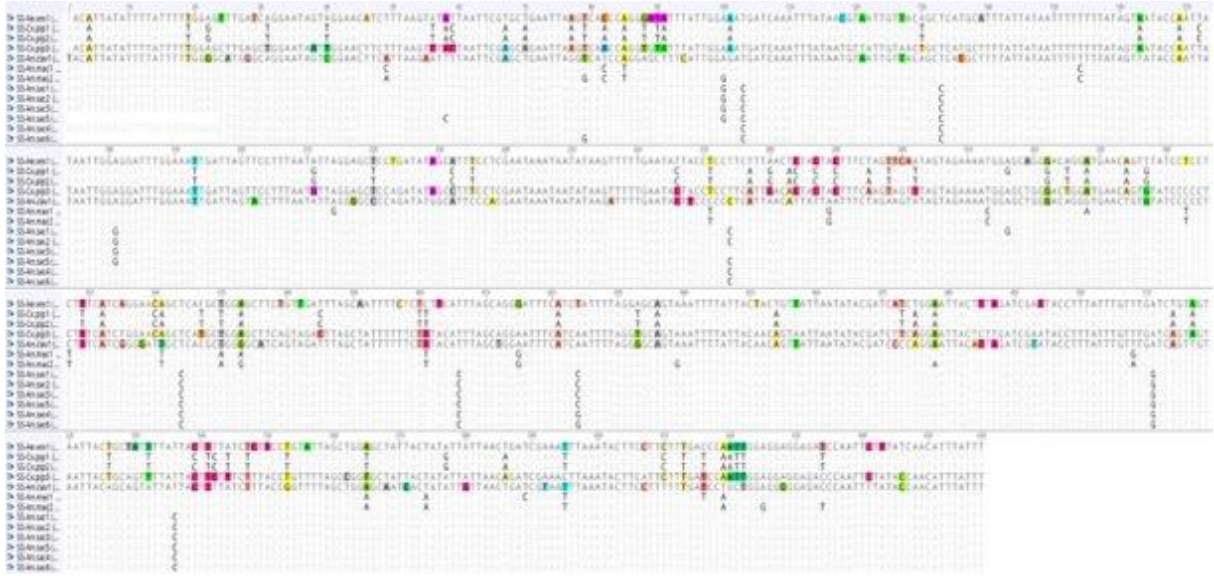
Mt-COI gen bölgesine göre mt-COI barkodlaması sağlanan ve moleküler karakterizasyonu yapılan sivrisinek türlerine ait izolatlar, morfolojik identifikasyona göre belirlenen türler, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.9'da verilmiştir.

**Tablo 4.9** Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan sivrisinek türlerinde belirlenen haplotipler

| Sivrisinek türü             | Sekanslanan izolat sayısı | Belirlenen Haplotip |        |                  |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------|--------|------------------|
|                             |                           | Adı                 | Sayısı | GenBank Aksesyon |
| <i>Cx. pipiens</i> kompleks | 25                        | SS-Cx.pip1          | 10     | MF095661         |
|                             |                           | SS-Cx.pip2          | 7      | MF095662         |
|                             |                           | SS-Cx.pip3          | 8      | MF095663         |
| <i>Ae. vexans</i>           | 12                        | SS-Ae.vex1          | 12     | MF095664         |
| <i>An. sacharovi</i>        | 30                        | SS-An.sac1          | 9      | MF095668         |
|                             |                           | SS-An.sac2          | 8      | MF095669         |
|                             |                           | SS-An.sac3          | 6      | MF095670         |
|                             |                           | SS-An.sac4          | 4      | MF095671         |
|                             |                           | SS-An.sac5          | 2      | MF095672         |
|                             |                           | SS-An.sac6          | 1      | MF095673         |
| <i>An. maculipennis</i>     | 12                        | SS-An.mac1          | 8      | MF095666         |
|                             |                           | SS-An.mac2          | 4      | MF095667         |
| <i>An. claviger</i>         | 8                         | SS-An.clav1         | 8      | MF095665         |

Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen sivrisinek türlerine ait mt-COI sekansları arasında 494 (%75,1) identik bölge belirlenirken 13 farklı haplotipi ortaya koyan 160 polimorfik bölge saptanmıştır. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan Culicidae izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Şekil 4.5'de görüldüğü üzere izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan izolatlar arasında identiklik oranı ortalama %90,9 belirlenmiş olup ikili hizalama analiz sonucu belirlenen farklılıklar ayrıca Tablo 4.10'da verilmiştir.





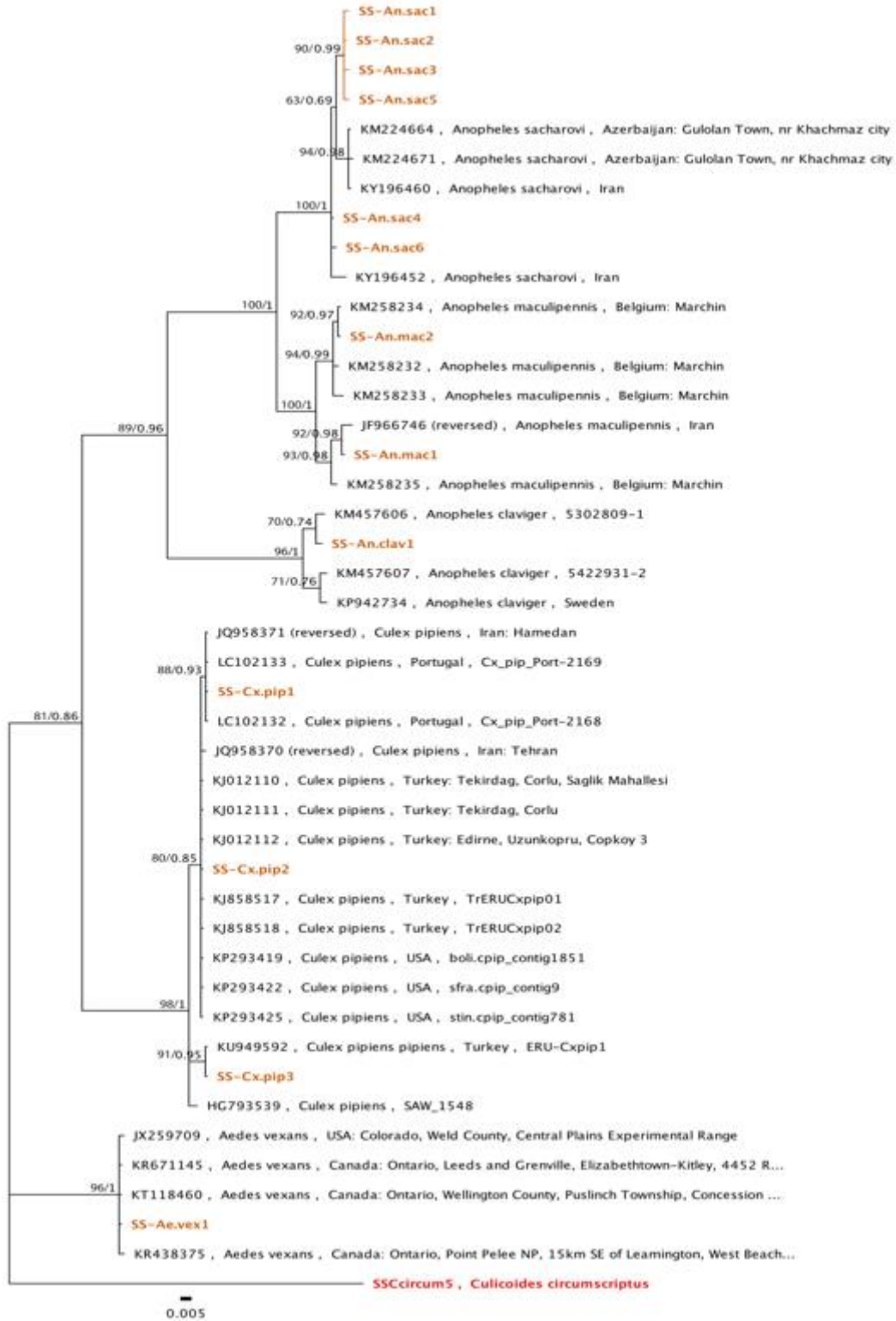
**Şekil 4.5** Çalışmada saptanan sivrisinek türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

**Tablo 4.10** Sivrisinek türlerinde belirlenen haplotiplerin mt-COI sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre identiklik oranları

|             | SS-Ae.vex1 | SS-Cx.pip1 | SS-Cx.pip2 | SS-Cx.pip3 | SS-An.clav1 | SS-An.mac1 | SS-An.mac2 | SS-An.sac1 | SS-An.sac2 | SS-An.sac3 | SS-An.sac4 | SS-An.sac5 | SS-An.sac6 |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| SS-Ae.vex1  |            | 89.1%      | 89.2%      | 89.2%      | 85.1%       | 86.2%      | 86.2%      | 84.8%      | 85.0%      | 85.1%      | 84.7%      | 85.3%      | 85.0%      |
| SS-Cx.pip1  | 89.1%      |            | 99.8%      | 98.3%      | 87.2%       | 86.8%      | 86.5%      | 85.9%      | 85.7%      | 85.9%      | 85.7%      | 86.0%      | 86.0%      |
| SS-Cx.pip2  | 89.2%      | 99.8%      |            | 98.5%      | 87.4%       | 86.9%      | 86.6%      | 85.7%      | 85.9%      | 86.0%      | 85.8%      | 86.2%      | 86.1%      |
| SS-Cx.pip3  | 89.2%      | 98.3%      | 98.5%      |            | 87.1%       | 86.6%      | 86.0%      | 85.9%      | 86.0%      | 86.2%      | 85.8%      | 86.3%      | 86.1%      |
| SS-An.clav1 | 85.1%      | 87.2%      | 87.4%      | 87.1%      |             | 87.8%      | 88.0%      | 87.7%      | 87.8%      | 87.7%      | 87.9%      | 88.1%      | 88.3%      |
| SS-An.mac1  | 86.2%      | 86.8%      | 86.9%      | 86.6%      | 87.8%       |            | 98.0%      | 94.7%      | 94.8%      | 95.0%      | 94.5%      | 95.1%      | 94.8%      |
| SS-An.mac2  | 86.2%      | 86.5%      | 86.6%      | 86.0%      | 88.0%       | 98.0%      |            | 94.7%      | 94.8%      | 95.0%      | 94.5%      | 94.8%      | 94.8%      |
| SS-An.sac1  | 84.8%      | 85.9%      | 85.7%      | 85.9%      | 87.7%       | 94.7%      | 94.7%      |            | 99.8%      | 99.7%      | 99.7%      | 99.4%      | 99.2%      |
| SS-An.sac2  | 85.0%      | 85.7%      | 85.9%      | 86.0%      | 87.8%       | 94.8%      | 94.8%      | 99.8%      |            | 99.8%      | 99.8%      | 99.5%      | 99.4%      |
| SS-An.sac3  | 85.1%      | 85.9%      | 86.0%      | 86.2%      | 87.7%       | 95.0%      | 95.0%      | 99.7%      | 99.8%      |            | 99.7%      | 99.4%      | 99.2%      |
| SS-An.sac4  | 84.7%      | 85.7%      | 85.8%      | 85.8%      | 87.9%       | 94.5%      | 94.5%      | 99.7%      | 99.8%      | 99.7%      |            | 99.4%      | 99.2%      |
| SS-An.sac5  | 85.3%      | 86.0%      | 86.2%      | 86.3%      | 88.1%       | 95.1%      | 94.8%      | 99.4%      | 99.5%      | 99.4%      | 99.4%      |            | 99.8%      |
| SS-An.sac6  | 85.0%      | 86.0%      | 86.1%      | 86.1%      | 88.3%       | 94.8%      | 94.8%      | 99.2%      | 99.4%      | 99.2%      | 99.2%      | 99.8%      |            |

Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan sivrisinek türlerine ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.6'de gösterilmiştir. Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklar ve bootstrap oranları ile desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen türlere ait haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite  $11,1 \pm 1,0$  saptanmıştır. Çalışmada morfolojik analizlerle *An. sacharovi* olarak tanımlanan ve moleküler karakterizasyonla SS-An.sac1-6 olarak isimlendirilen haplotipler arasında ortalama genetik farklılık  $0,4 \pm 0,2$  belirlenmiş ve filogenetik ağaç (Şekil 4.6) üzerinde görüleceği üzere bu haplotiplerden SS-An.sac1,2,3,5 Azerbaycan (KM224664, KM224671) ve İran (KY196460) izolatlarına filogenetik olarak yakın (%99,0) belirlenmişlerdir. SS-An.sac4 ve SS-An.sac6 haplotipleri ise İran izolatına (KY196452) filogenetik olarak daha yakın (%99,2) bulunmuşlardır (Şekil 4.6). *An. maculipennis* türü içinde

SS-An.mac1 ve SS-An.mac2 olmak üzere iki haplotip belirlenmiş ve aralarındaki genetik farklılık  $\%2,1 \pm 0,6$  bulunmuştur. İki ayrı filogenetik cluster içerisinde yer alan bu haplotiplerden SS-An.mac1 haplotipi en yüksek identikliğı  $\%99,5$  ile İran izolatına (JF966746) gösterirken SS-An.mac2 haplotipi ise Belçika izolatı (KM258234) ile  $\%100$  identik bulunmuştur. Çalışmada *An. claviger* için belirlenen SS-AN.clav1 haplotipi en yüksek identikliğı  $\%99,4$  ile Hollanda izolatıyla (KM457606) göstermiş ve birlikte ayrı bir küme oluşturmuştur (Şekil 4.6). Çalışmada karakterize edilen *Cx. pipiens* SS-Cx.pip1-3 haplotipleri arasında ortalama genetik farklılık  $\%1,1 \pm 0,4$  belirlenmiş olup her üç haplotipin ayrı clusterlarda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.65). SS-Cx.pip1 haplotipi İran (JQ958371) ve Portekiz izolatlarıyla (LC102132, LC102133)  $\%100$  identiklik göstererek filogenetik gruplanma göstermiştir. SS-Cx.pip2 haplotipi filogenetik ağaç zerinde görüleceğı üzere İran izolatıyla (JQ958370)  $\%99,8$  benzerlik göstermiş, Türkiye ve Amerika Birleşik Devletleri izolatları ile ise  $\%100$  identik bulunmuştur. Diğer haplotiplerden daha uzak belirlenen SS-Cx.pip3 haplotipi ise yine Türkiye'den rapor edilmiş bir izolatla (KU949592)  $\%100$  identik bulunmuş ve ayrı bir cluster oluşturmuştur. *Ae. vexans* için karakterize edilen SS-Ae.vex1 haplotipinin Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada izolatları ile birlikte kümелendiğı ve Kanada izolatları (KR671145, KT118460) ile  $\%100$  identik olduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.6** Sivrisinek izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) ve Maximum Likelihood (ML) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kahverengi ve kalın karakterde yerleştikleri cluster kahverenkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar sırasıyla ML bootstrap desteği ve BI posterior olasılığını göstermektedir. Dış grup olarak çalışmada karakterize edilen *C. circumscriptus* SSCcircum5 haplotipi kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

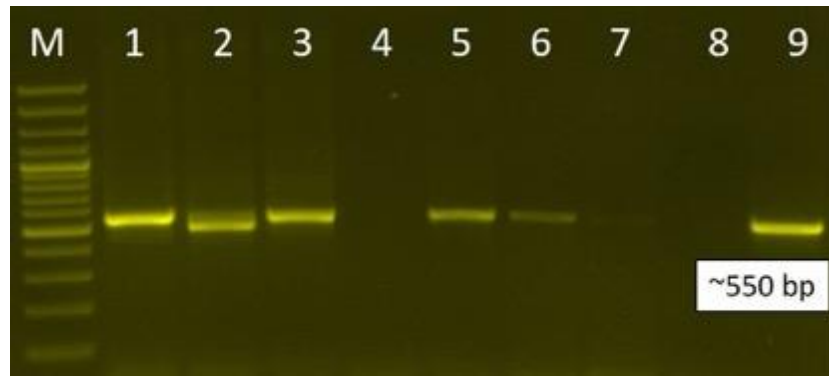
#### 4.3 Sivrisinek ve *Culicoides* Türlerine Ait Örneklerin Kan Beslenme Analiz Sonuçları

Ergin dişi sivrisinek ve *Culicoides* bireysel örneklerden stero-mikroskop altında kan emmiş olanlar ayrılarak kan beslenme analizleri için genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA izolatlarının kanatlı mithochondrial cyt b gen bölgesinin ~550 bp parsiyel bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile moleküler analiz sonuçları Tablo 4.11’de verilmiştir. Mithochondrial cyt b gen bölgesi için kanatlı kanı pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünümüleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.

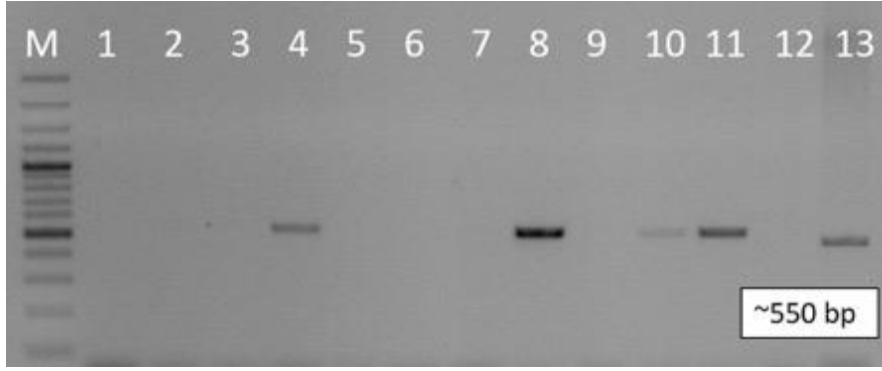
**Tablo 4.11** Kan emmiş dişi sivrisinek ve *Culicoides* bireysel örneklerden elde edilen genomik DNA izolatlarının kanatlı kanı yönünden moleküler analiz sonuçları

| Tür                         | İncelenen Örnek Sayısı | Pozitif Örnek Sayısı | %     |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|-------|
| <i>Culicoides</i>           |                        |                      |       |
| <i>C. riethi</i> *          | 45                     | 33                   | 73,33 |
| <i>C. circumscriptus</i>    | 100                    | 73                   | 73,00 |
| <i>C. submaritimus</i>      | 48                     | 42                   | 87,50 |
| <i>C. gejelensis</i>        | 8                      | 6                    | 75,00 |
| <i>C. dunningstoni</i>      | 9                      | 4                    | 44,44 |
| <i>C. punctatus</i>         | 12                     | 0                    | 0,00  |
| <i>C. longipennis</i>       | 11                     | 8                    | 72,73 |
| <i>C. festivipennis</i>     | 6                      | 2                    | 33,33 |
| <i>C. newsteadi</i>         | 7                      | 5                    | 71,43 |
| Sivrisinek                  |                        |                      |       |
| <i>An. sacharovi</i>        | 140                    | 7                    | 5,00  |
| <i>Cx. pipiens</i> kompleks | 110                    | 83                   | 60,00 |
| <i>An. maculipennis</i>     | 20                     | 1                    | 5,00  |
| <i>Ae. vexans</i>           | 18                     | 5                    | 27,78 |
| <i>An. claviger</i>         | 13                     | 1                    | 7,69  |

\**C. nubeculosus* komp. içerisinde yer alan *C. riethi* örneklerinin identifikasyonları bireysel genotipleme analizleri ile gerçekleştirilmiştir.



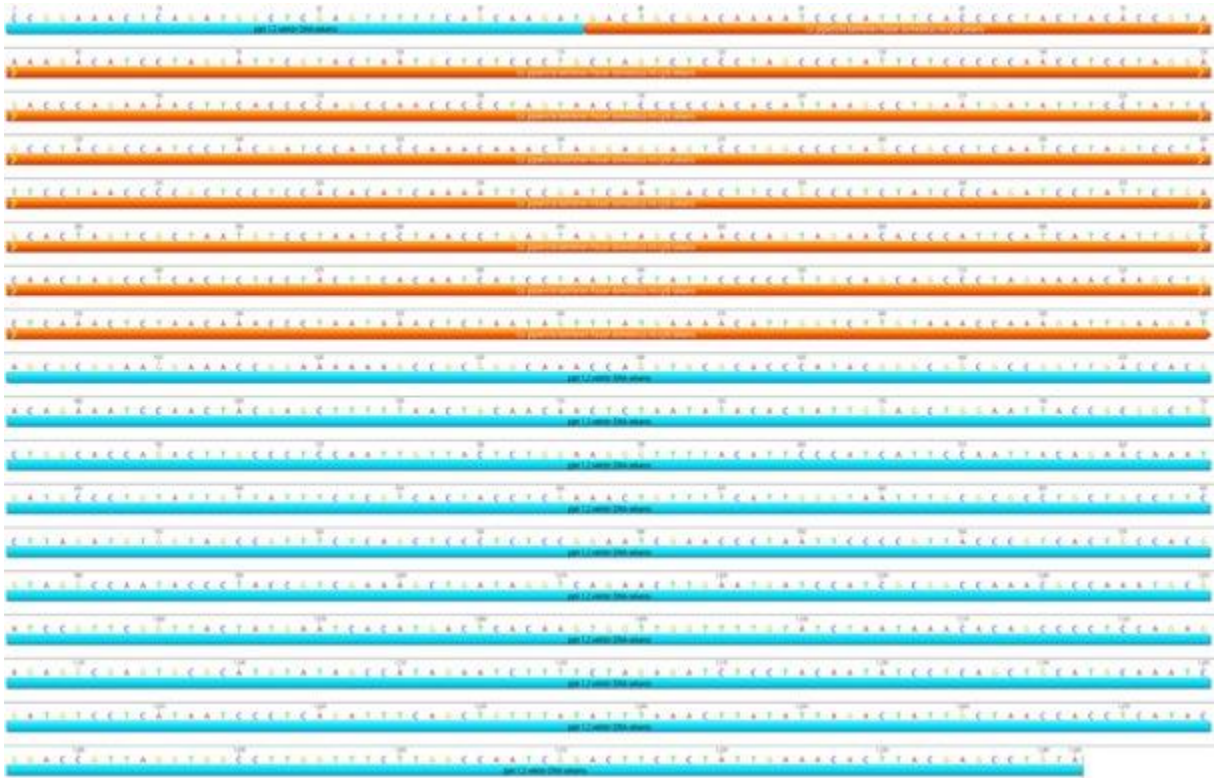
**Şekil 4.7** Ergin dişi *Culicoides* örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1-3, 5-7: Pozitif örnekler, 9: Pozitif kontrol (Kanatlı DNA’sı)



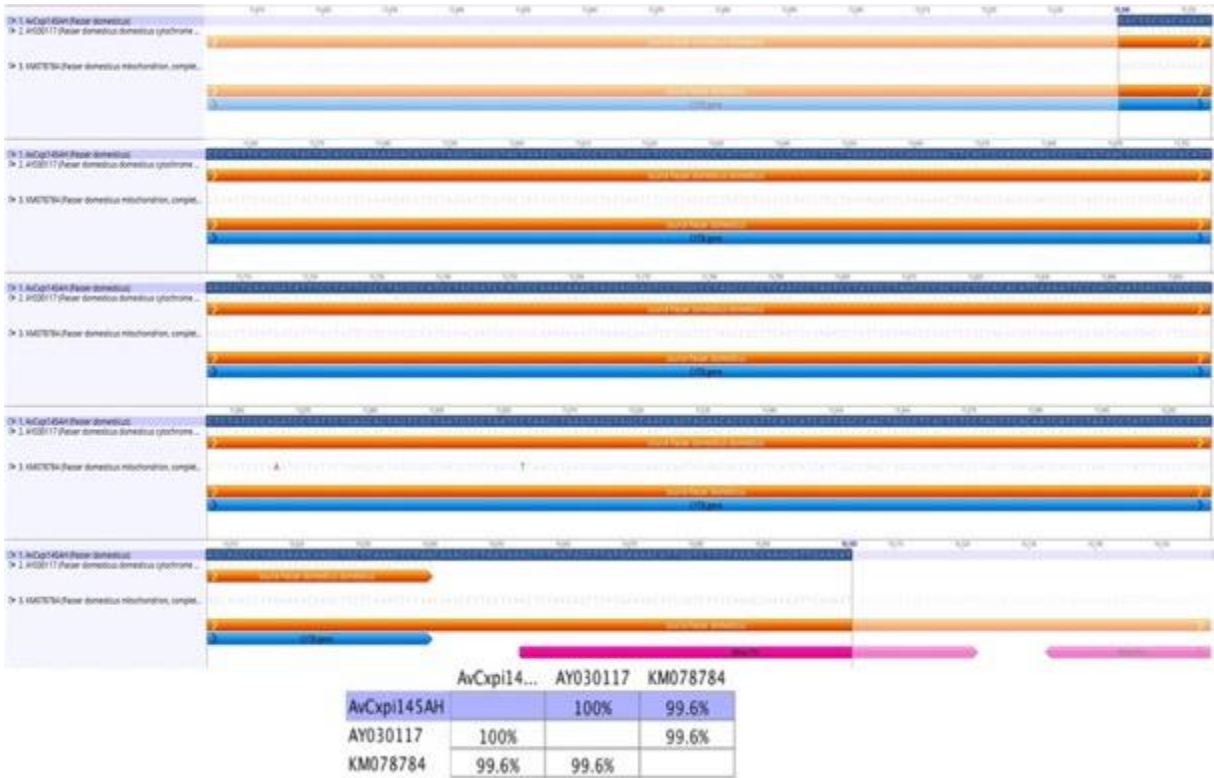
**Şekil 4.8** Ergin dişi sivrisinek örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 4,8,10,11: Pozitif örnekler, 13: Pozitif kontrol (Kanatlı DNA'sı)

Kanatlı konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden tür bazlı olarak seçilen uygun konsantrasyondaki izolatlara ait pürifiye amplikonlar kanatlı türü tayini için klonlandıktan sonra rekombinant plazmidleri elde edilmiştir. Rekombinant plazmidler vektör spesifik primerlerle sekans analizine tabii tutulmuş ve hedef mt-cyt b sekansları vektör DNA'sı içerisinde belirlenerek çıkarılmıştır (Örn., *Cx. pipiens* izolatında belirlenen *Passer domesticus* sekansı, Şekil 4.9). Elde edilen kanatlı mt-cytb sekansları Geneious R10 yazılımı (Kearse vd., 2012) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak veri bankasında araştırılmış ve homolog sekanslarla eşleşme sonucunda (Örn., *Cx. pipiens* izolatında belirlenen *Passer domesticus* sekansı Şekil 4.10) kanatlı konak tür tayinleri yapılmıştır. *Culicoides* ve sivrisinek türlerine ait izolatlarda kan beslenme analizleri sonucu belirlenen kanatlı konak türleri sırasıyla Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'de verilmiştir. Kanatlı kanı beslenmesinde hem *Culicoides* hem de sivrisinek türlerinin farklı oranlarda olmak üzere en fazla Passeriformes takımındaki kuşları konak olarak tercih ettikleri görülmüştür.





**Şekil 4.9** pJET1.2/blunt Cloning Vector DNA'sı içerisinde hedef kanatlı mt-cytb sekansı



**Şekil 4.10** BLASTn algoritması kullanılarak kanatlı mt-cytb sekanslarının identifikasyonu

**Tablo 4.12** *Culicoides* türlerine ait izolatların kanatlı mt-cytb sekans analizlerine göre kan beslenmesinde konak türlerinin dağılımı

| <i>Culicoides</i> Türü   | Sekanslanan Örnek Sayısı | Kanatlı takımı | Kanatlı Konak Türü              | Sayı | %     |
|--------------------------|--------------------------|----------------|---------------------------------|------|-------|
| <i>C. riethi</i>         | 27                       | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>    | 6    | 66,7  |
|                          |                          |                | <i>Passer domesticus</i>        | 4    |       |
|                          |                          |                | <i>Emberiza schoeniclus</i>     | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Sylvia atricapilla</i>       | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Sturnus vulgaris</i>         | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Motacilla flava</i>          | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Panurus biarmicus</i>        | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Acrocephalus melanopogon</i> | 2    |       |
|                          |                          | Falconiformes  | <i>Circus aeruginosus</i>       | 2    | 14,8  |
|                          |                          |                | <i>Buteo rufinus</i>            | 2    |       |
|                          |                          | Strigiformes   | <i>Asio otus</i>                | 3    | 11,1  |
|                          |                          | Columbiformes  | <i>Columba palumbus</i>         | 2    | 7,4   |
| <i>C. circumscriptus</i> | 31                       | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>    | 5    | 64,5  |
|                          |                          |                | <i>Passer domesticus</i>        | 4    |       |
|                          |                          |                | <i>Emberiza schoeniclus</i>     | 4    |       |
|                          |                          |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>  | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Chloris chloris</i>          | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Alcedo atthis</i>            | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Remiz pendulinus</i>         | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Garrulus glandarius</i>      | 1    |       |
|                          |                          | Falconiformes  | <i>Buteo rufinus</i>            | 2    | 9,7   |
|                          |                          |                | <i>Buteo buteo</i>              | 1    |       |
|                          |                          | Strigiformes   | <i>Asio otus</i>                | 4    | 12,9  |
|                          |                          | Columbiformes  | <i>Columba livia</i>            | 3    | 12,9  |
|                          |                          |                | <i>Columba palumbus</i>         | 1    |       |
| <i>C. submaritimus</i>   | 26                       | Passeriformes  | <i>Passer domesticus</i>        | 6    | 80,8  |
|                          |                          |                | <i>Passer hispaniolensis</i>    | 6    |       |
|                          |                          |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>  | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Garrulus glandarius</i>      | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Saxicola rubetra</i>         | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Oenanthe isabellina</i>      | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Sturnus vulgaris</i>         | 2    |       |
|                          |                          |                | <i>Acrocephalus melanopogon</i> | 1    |       |
|                          |                          | Strigiformes   | <i>Asio otus</i>                | 3    | 11,5  |
|                          |                          | Columbiformes  | <i>Columba palumbus</i>         | 2    | 7,7   |
| <i>C. geigelensis</i>    | 3                        | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>    | 2    | 100,0 |
|                          |                          |                | <i>Sturnus vulgaris</i>         | 1    |       |
| <i>C. duddingstoni</i>   | 4                        | Passeriformes  | <i>Phylloscopus trochilus</i>   | 2    | 75,0  |
|                          |                          |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>  | 1    |       |
|                          |                          | Columbiformes  | <i>Columba livia</i>            | 1    | 25,0  |
| <i>C. longipennis</i>    | 4                        | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>    | 2    | 100,0 |
|                          |                          |                | <i>Emberiza schoeniclus</i>     | 1    |       |
|                          |                          |                | <i>Pica pica</i>                | 1    |       |
| <i>C. festivipennis</i>  | 2                        | Passeriformes  | <i>Passer domesticus</i>        | 1    | 100,0 |
|                          |                          |                | <i>Pica pica</i>                | 1    |       |

|                     |   |               |                                |   |      |
|---------------------|---|---------------|--------------------------------|---|------|
| <i>C. newsteadi</i> | 3 | Passeriformes | <i>Acrocephalus scirpaceus</i> | 1 | 66,7 |
|                     |   |               | <i>Garrulus glandarius</i>     | 1 |      |
|                     |   | Strigiformes  | <i>Asio otus</i>               | 1 | 33,3 |

**Tablo 4.13** Sivrisinek türlerine ait izolatların kanatlı mt-cytb sekans analizlerine göre kan beslenmesinde konak türlerinin dağılımı

| Sivrisinek Türü             | Sekanslanan Örnek Sayısı | Kanatlı takımı | Kanatlı Konak Türü               | Sayı | %      |
|-----------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------------|------|--------|
| <i>An. sacharovi</i>        | 5                        | Passeriformes  | <i>Passer domesticus</i>         | 2    | 60,00  |
|                             |                          |                | <i>Sturnus vulgaris</i>          | 1    |        |
|                             |                          | Falconiformes  | <i>Buteo buteo</i>               | 1    | 20,00  |
|                             |                          | Strigiformes   | <i>Athene noctua</i>             | 1    | 20,00  |
| <i>Cx. pipiens kompleks</i> | 35                       | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>     | 8    | 77,14  |
|                             |                          |                | <i>Passer domesticus</i>         | 5    |        |
|                             |                          |                | <i>Acrocephalus melanopogon</i>  | 5    |        |
|                             |                          |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>   | 3    |        |
|                             |                          |                | <i>Panurus biarmicus</i>         | 3    |        |
|                             |                          |                | <i>Emberiza schoeniclus</i>      | 1    |        |
|                             |                          |                | <i>Phylloscopus trochilus</i>    | 1    |        |
|                             |                          |                | <i>Hirundo rustica</i>           | 1    |        |
|                             |                          | Falconiformes  | <i>Circus aeruginosus</i>        | 2    | 14,29  |
|                             |                          |                | <i>Buteo rufinus</i>             | 2    |        |
|                             |                          |                | <i>Buteo buteo</i>               | 1    |        |
|                             |                          | Strigiformes   | <i>Asio otus</i>                 | 2    | 8,57   |
|                             |                          |                | <i>Strix aluco</i>               | 1    |        |
| <i>An. maculipennis</i>     | 1                        | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>     | 1    | 100,00 |
| <i>Ae. vexans</i>           | 5                        | Passeriformes  | <i>Passer hispaniolensis</i>     | 2    | 80,00  |
|                             |                          |                | <i>Acrocephalus arundinaceus</i> | 1    |        |
|                             |                          |                | <i>Riparia riparia</i>           | 1    |        |
| <i>An. claviger</i>         | 1                        | Falconiformes  | <i>Circus pygargus</i>           | 1    | 20,00  |
|                             |                          |                | <i>Passer domesticus</i>         | 1    | 100,00 |

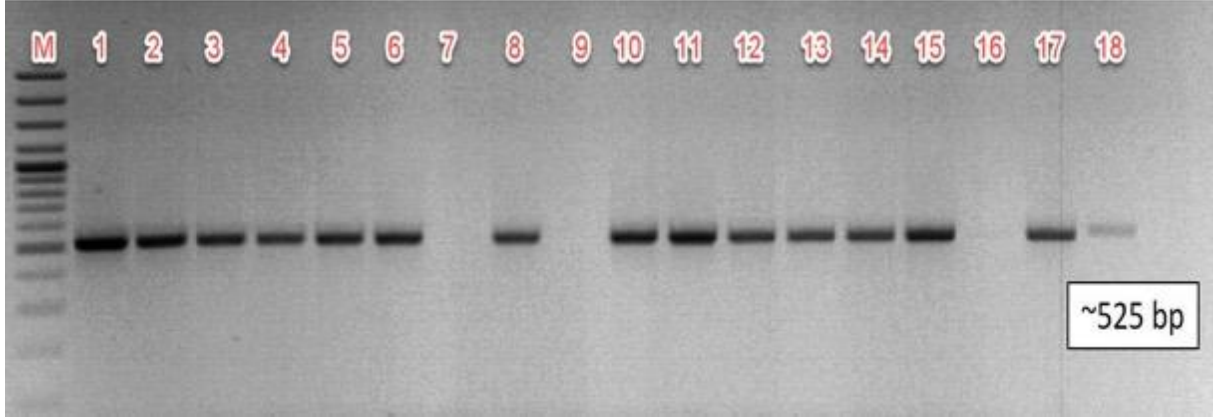
#### 4.4 Kanatlı ve İnsekt Örneklerinde Haemosporidian Parazitlerin Analiz Sonuçları

##### 4.4.1 Kanatlı Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu

Çalışma süresince örneklenen altı dizi içerisinde 23 aileye ait 39 türden toplam 565 kuşun haemosporidian parazitler yönünden moleküler analiz sonuçları Tablo 4.14’de verilmiştir. Tablo 4.14’de görüldüğü üzere incelenen kuşların %29,73’ü *Plasmodium/Haemoproteus*



%1,06'sı *Leucocytozoon* sp. ve %3,36'sı da miks enfekte belirlenmiştir. Kuş kanlarından elde edilen genomik DNA izolatlarının ilgili primerlerle mt-cytb gen bölgesi amplifikasyonu sonucu *Plasmodium/Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* sp. için hedef büyüklükte (524 bp) belirlenen amplikonlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11** Bazı *Plasmodium/Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* pozitif kanatlı örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker, 1-6,8,10: *Plasmodium/Haemoproteus*, 11-15,17,18: *Leucocytozoon*

**Tablo 4.14** İncelenen kuşlarda Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları

| Takım           | Aile           | Tür                               | İncelenen Örnek Sayısı | Nested PCR pozitifliği         |        |                      |       |                                                |        |
|-----------------|----------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------|----------------------|-------|------------------------------------------------|--------|
|                 |                |                                   |                        | <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> |        | <i>Leucocytozoon</i> |       | <i>Plasmodium/Haemoproteus + Leucocytozoon</i> |        |
|                 |                |                                   |                        | Sayı                           | %      | Sayı                 | %     | Sayı                                           | %      |
| Pelecaniformes  | Ardeidae       | <i>Ixobrychus minutus</i>         | 17                     | 11                             | 64,70  | 0                    | 0     | 1                                              | 5,88   |
| Charadriiformes | Scolopacidae   | <i>Tringa ochropus</i>            | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
| Coraciiformes   | Alcedinidae    | <i>Alcedo atthis</i>              | 7                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Meropidae      | <i>Merops apiaster</i>            | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
| Bucerotiformes  | Upupidae       | <i>Upupa epops</i>                | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
| Piciformes      | Picidae        | <i>Dendrocopos syriacus</i>       | 2                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
| Passeriformes   | Laniidae       | <i>Lanius collurio</i>            | 11                     | 7                              | 63,63  | 0                    | 0     | 2                                              | 18,18  |
|                 | Corvidae       | <i>Pica pica</i>                  | 2                      | 0                              | 0      | 1                    | 50,00 | 1                                              | 50,00  |
|                 | Paridae        | <i>Cyanistes caeruleus</i>        | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Remizidae      | <i>Remiz pendulinus</i>           | 16                     | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Panuridae      | <i>Panurus biarmicus</i>          | 58                     | 13                             | 22,41  | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Alaudidae      | <i>Galerida cristata</i>          | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 |                | <i>Riparia riparia</i>            | 9                      | 2                              | 22,22  | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Hirundinidae   | <i>Hirundo rustica</i>            | 37                     | 3                              | 8,10   | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 |                | <i>Phylloscopus trochilus</i>     | 22                     | 5                              | 22,72  | 1                    | 4,54  | 6                                              | 27,27  |
|                 | Acrocephalidae | <i>Acrocephalus arundinaceus</i>  | 41                     | 15                             | 36,58  | 0                    | 0     | 1                                              | 2,43   |
|                 |                | <i>Acrocephalus melanopogon</i>   | 67                     | 17                             | 25,37  | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 |                | <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | 19                     | 8                              | 42,10  | 1                    | 5,26  | 0                                              | 0      |
|                 |                | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>    | 50                     | 19                             | 38,00  | 1                    | 2,00  | 3                                              | 6,00   |
|                 |                | <i>Acrocephalus palustris</i>     | 3                      | 3                              | 100,00 | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 |                | <i>Iduna pallida</i>              | 2                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 1                                              | 50,00  |
|                 | Locustellidae  | <i>Locustella luscinioides</i>    | 1                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 0                                              | 0      |
|                 | Sylviidae      | <i>Sylvia atricapilla</i>         | 2                      | 0                              | 0      | 0                    | 0     | 2                                              | 100,00 |

|  |               |                              |            |            |              |          |             |           |             |
|--|---------------|------------------------------|------------|------------|--------------|----------|-------------|-----------|-------------|
|  |               | <i>Sylvia curruca</i>        | 1          | 0          | 0            | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Sylvia crassirostris</i>  | 1          | 1          | 100,00       | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Sylvia communis</i>       | 1          | 1          | 100,00       | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Sturnidae     | <i>Sturnus vulgaris</i>      | 23         | 4          | 17,39        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Turdidae      | <i>Muscicapa striata</i>     | 2          | 0          | 0            | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Luscinia svecica</i>      | 2          | 1          | 50,00        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Luscinia luscinia</i>     | 1          | 0          | 0            | 0        | 0           | 1         | 100,00      |
|  |               | <i>Saxicola rubetra</i>      | 3          | 2          | 66,66        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Oenanthe isabellina</i>   | 5          | 0          | 0            | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Passeridae    | <i>Passer domesticus</i>     | 23         | 5          | 21,73        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Passer hispaniolensis</i> | 88         | 37         | 42,04        | 2        | 2,27        | 1         | 1,13        |
|  |               | <i>Passer montanus</i>       | 17         | 10         | 58,82        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Motacillidae  | <i>Motacilla flava</i>       | 6          | 1          | 16,66        | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  |               | <i>Motacilla alba</i>        | 1          | 1          | 100,00       | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Fringillidae  | <i>Chloris chloris</i>       | 2          | 2          | 100,00       | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | Emberizidae   | <i>Emberiza schoeniclus</i>  | 18         | 0          | 0            | 0        | 0           | 0         | 0           |
|  | <b>TOPLAM</b> |                              | <b>565</b> | <b>168</b> | <b>29,73</b> | <b>6</b> | <b>1,06</b> | <b>19</b> | <b>3,36</b> |

Yerli ve göçmen kuşlarda haemosporidian enfeksiyonların dağılımı sırasıyla Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da verilmiştir. Yerli ve göçmen kuşlarda belirlenen haemosporidian pozitiflik oranlarının istatistiksel analiz sonucu Tablo 4.17'de gösterilmiştir. Tablo 4.17'de görüleceği üzere göçmen kuşlardaki haemosporidian parazitlerin prevalansı yerli kuşlara oranla yüksek bulunmuş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 4.15** İncelenen yerli kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler prevalansı

| Statü                 |        | Kuş Türü                          | İncelenen Kuş Sayısı | Avian Haemosporidian Enfekte Kuş Sayısı |        |
|-----------------------|--------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------------|--------|
|                       |        |                                   |                      | Sayı                                    | %      |
| Yerli Kuş             | H      | <i>Dendrocopos syriacus</i>       | 2                    | 0                                       | 0      |
|                       |        | <i>Pica pica</i>                  | 2                    | 2                                       | 100,00 |
|                       |        | <i>Cyanistes caeruleus</i>        | 1                    | 0                                       | 0      |
|                       |        | <i>Remiz pendulinus</i>           | 16                   | 0                                       | 0      |
|                       |        | <i>Panurus biarmicus</i>          | 58                   | 13                                      | 22,41  |
|                       |        | <i>Galerida cristata</i>          | 1                    | 0                                       | 0      |
|                       |        | <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | 19                   | 9                                       | 47,36  |
|                       |        | <i>Sturnus vulgaris</i>           | 23                   | 4                                       | 17,39  |
|                       |        | <i>Passer domesticus</i>          | 23                   | 5                                       | 21,73  |
|                       |        | <i>Passer hispaniolensis</i>      | 88                   | 40                                      | 45,45  |
|                       |        | <i>Passer montanus</i>            | 17                   | 10                                      | 58,82  |
|                       |        | <i>Chloris chloris</i>            | 2                    | 2                                       | 100,00 |
|                       |        | <i>Emberiza schoeniclus</i>       | 18                   | 0                                       | 0      |
|                       | H/G/YG | <i>Alcedo atthis</i>              | 7                    | 0                                       | 0      |
|                       | H/G    | <i>Acrocephalus melanopogon</i>   | 67                   | 17                                      | 25,37  |
| <i>Motacilla alba</i> |        | 1                                 | 1                    | 100,00                                  |        |
| TOPLAM                |        |                                   | 345                  | 103                                     | 29,85  |

**Tablo 4.16** İncelenen göçmen kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler prevalansı

| Statü                    |      | Kuş Türü                         | İncelenen Kuş Sayısı | Avian Haemosporidian Enfekte Kuş Sayısı |        |
|--------------------------|------|----------------------------------|----------------------|-----------------------------------------|--------|
|                          |      |                                  |                      | Sayı                                    | %      |
| Göçmen Kuş               | YG   | <i>Ixobrychus minutus</i>        | 17                   | 12                                      | 70,58  |
|                          |      | <i>Merops apiaster</i>           | 1                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Upupa epops</i>               | 1                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Lanius collurio</i>           | 11                   | 9                                       | 81,81  |
|                          |      | <i>Hirundo rustica</i>           | 37                   | 3                                       | 8,10   |
|                          |      | <i>Phylloscopus trochilus</i>    | 22                   | 12                                      | 54,54  |
|                          |      | <i>Acrocephalus arundinaceus</i> | 41                   | 16                                      | 39,02  |
|                          |      | <i>Acrocephalus scirpaceus</i>   | 50                   | 23                                      | 46,00  |
|                          |      | <i>Acrocephalus palustris</i>    | 3                    | 3                                       | 100,00 |
|                          |      | <i>Iduna pallida</i>             | 2                    | 1                                       | 50,00  |
|                          |      | <i>Locustella luscinioides</i>   | 1                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Sylvia atricapilla</i>        | 2                    | 2                                       | 100,00 |
|                          |      | <i>Sylvia curruca</i>            | 1                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Sylvia crassirostris</i>      | 1                    | 1                                       | 100,00 |
|                          |      | <i>Sylvia communis</i>           | 1                    | 1                                       | 100,00 |
|                          |      | <i>Muscicapa striata</i>         | 2                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Saxicola rubetra</i>          | 3                    | 2                                       | 66,66  |
|                          |      | <i>Oenanthe isabellina</i>       | 5                    | 0                                       | 0      |
|                          | YG/G | <i>Motacilla flava</i>           | 6                    | 1                                       | 16,66  |
|                          | G    | <i>Tringa ochropus</i>           | 1                    | 0                                       | 0      |
|                          |      | <i>Riparia riparia</i>           | 9                    | 2                                       | 22,22  |
| <i>Luscinia svecica</i>  |      | 2                                | 1                    | 50,00                                   |        |
| <i>Luscinia luscinia</i> |      | 1                                | 1                    | 100,00                                  |        |
| TOPLAM                   |      |                                  | 220                  | 90                                      | 40,90  |

**Tablo 4.17** Göçmen ve yerli kuş türlerinde Haemosporidian parazitlerin dağılımının istatistiksel analizi

| Chi-Square Tests                                                                                                         |                    |    |                       |                      |                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----|-----------------------|----------------------|----------------------|
|                                                                                                                          | Value              | df | Asymp. Sig. (2-sided) | Exact Sig. (2-sided) | Exact Sig. (1-sided) |
| Pearson Chi-Square                                                                                                       | 7,298 <sup>a</sup> | 1  | ,007                  |                      |                      |
| Continuity Correction <sup>b</sup>                                                                                       | 6,815              | 1  | ,009                  |                      |                      |
| Likelihood Ratio                                                                                                         | 7,241              | 1  | ,007                  |                      |                      |
| Fisher's Exact Test                                                                                                      |                    |    |                       | ,008                 | ,005                 |
| Linear-by-Linear Association                                                                                             | 7,286              | 1  | ,007                  |                      |                      |
| N of Valid Cases                                                                                                         | 565                |    |                       |                      |                      |
| a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 75,15. b. Computed only for a 2x2 table |                    |    |                       |                      |                      |

Kuş türü ve haemosporidian parazit soyu temelinde uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlara ait ampikonlar jelden pürifiye edilmiş ve sonrasında gen spesifik nested primerlerle çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Bazı düşük konsantrasyonda olan izolatların sekanslanmasında klonlama ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır. Bu izolatlara ait sekanslar rekombinant plazmid DNA sekansı içerisinde uygun yazılım ile belirlenmiş ve karakterize edilmiştir. Sekansların değerlendirilmesinden önce PCR primerleri ilgili izolatlara ait sekanslardan trimlenerek çıkarılmış ve 478 bp barkod bölge elde edilerek filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Haemosporidian parazitlerle enfekte belirlenen kuş örneklerine ait izolatların sekans analizleri sonucu belirlenen parazit tür veya nesilleri ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.18’de verilmiştir. Sekans analizlerine tabii tutulan toplam 117 *Haemoproteus/Plasmodium* pozitif izolatının %76,06’sı *Haemoproteus*, %23,93’i ise *Plasmodium* olarak karakterize edilmiştir. Çalışmada tespit edilen 42 neslin daha önce karakterize edilmiş olan tür veya nesillerle identik olduğu belirlenirken *Haemoproteus* (CARCHL01, MW3, RBS6, RBS7, RW4, SYNIS04); *Plasmodium* (IXOMIN02, IXOMIN03) ve *Leucocytozoon* (ACSCI01, IDUPAL01, PAHIS03, PICPIC01) türlerinde belirlenen nesiller Dünya’da ilk kez karakterize edilmiş ve moleküler veri bankasına kazandırılmıştır.

**Tablo 4.18** Sekans analiz sonuçlarına göre kuş türlerinde belirlenen Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu

| Tür                           | Sekanslanan izolat sayısı | Haemosporidia Sekans Karakterizasyonu |                           |                           |                                               |                            |                         |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                               |                           | <i>Plasmodium</i> nesil               | Sayı (GenBank Aksesyon)   | <i>Haemoproteus</i> nesil | Sayı (GenBank Aksesyon)                       | <i>Leucocytozoon</i> nesil | Sayı (GenBank Aksesyon) |
| <i>Ixobrychus minutus</i>     | 12                        | IXOMIN02 (yeni)                       | 1 (KU752579)              | -                         | -                                             | CIAE02                     | 1 (KU761603)            |
|                               |                           | IXOMIN03 (yeni)                       | 1 (MF118163)              |                           |                                               |                            |                         |
|                               |                           | CXPIP23                               | 9 (KU752580-87, MF101831) |                           |                                               |                            |                         |
| <i>Tringa ochropus</i>        | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Alcedo atthis</i>          | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Merops apiaster</i>        | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Upupa epops</i>            | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Dendrocopos syriacus</i>   | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Lanius collurio</i>        | 7                         | -                                     | -                         | RB1                       | 1 (KU752591)                                  | BT5                        | 1 (MF101830)            |
|                               |                           |                                       |                           | RBS4                      | 2 (KY768810, KY768813)                        |                            |                         |
|                               |                           |                                       |                           | RBS5                      | 1 (KU752570)                                  |                            |                         |
|                               |                           |                                       |                           | RBS6 (yeni)               | 1 (MF118161)                                  |                            |                         |
|                               |                           |                                       |                           | RBS7 (yeni)               | 1 (MF118162)                                  |                            |                         |
| <i>Pica pica</i>              | 2                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | PICPIC01 (yeni)            | 2 (KY768841, MF101824)  |
| <i>Cyanistes caeruleus</i>    | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Remiz pendulinus</i>       | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Panurus biarmicus</i>      | 6                         | -                                     | -                         | WW1                       | 1 (KU761594)                                  | -                          | -                       |
|                               |                           |                                       |                           | GRW05                     | 5 (KU761595-97, KY768826-27)                  |                            |                         |
| <i>Galerida cristata</i>      | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Riparia riparia</i>        | 2                         | -                                     | -                         | DELURB1                   | 2 (KY777414, MF101829)                        | -                          | -                       |
| <i>Hirundo rustica</i>        | -                         | -                                     | -                         | -                         | -                                             | -                          | -                       |
| <i>Phylloscopus trochilus</i> | 11                        | GRW02                                 | 1 (KY777420)              | WW1                       | 6 (KY768815, KY768818, KY768844-46, KY777420) | BT2                        | 2 (KY768818, KY777421)  |
|                               |                           |                                       |                           | WW2                       | 2 (KY777421-22)                               |                            |                         |

|                                   |    |         |              |                |                                                                   |                 |                 |
|-----------------------------------|----|---------|--------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Acrocephalus arundinaceus</i>  | 12 | GRW10   | 1 (KY777409) | GRW01          | 1 (KY768822)                                                      | -               | -               |
|                                   |    | SYBOR10 | 1 (KY777408) | GRW05          | 8 (KU752566, KY768835, KY768837-39, KY777407, KY777412, KY777416) |                 |                 |
|                                   |    |         |              | PAHIS1         | 1 (KY768829)                                                      |                 |                 |
| <i>Acrocephalus melanopogon</i>   | 9  | PADOM02 | 1 (KX831069) | GRW05          | 8 (KU761598-99, KU761600-02, KX831067, KY768840, KY777415)        | -               | -               |
| <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> | 6  | GRW02   | 1 (KY768811) | SW1            | 2 (KY768812, KY768817)                                            | -               | -               |
|                                   |    | SW2     | 1 (KY777411) |                |                                                                   |                 |                 |
|                                   |    | GRW06   | 1 (MF101820) | SW3            | 1 (MF101821)                                                      |                 |                 |
| <i>Acrocephalus scirpaceus</i>    | 14 | RTSR1   | 1 (KY768825) | ACDUM2         | 1 (KU752593)                                                      | ACSCI01 (yeni)  | 1 (KU761605)    |
|                                   |    |         |              | ARW1           | 2 (KU748515, KY768847)                                            |                 |                 |
|                                   |    |         |              | GRW01          | 1 (KX831068)                                                      |                 |                 |
|                                   |    |         |              | MW1            | 2 (KU752595, KY777410)                                            |                 |                 |
|                                   |    |         |              | PADOM05        | 1 (KY768820)                                                      | REB11           | 1 (KU761604)    |
|                                   |    |         |              | RW1            | 1 (KU752594)                                                      |                 |                 |
|                                   |    |         |              | RW4 (yeni)     | 1 (KY768830)                                                      |                 |                 |
|                                   |    |         |              | SW1            | 1 (KU752592)                                                      |                 |                 |
|                                   |    |         |              | WW1            | 1 (KY768816)                                                      |                 |                 |
| <i>Acrocephalus palustris</i>     | 3  | -       | -            | MW1            | 1 (KY768848)                                                      | -               | -               |
|                                   |    |         |              | GRW05          | 1 (KY777413)                                                      |                 |                 |
|                                   |    |         |              | MW3 (yeni)     | 1 (MF118164)                                                      |                 |                 |
| <i>Iduna pallida</i>              | 2  |         |              | HIP2           | 1 (KU752567)                                                      | IDUPAL01 (yeni) | 1 (KU752576)    |
| <i>Locustella luscinioides</i>    | -  | -       | -            | -              | -                                                                 | -               | -               |
| <i>Sylvia atricapilla</i>         | 4  | -       | -            | SYAT10         | 1 (KU752574)                                                      | SYAT22          | 2 (KU752577-78) |
|                                   |    |         |              | SYAT36         | 1 (MF101823)                                                      |                 |                 |
| <i>Sylvia curruca</i>             | -  | -       | -            | -              | -                                                                 | -               | -               |
| <i>Sylvia crassirostris</i>       | 1  | -       | -            | SYNIS04 (yeni) | 1 (KU752588)                                                      | -               | -               |
| <i>Sylvia communis</i>            | 1  | -       | -            | CWT6           | 1 (MF101822)                                                      | -               | -               |
| <i>Sturnus vulgaris</i>           | 2  | -       | -            | LAMPUR01       | 2 (KY768821, KU752568)                                            | -               | -               |
| <i>Muscicapa striata</i>          | -  | -       | -            | -              | -                                                                 | -               | -               |
| <i>Luscinia svecica</i>           | 1  | SW2     | 1 (KY777427) | -              | -                                                                 | -               | -               |



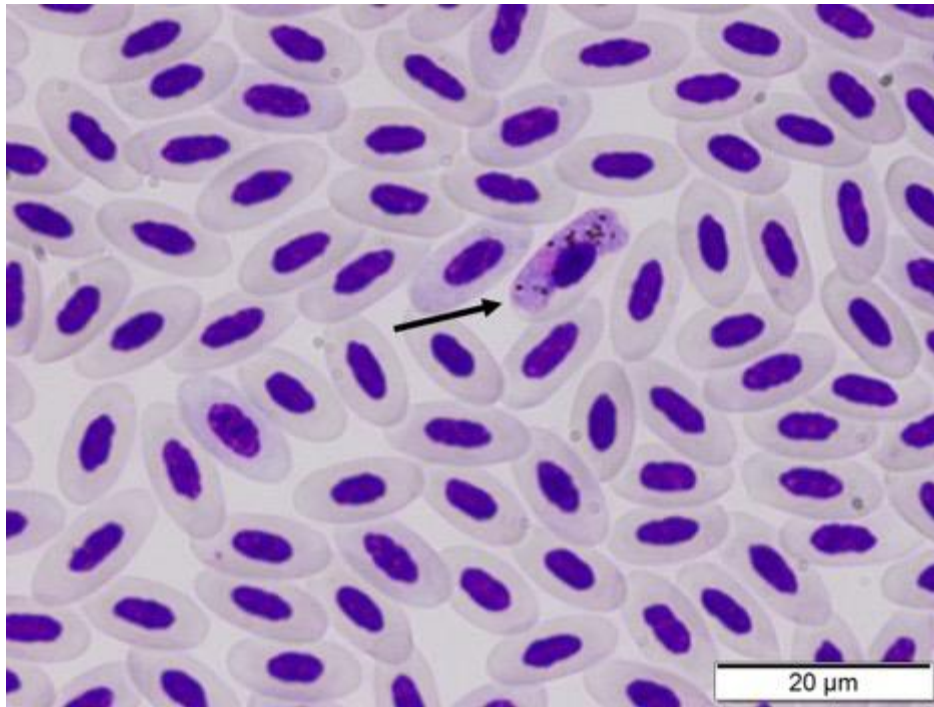
|                              |            |           |                        |                 |                                                                                                                               |                |                 |
|------------------------------|------------|-----------|------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| <i>Luscinia luscinia</i>     | 1          | -         | -                      | ROBIN1          | 1 (KU752571)                                                                                                                  | -              | -               |
| <i>Saxicola rubetra</i>      | 2          | SW2       | 1 (KY777424)           | -               | -                                                                                                                             | -              | -               |
|                              |            | GRW11     | 1 (MF101832)           |                 |                                                                                                                               |                |                 |
| <i>Oenanthe isabellina</i>   | -          | -         | -                      | -               | -                                                                                                                             | -              | -               |
| <i>Passer domesticus</i>     | 4          | SGS1      | 2 (MF101827-28)        | PADOM03         | 1 (KY768849)                                                                                                                  | -              | -               |
|                              |            |           |                        | PADOM05         | 1 (KY777426)                                                                                                                  |                |                 |
| <i>Passer hispaniolensis</i> | 21         | -         | -                      | PADOM03         | 2 (KY768824, KY768834)                                                                                                        | PAHIS03 (yeni) | 1 (KX831070)    |
|                              |            |           |                        | PADOM05         | 15 (KU752569, KX831065-66, KY768819, KY768823, KY768828, KY768832-33, KY768842-43, KY777417-18, KY777423, KY777425, KY777428) |                |                 |
|                              |            |           |                        | PAHIS2          | 1 (KY768831)                                                                                                                  | RECOB3         | 2 (KU761606-07) |
| <i>Passer montanus</i>       | 4          | SGS1      | 2 (KX831064, MF101826) | PADOM05         | 1 (KY777419)                                                                                                                  | -              | -               |
|                              |            | GRW11     | 1 (MF101825)           |                 |                                                                                                                               |                |                 |
| <i>Motacilla flava</i>       | 1          | -         | -                      | YWT1            | 1 (KU752575)                                                                                                                  | -              | -               |
| <i>Motacilla alba</i>        | 1          | -         | -                      | YWT2            | 1 (KY768836)                                                                                                                  | -              | -               |
| <i>Chloris chloris</i>       | 2          | SGS1      | 1 (KU752590)           | CARCHL01 (yeni) | 1 (KU752572)                                                                                                                  | -              | -               |
| <i>Emberiza schoeniclus</i>  | -          | -         | -                      | -               | -                                                                                                                             | -              | -               |
| <b>TOPLAM</b>                | <b>131</b> | <b>12</b> | <b>28</b>              | <b>32</b>       | <b>89</b>                                                                                                                     | <b>10</b>      | <b>14</b>       |

Sekans analizleriyle karakterize edilen *Plasmodium*, *Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* tür veya nesillerine ait izolatların mikroskopik analizlerle belirlenen gelişim dönemlerine ait morfolojik özellikleri kanatlı türü bazında aşağıda verilmiştir.

#### 1- Kanatlı Türü: *Acrocephalus arundinaceus*

##### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus nucleocondensus*/GRW01

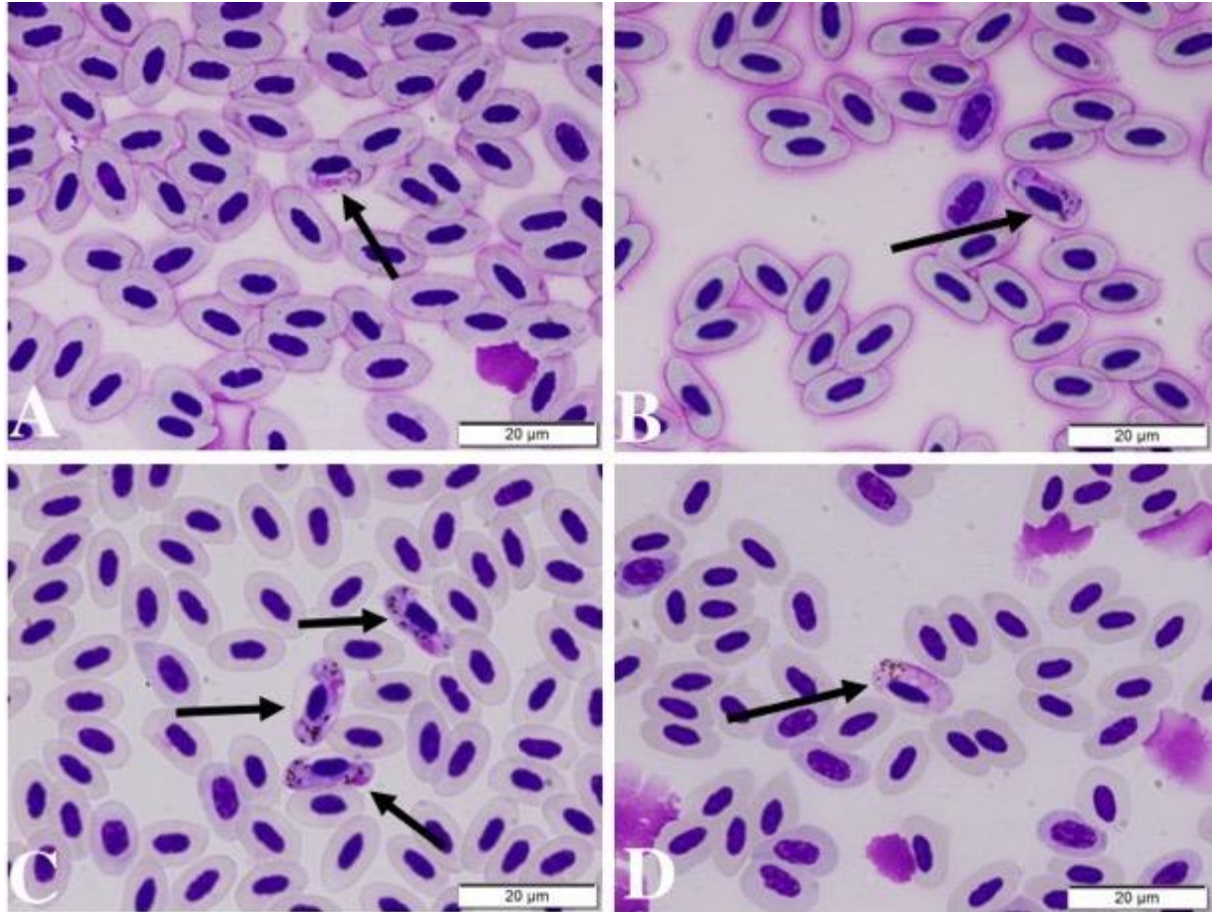
*Haemoproteus nucleocondensus* gametositlerinin enfekte eritrositlerin çekirdeği boyunca büyüdükleri, çekirdeği yana doğru hafifçe yerinden oynatmalarına rağmen tamamen çevrelemedikleri belirlenmiştir. Büyümekte olan ve tam olarak gelişmiş gametositlerin çoğunluğunun eritrositlerin hem çekirdeği hem de yüzeyiyle yakından ilişkili olduğu, ancak genç gametositlerin, eritrosit yüzeyine temas etmedikleri (bu özellik, bu türün gelişiminin belirgin bir özelliğidir) görülmüştür. Ayrıca, tamamen gelişen gametositlerin, eritrositlerin neredeyse tüm sitoplazmik alanı kapladıkları ve bu gametositlerin, halteridial bir yapı ile sadece eritrosit çekirdeğini uçlarıyla kapatarak onları yana doğru hafifçe yerinden oynattıkları tespit edilmiştir. Bu türün ayırt edici morfolojik özelliklerinden biri olan gametositlerin çekirdek yapılarının, makrogametositlerde kompakt ve küçük, mikrogametositlerde ise belirgin şekilde yoğunlaşmış ve küçük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kanatlı haemosporidian parazitlerde nadir görülen bir özellik olarak bu türde mikrogametosit çekirdeğinin kapladığı alanın makrogametosit çekirdeğine göre çok daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12** *Haemoproteus nucleocondensus*'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./GRW05 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus belopolskyi*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin enfekte eritrositlerin çekirdeğinin çevresinde geliştiği ve uç kısımlarıyla çekirdeği belirgin bir şekilde örterek tamamen kuşatabildikleri gözlenmiştir. Ayrıca orta büyüklükteki gametositlerin, enfekte olmuş eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştıkları tespit edilmiştir. Bunun yanında, dambıl şeklindeki gametositler yaygın bir şekilde görülürken pigment granüllerinin orta büyüklükte olduğu (0,5-1,0 µm) ve ortalama sayısının, genellikle 5 ila 15 arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.13). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, GRW05 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. belopolskyi* olarak identifiye edilmiştir.



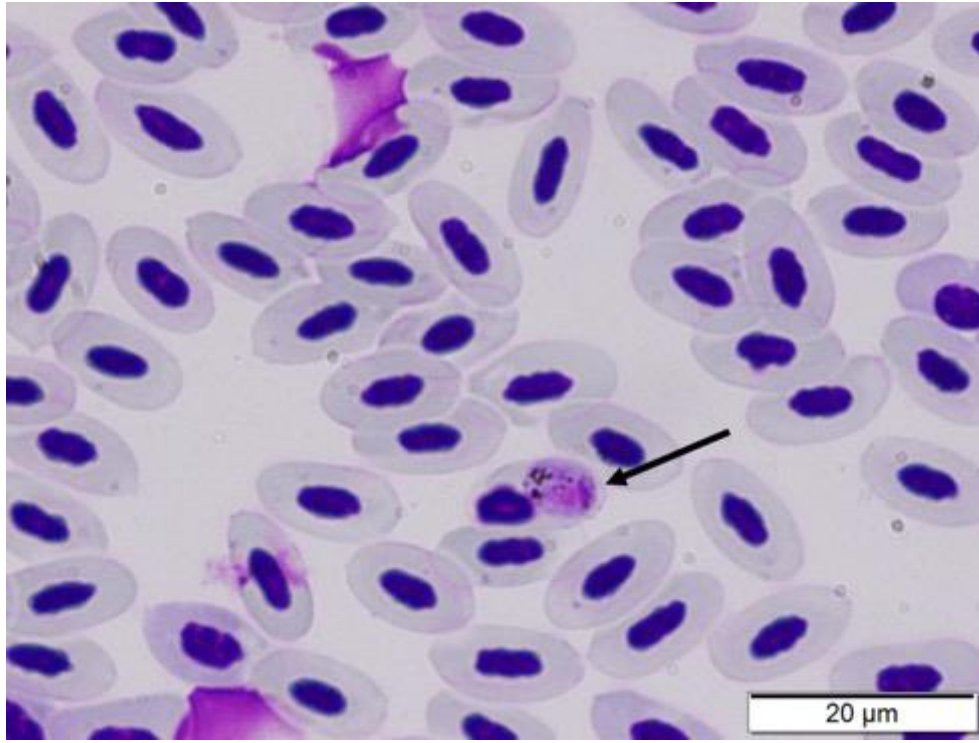
**Şekil 4.13** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Genç gametositler; C: Makrogametosit; D: Mikrogametosit

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./PAHIS1**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium* sp./SYBOR10 (Morfolojik identifikasyon: *Plasmodium lutzi*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerde pigment granüllerinin yuvarlak bir şekilde olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında trofozoitlerde, genç eritrositik merontlarda ve gametositlerdeki pigment granüllerinin bir arada olacak şekilde kenara toplandığı görülmüştür. Ayrıca çapı 1 µm'den büyük vakuollerin eritrositik merontlarda yer almadığı da belirlenirken, olgun eritrositik merontların 6 ila 26 arasında merozoit içerdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, SYBOR10 nesline ait eritrositik gelişim formları, *P. lutzi* olarak tanımlanmıştır.

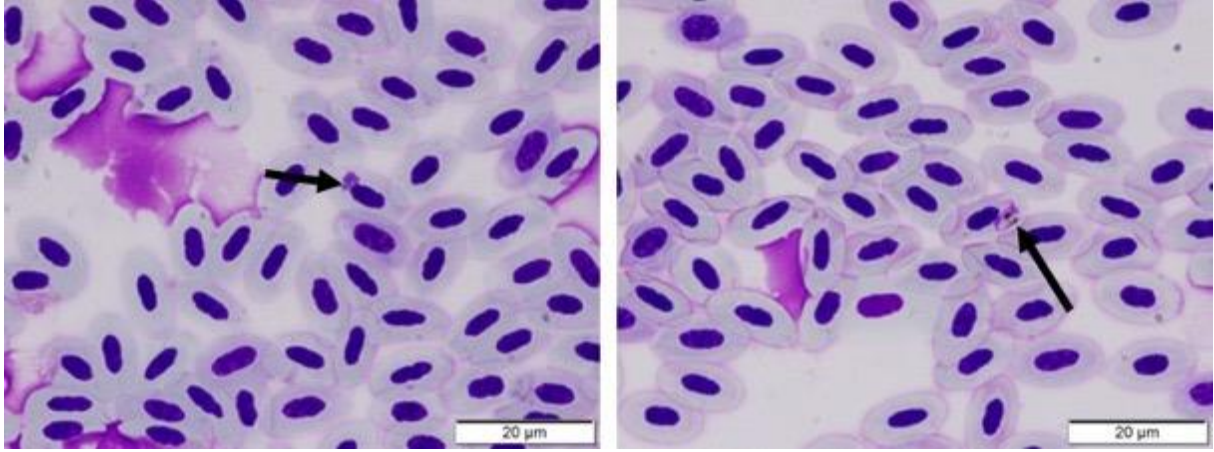


**Şekil 4.14** *Plasmodium lutzi*'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

**e) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium* sp./GRW10**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemlerinin araştırıldığı giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde ilgili parazite ait sadece trofozoit yapıları gözlemlendiğinden ve tür tanımlaması için gerekli olan gametositler bulunamadığından morfolojik identifikasyon gerçekleştirilememiştir (Şekil 4.15).





**Şekil 4.15** *Plasmodium* sp. eritrositik gelişim dönemleri (trofozoit)

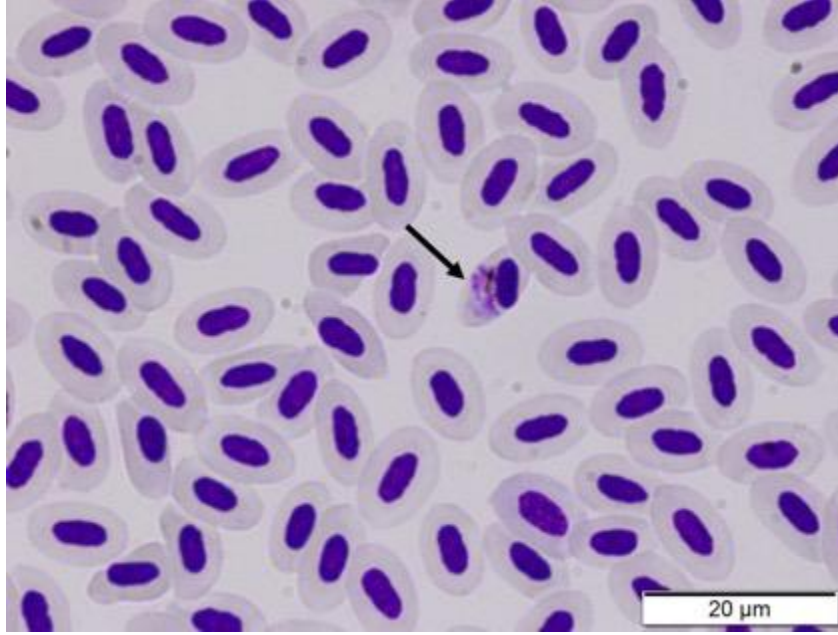
## **2- Kanatlı Türü: *Acrocephalus melanopogon***

### **a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./GRW05**

Başlık 1-b'de *Haemoproteus belopolskyi* olarak morfolojik identifikasyonu yapılan GRW05 nesli, *A. melanopogon*'a ait kan frotilerinde tespit edilememiştir.

### **b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium* sp./PADOM02 (Morfolojik identifikasyon: *Plasmodium relictum*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde genç trofozoitlerin, genellikle enfekte eritrositlerin çekirdeklerini belirgin şekilde yerinden oynattıkları ve eritrositleri deforme ettikleri gözlenmiştir. Tamamen gelişmiş eritrositik merontlar ve gametositlerin ise enfekte eritrositlerdeki sitoplazmik alanın yarısından fazlasını işgal ettikleri, ancak eritrositlerdeki mevcut sitoplazmik alanı kaplamadıkları belirlenmiştir. Eritrositik meronttaki merozoitlerin sayısının, genellikle 10 ile 24 arasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca gametositlerdeki pigment granüllerinin yuvarlak veya oval olduğu ve genellikle sitoplazma boyunca rastgele dağıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, PADOM02 nesline ait eritrositik gelişim formları, *P. relictum* olarak identifiye edilmiştir.

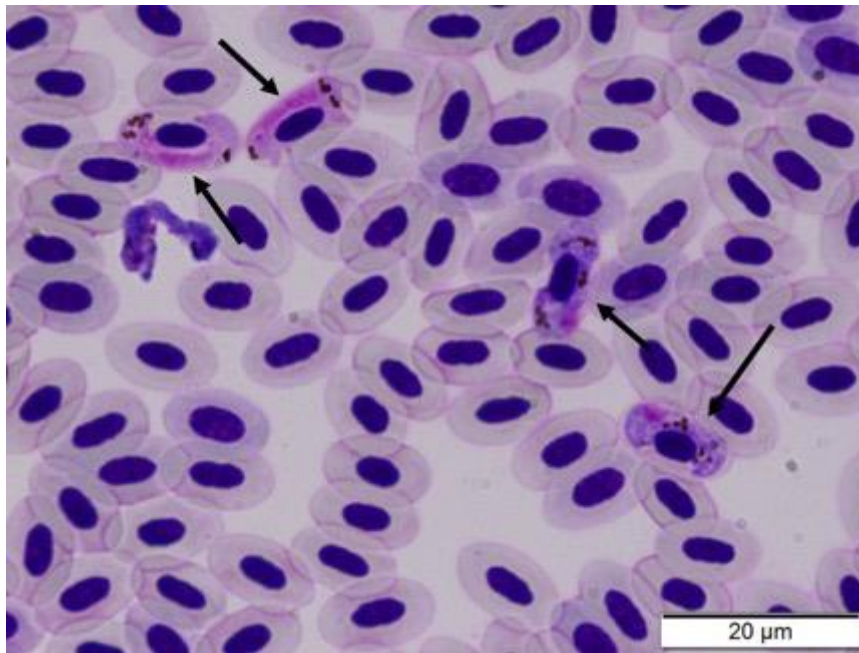


**Şekil 4.16** *Plasmodium relictum*'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

### 3- Kanatlı Türü: *Acrocephalus palustris*

#### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi*/MW1

*Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 1-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



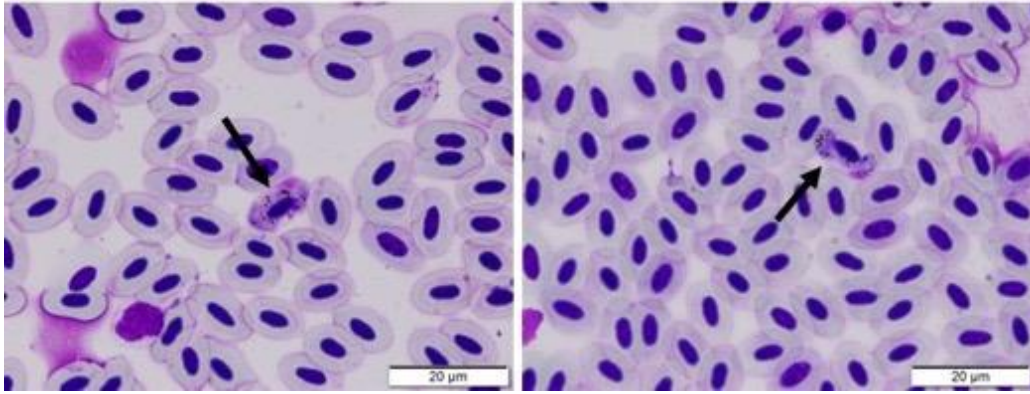
**Şekil 4.17** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler)

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./GRW05***

Başlık 1-b'de *Haemoproteus belopolskyi* olarak morfolojik identifikasyonu yapılan GRW05 nesli, *A. palustris*'e ait kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./MW3* (yeni tanımlanan nesil),  
(Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus belopolskyi*)**

Başlık 1-b'de verilen *Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen MW3 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. belopolskyi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.18).

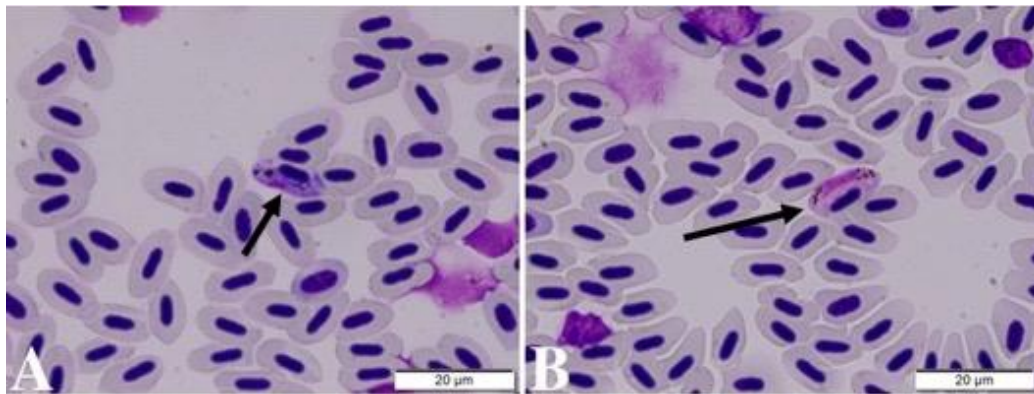


**Şekil 4.18** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri (makrogametositler)

**4- Kanatlı Türü: *Acrocephalus schoenobaenus***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi/SW1***

*Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 1-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.19** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

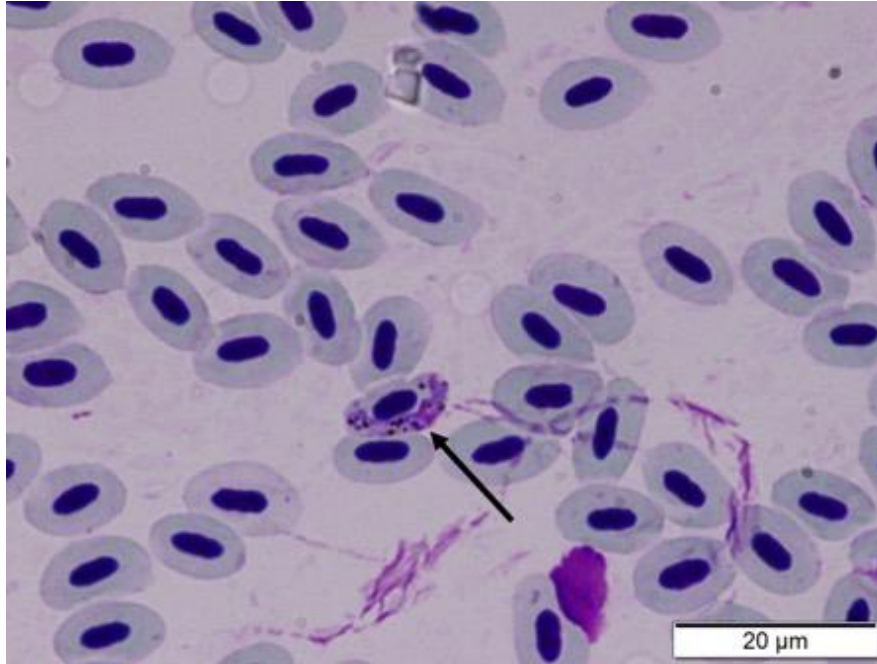


**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi*/SW3**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium homonucleophilum*/SW2**

*Plasmodium homonucleophilum*'un gelişmiş ve olgun merontlarının hemen hepsinin enfekte eritrositlerin çekirdeklerine yapıştıkları gözlenmiştir. Pigment granüllerinin daima katı bir kütle halinde toplandıkları ve genellikle olgun merontlarda parazit marjinine yakın bir konumda bulundukları tespit edilmiştir. Gametositlerin uzamış bir şekilde bulundukları ve ana hatlarının düzensiz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gametositlerin genellikle enfekte eritrositlerin çekirdeklerine yapışmadıkları, ancak nadiren amoboid gelişim şekilleriyle çekirdeklere dokunabildikleri tespit edilmiştir. Bunun yanında olgun gametositlerin, eritrositleri kutuplarına kadar doldurmadıkları, ancak eritrosit çekirdeğini uçları ile çevreleme eğiliminde bulundukları gözlenmiştir (Şekil 4.20).



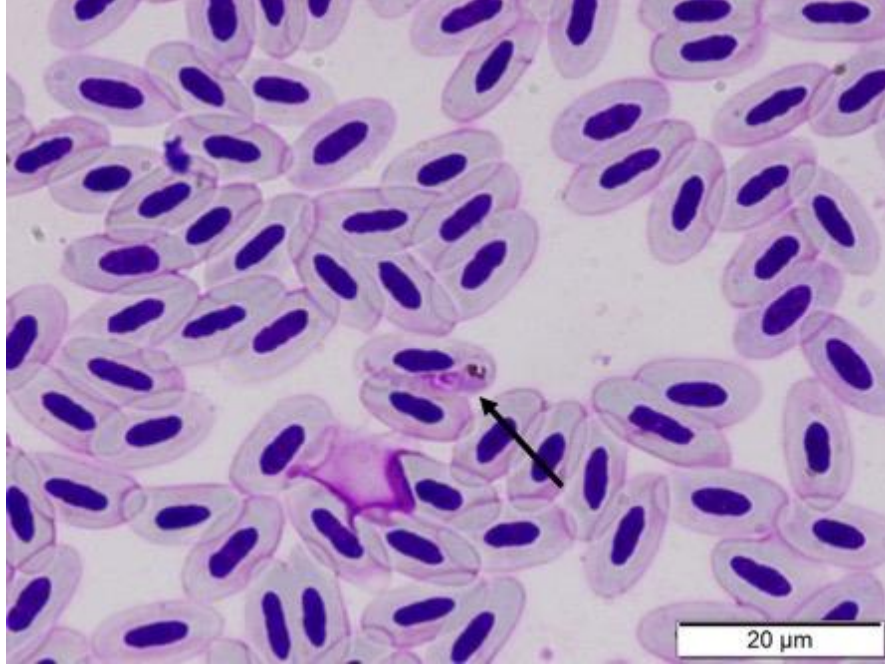
**Şekil 4.20** *Plasmodium homonucleophilum*'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium ashfordi*/GRW02**

*Plasmodium ashfordi*'nin gametositlerindeki pigment granüllerinin, gametositler içerisinde genellikle terminal olan belirgin bir bölgede toplandığı gözlenmiştir. Ayrıca makrogametositlerin kaba granüler sitoplazma ve dağınık çekirdekler içerdiği



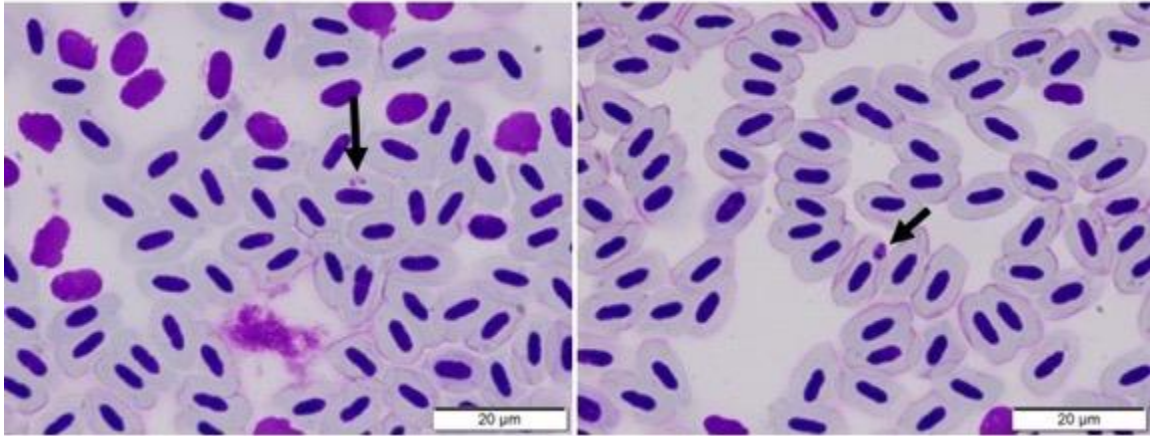
mikrogametositlerin ise çekirdeklerinin nispeten daha kompakt bir yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21** *Plasmodium ashfordi*'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit)

**e) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium elongatum*/GRW06**

*Plasmodium elongatum*'un aseksüel evrelerinin esasen genç eritrositlerde, gametositlerin ise genellikle olgun eritrositlerde gelişim gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.22). Tamamen gelişmiş gametositlerin, enfekte eritrosit çekirdeklerinin yerini değiştirmedikleri veya yalnızca hafifçe yerinden oynattıkları ve eritrositlerin kutuplarını tamamen doldurmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca olgun eritrositik merozoitlerin birçoğunun uzamış bir şekilde olduğu tespit edilmiştir.

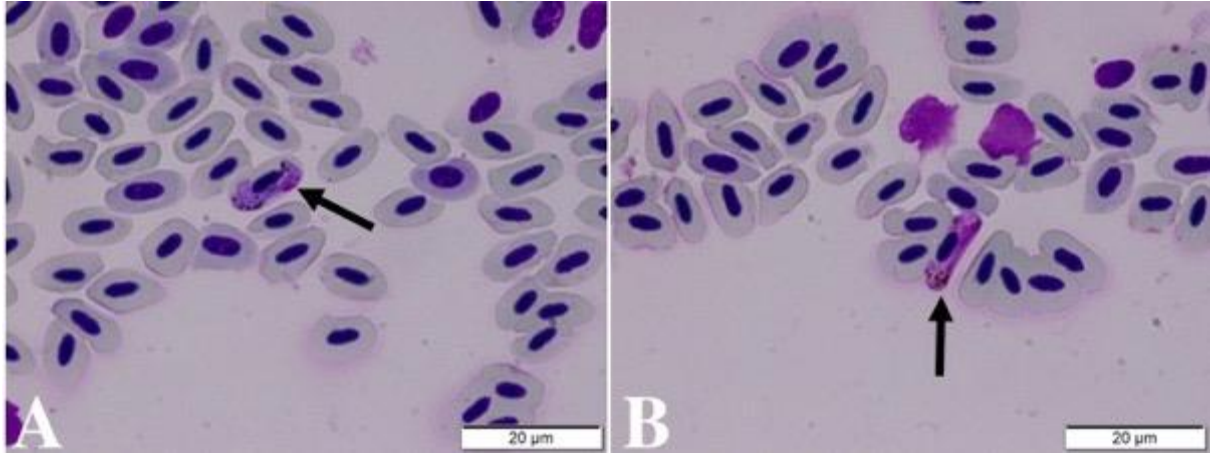


**Şekil 4.22** *Plasmodium elongatum*'un eritrositik gelişim dönemleri (trofozoitler)

##### 5- Kanatlı Türü: *Acrocephalus scirpaceus*

###### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi*/ARW1

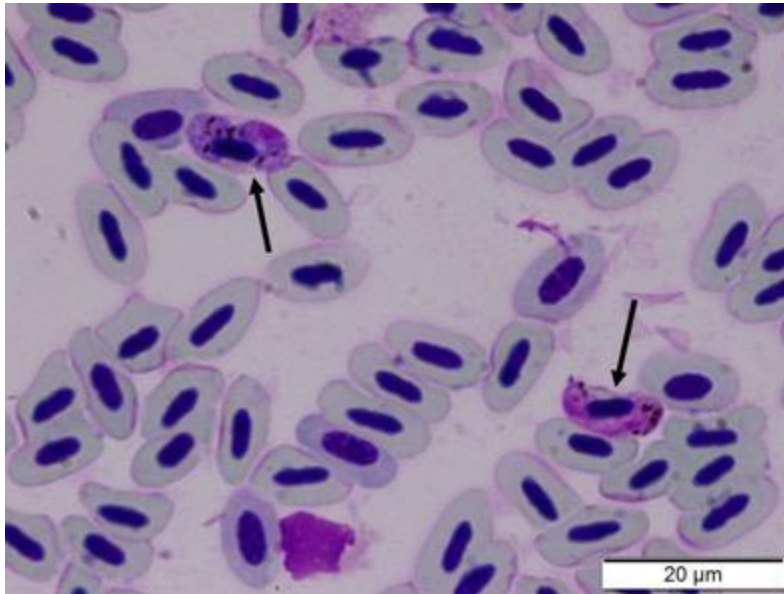
*Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 1-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.23** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

###### b) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi*/SW1

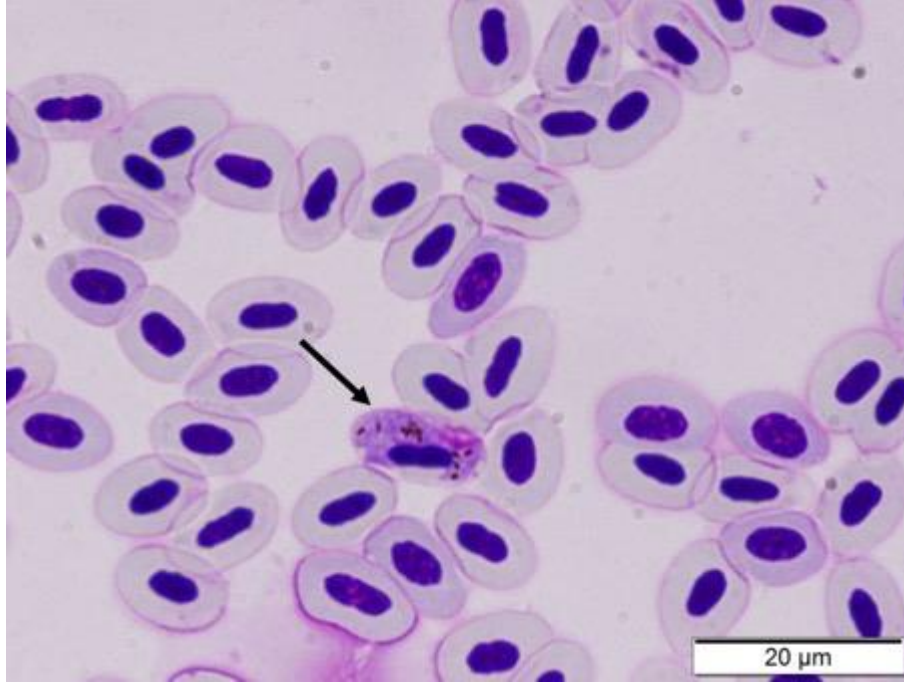
*Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 1-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.24** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametosit)

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus belopolskyi*/MW1**

*Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 1-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemi Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

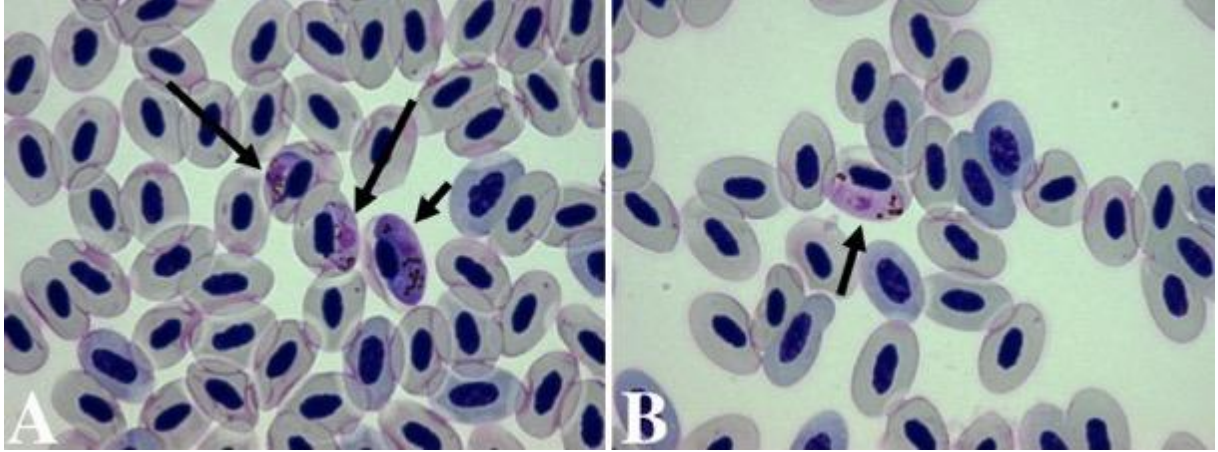


**Şekil 4.25** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit)

**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus payevskyi*/RW1**

*Haemoproteus payevskyi* gametositlerinin, enfekte eritrositlerin çekirdeğini hafifçe yerinden oynattıkları ve çekirdek boyunca geliştikleri tespit edilmiştir. Ancak gametositlerin çekirdeği tamamen çevrelemedikleri gözlenmiştir. Orta ve tamamen gelişmiş gametositlerin, eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine sıkıca tutunduğu ve genellikle kutuplarına kadar eritrositleri doldurmadıkları belirlenmiştir. Makrogametositlerdeki çekirdeğin genellikle ortada yer aldığı ve mikrogametositlerin çekirdek büyüklüğünün makrogametositlerin çekirdeğini aşmadıkları (bu özellik bu türün önemli bir spesifik karakteridir) tespit edilmiştir. Tamamen gelişen makrogametositlerin çoğunluğunun, dağınık pigment granülü kümelerini içerdiği ve kümelerden her birinin makrogametositlerin yakınında bulunduğu görülmüştür. Pigment granüllerinin küçük-orta boyutta olduğu ve ortalama olarak gametosit başına yaklaşık 12 pigment granülü bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26).





**Şekil 4.26** *Haemoproteus payevskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Genç gametositler ve makrogametosit; B: Mikrogametosit

**e) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus palloris*/WW1**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**f) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus passeris*/PADOM05**

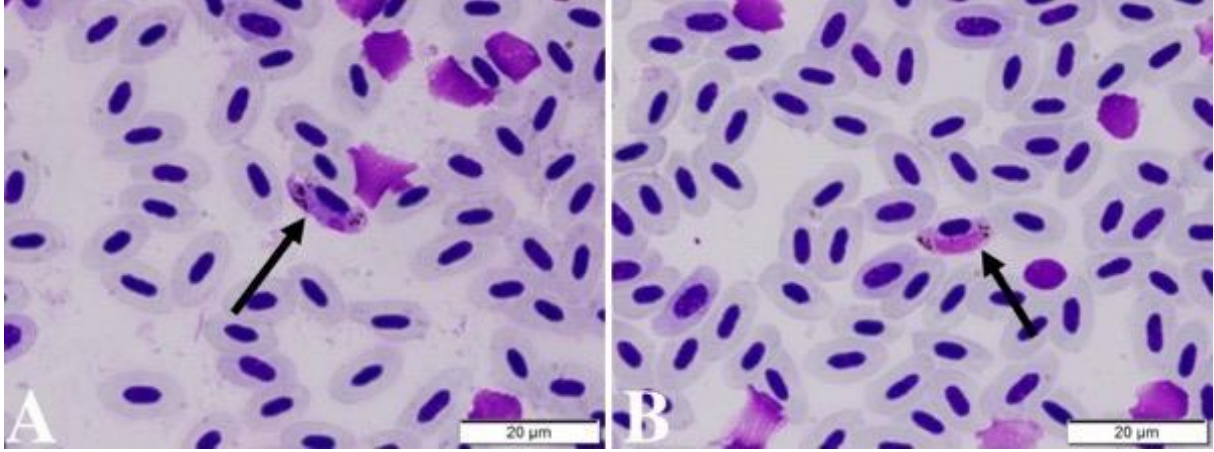
Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**g) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus nucleocondensus*/GRW01**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**h) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./ACDUM2 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus belopolskyi*)**

Başlık 1-b'de verilen *Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen ACDUM2 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. belopolskyi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.27).



**Şekil 4.27** *Haemoproteus belopolnyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

**i) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./RW4* (yeni tanımlanan nesil)**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**j) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium sp./RTSR1***

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**k) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon sp./ACSCI01* (yeni tanımlanan nesil)**

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**l) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon sp./REB11***

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

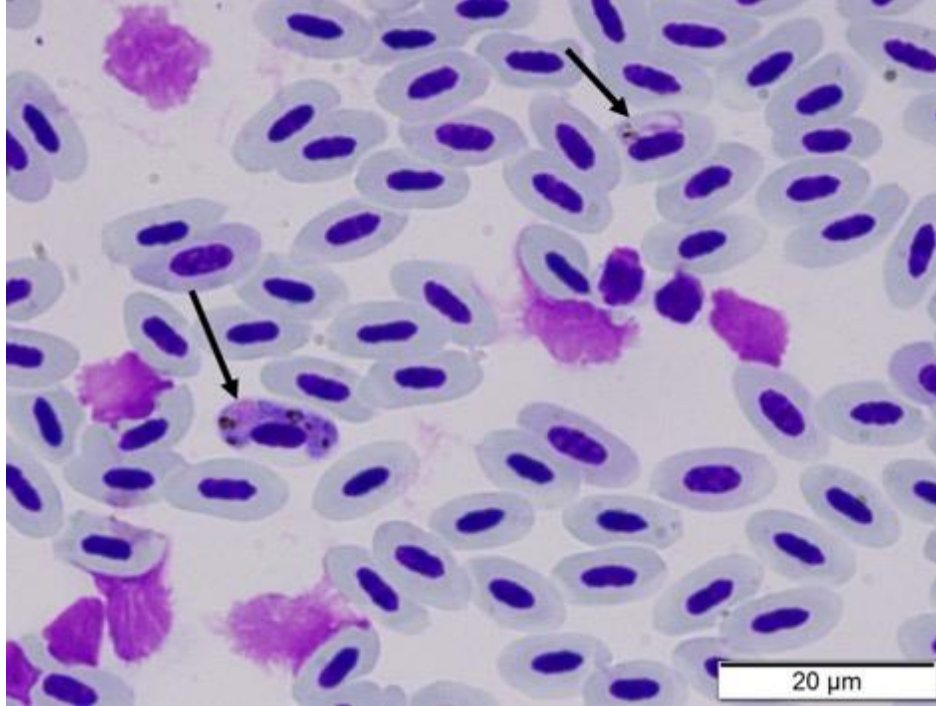
**6- Kanatlı Türü: *Chloris chloris***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium relictum/SGS1***

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./CARCHL01* (yeni tanımlanan nesil) (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus fringillae*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin enfekte eritrosit çekirdeği boyunca gelişim gösterdiği ancak çekirdeği çevrelemedikleri gözlenmiştir. Ayrıca gametositlerin çekirdeği kaydırarak az da olsa yerinden oynatabildikleri ve çekirdeğe yapışarak eritrositin bir kısmını doldurduğu görülmüştür. Büyümekte olan makrogametositler arasında dambıl şekilliler baskın bir şekilde gözlenirken mikrogametositlerde bu yapılara pek rastlanılmamıştır. Olgun makrogametositlerin çoğunlukla eritrositleri kutuplarına kadar doldurmadıkları tespit edilmiştir. Pigment granüllerinin genellikle orta büyüklükte ve 14 civarında oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.28). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, CARCHL01 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. fringillae* olarak tanımlanmıştır.

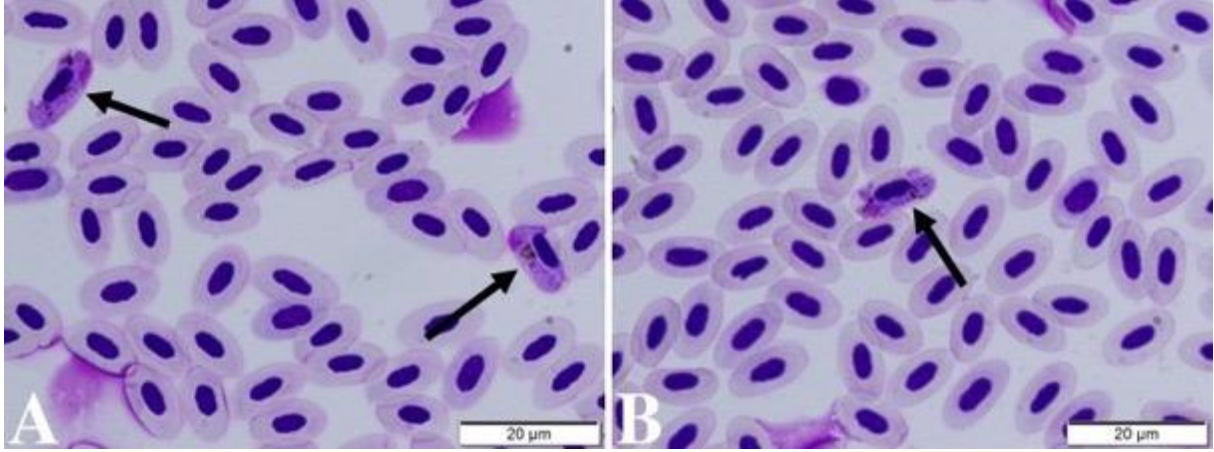


**Şekil 4.28** *Haemoproteus fringillae*'nin eritrositik gelişim dönemleri (genç gametosit ve makrogametosit).

**7- Kanatlı Türü: *Iduna pallida***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./HIP2* (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus belopolskyi*)**

Başlık 1-b'de verilen *Haemoproteus belopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen HIP2 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. belopolskyi* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.29).



**Şekil 4.29** *Haemoproteus belopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon sp./IDUPAL01* (yeni tanımlanan nesil)**

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

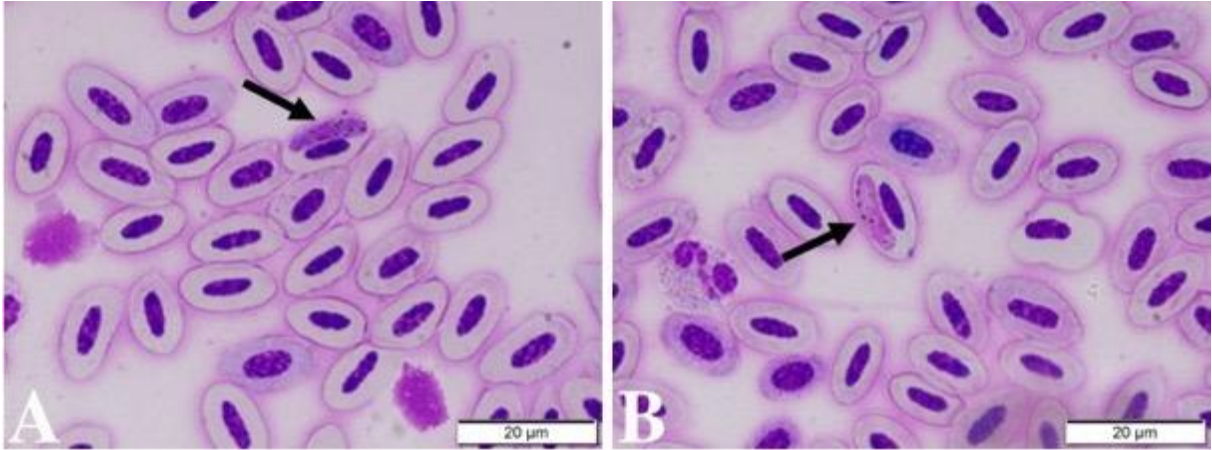
**8- Kanatlı Türü: *Ixobrychus minutus***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium sp./CXPIP23***

CXPIP23 nesli moleküler olarak *Plasmodium* soyunda karakterize edilmiş olmasına karşın bu nesle ait eritrositik gelişim formları daha çok *Haemoproteus* gametositlerine benzer bulunmuştur. Giemsa boyalı ince yayma frotilerde olgun gametositlerin enfekte eritrosit çekirdeklerini genellikle yerinden oynatmadığı ancak bazen de oynatabildiği tespit edilmiştir. Ayrıca gametositlerin çekirdeğin çevresini asla tam olarak sarmadığı ve eritrosit kutuplarını doldurmadığı da gözlenmiştir. Pigment granüllerinin belirgin ve küçük-orta büyüklükte olduğu ve ortalama 10 civarında seyrettiği belirlenmiştir (Şekil 4.30).

Tespit edilen bu morfolojik özellikler daha önce *I. minutus*'dan tanımlanan *H. herodiadis*'in özelliklerine yakın olsa da pigment granüllerinin belirgin olması nedeniyle bu türden morfolojik olarak farklı olduğu düşünülmüştür. Nitekim, Litvanya Doğa Araştırma Merkezi'nde görev yapmakta olan ve proje çalışmalarında iş birliği içinde olduğumuz Prof. Dr. Gediminas VALKIUNAS'da bu morfolojik bulguları doğrulamıştır.





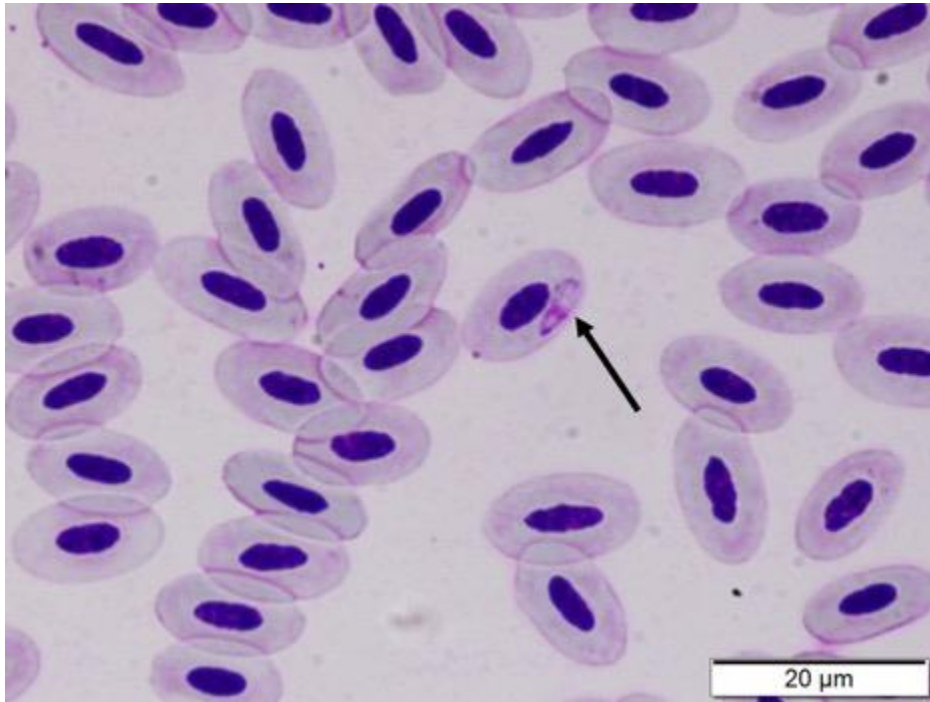
**Şekil 4.30** CXPIP23 (*Plasmodium* sp.) eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium* sp./IXOMIN02 (yeni tanımlanan nesil)**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium* sp./IXOMIN03 (yeni tanımlanan nesil)**

CXPIP23 nesli ile aynı morfolojik özellikleri sergileyen bu nesle ait eritrositik gelişim formlarının özellikleri başlık 8-a'de verilmiş olup ilgili formlar Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.31** IXOMIN03 (*Plasmodium* sp.) eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit).



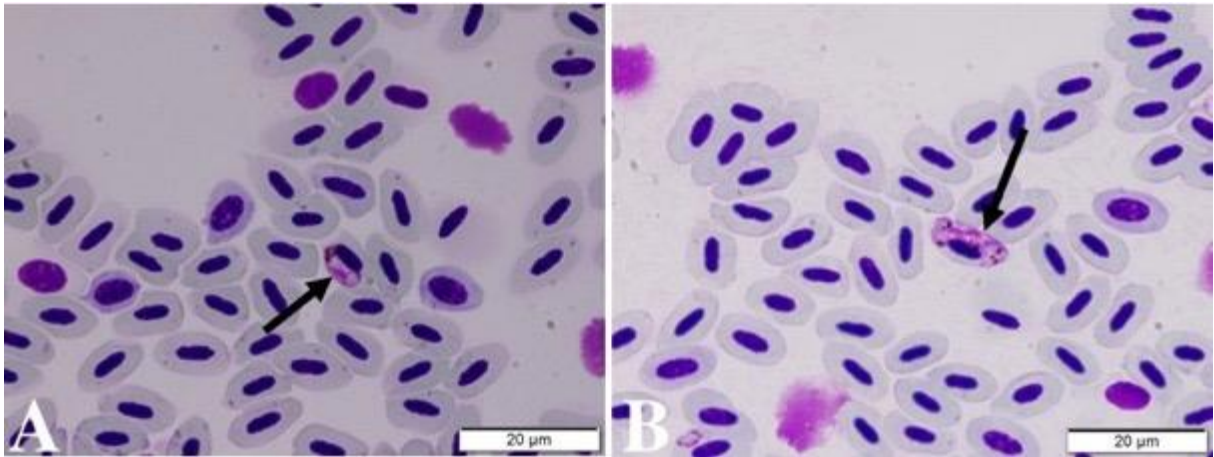
**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./CIAE02**

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**9- Kanatlı Türü: *Lanius collurio***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus lanii*/RBS4**

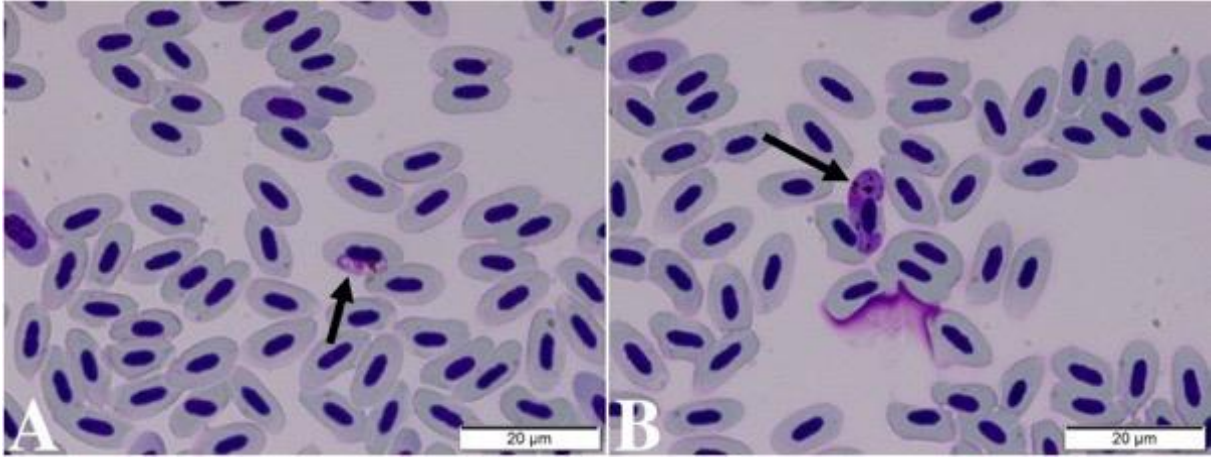
*Haemoproteus lanii* gametositlerinin enfekte eritrositlerin çekirdeğinin çevresinde geliştiği ve bazen çekirdeği tamamen kuşattığı gözlenmiştir. Ayrıca genç gametositlerin, enfekte eritrositlerin çekirdeğine sıkıca tutunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Makrogametositlerin çekirdeğinin ortada ve genellikle eritrosit çekirdeğiyle sıkıca yapışmış halde olduğu görülmüştür. Pigment granüllerinin orta (0.5-1.0 µm) ve büyük (1.0-1.5 µm) boyutta olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.32).



**Şekil 4.32** *Haemoproteus lanii*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Genç gametosit; B: Mikrogametosit

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus lanii*/RB1**

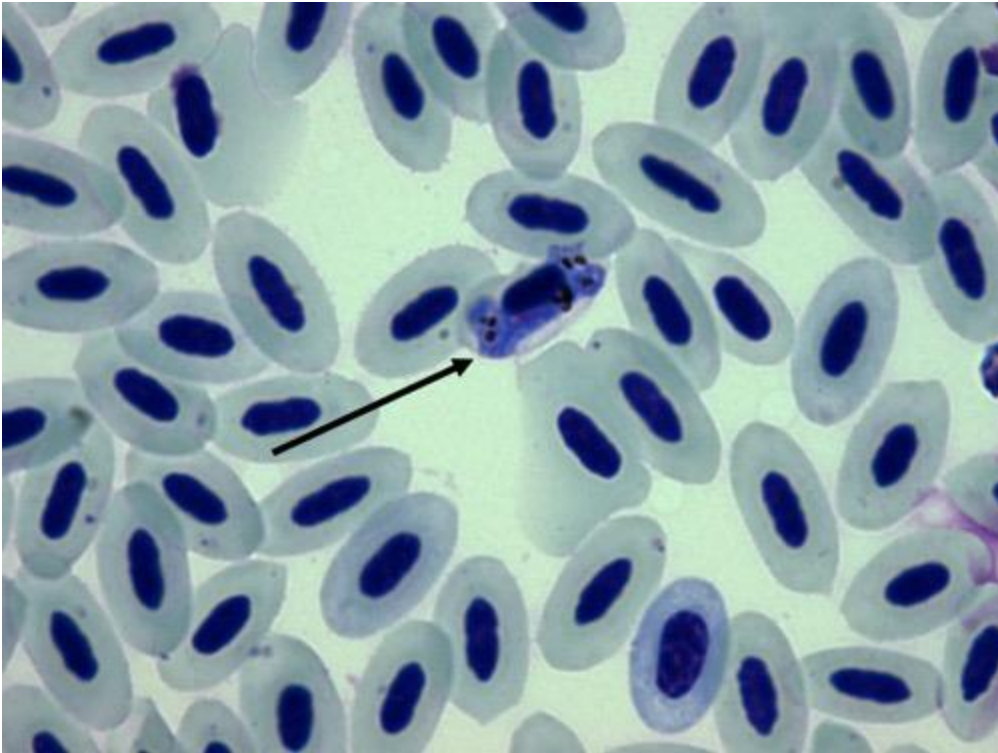
*Haemoproteus lanii*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 9-a'da verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.33'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.33** *Haemoproteus lanii*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Genç gametosit; B: Makrogametosit

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./RBS5* (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus lanii*)**

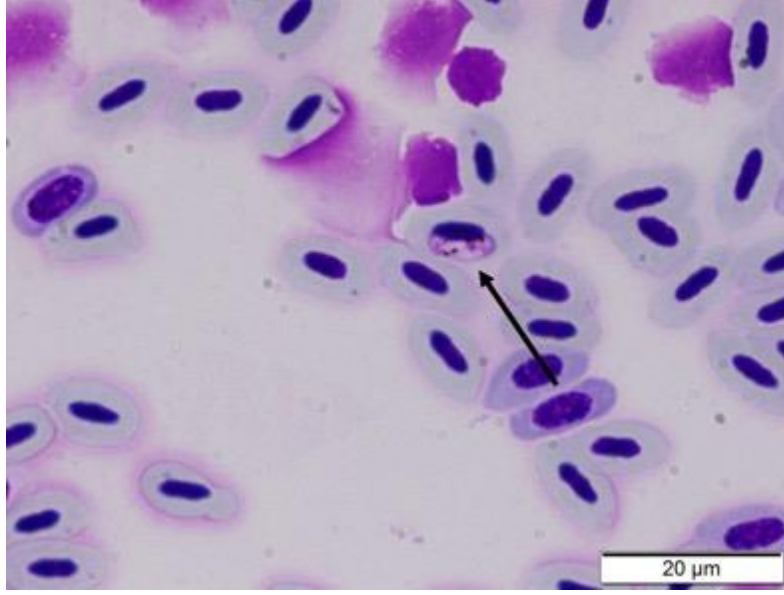
Başlık 9-a'da verilen *Haemoproteus lanii*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen RBS5 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. lanii* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34** *Haemoproteus lanii*'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit), (x100)

**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./RBS6* (yeni tanımlanan nesil),  
(Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus lanii*)**

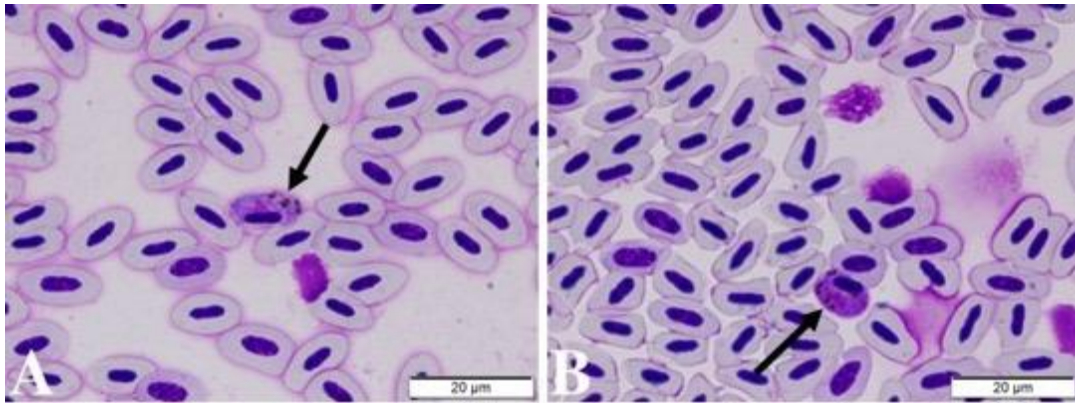
Başlık 9-a'da verilen *Haemoproteus lanii*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen RBS6 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. lanii* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.35).



**Şekil 4.35** *Haemoproteus lanii*'nin eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit)

**e) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./RBS7* (yeni tanımlanan nesil),  
(Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus lanii*)**

Başlık 9-a'da verilen *Haemoproteus lanii*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen RBS7 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. lanii* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.36).

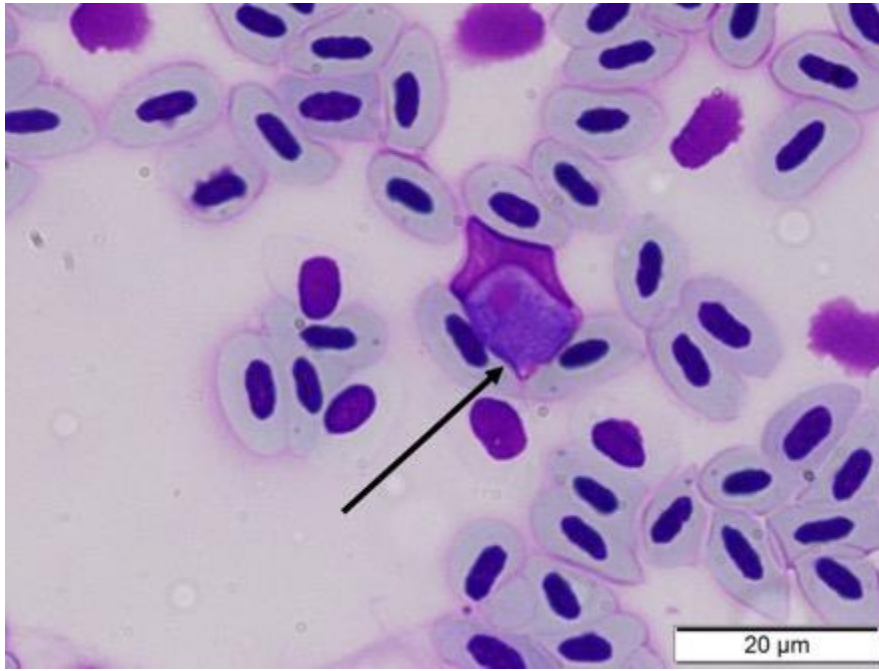


**Şekil 4.36** *Haemoproteus lanii*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler



**f) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon sp./BT5* (Morfolojik identifikasyon: *Leucocytozoon balmoralis*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin yuvarlak ve iğsi konak hücrelerinde gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. İğsi konak hücrenin nükleusunun şapka benzeri bir yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.37). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, BT5 nesline ait gelişim formları, *L. balmoralis* olarak tanımlanmıştır.

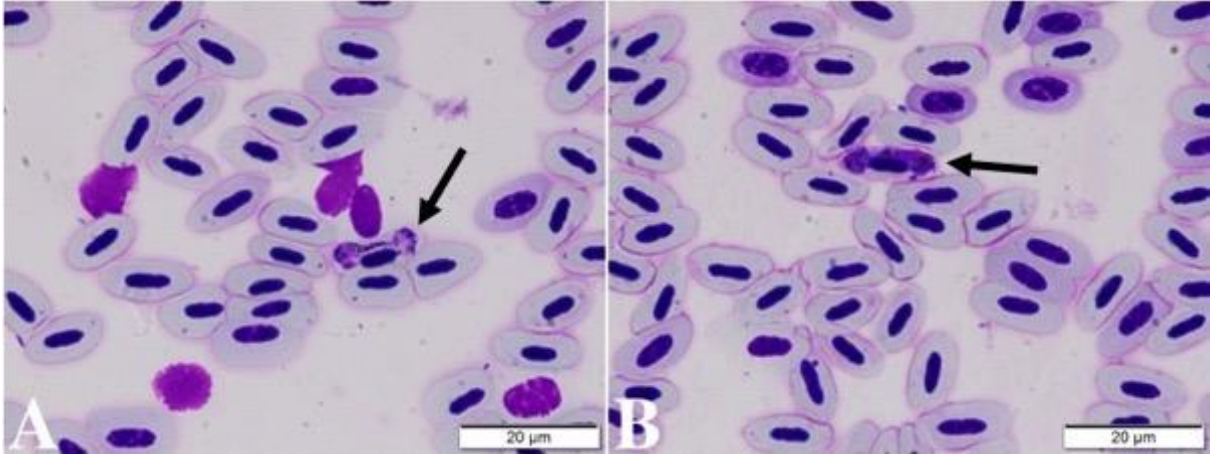


**Şekil 4.37** *Leucocytozoon balmoralis*'nin gelişim dönemi (makrogametosit).

**10- Kanatlı Türü: *Luscinia luscinia***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus attenuatus/ROBIN1***

*Haemoproteus attenuatus* gametositlerinin enfekte eritrosit çekirdeklerinin çevresinde geliştiği fakat tamamen kuşatmadığı gözlenmiştir. Bunun yanında gametositlerin eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştığı belirlenmiştir. Gelişen gametositlerin arasında dambıl şeklindeki gametositler baskın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.38). Ayrıca genişliği 1 µm'den az olan zayıflatılmış orta büyüklükte mikrogametositleri mevcut olduğunda görülmüştür.

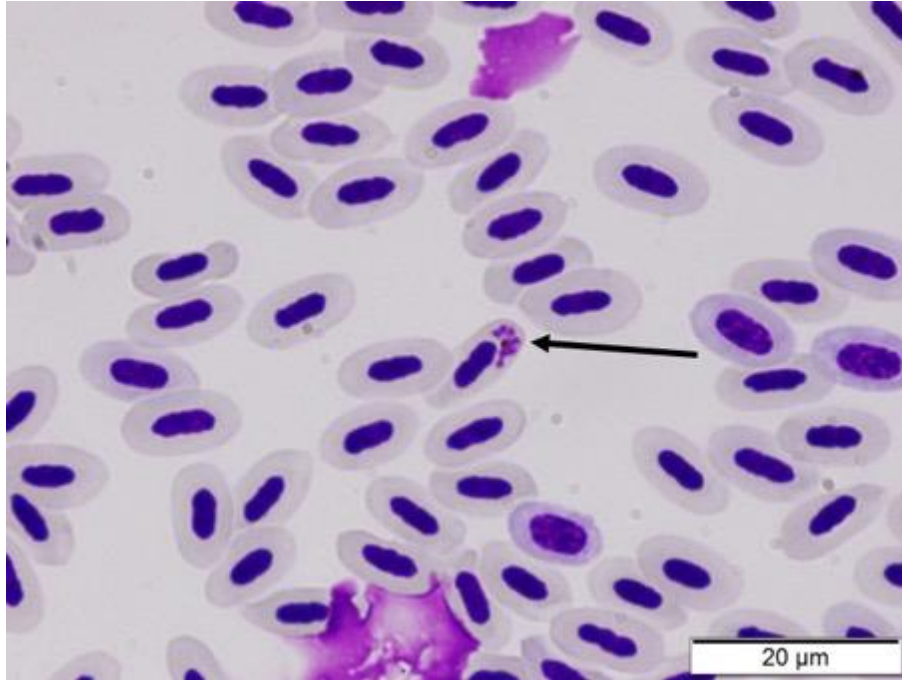


**Şekil 4.38** *Haemoproteus attenuatus*'un eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler

#### 11- Kanatlı Türü: *Luscinia svecica*

##### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Plasmodium homonucleophilum*/SW2

*Plasmodium homonucleophilum*'a ait morfolojik tanımlamalar başlık 4-c'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.39'da gösterilmiştir.

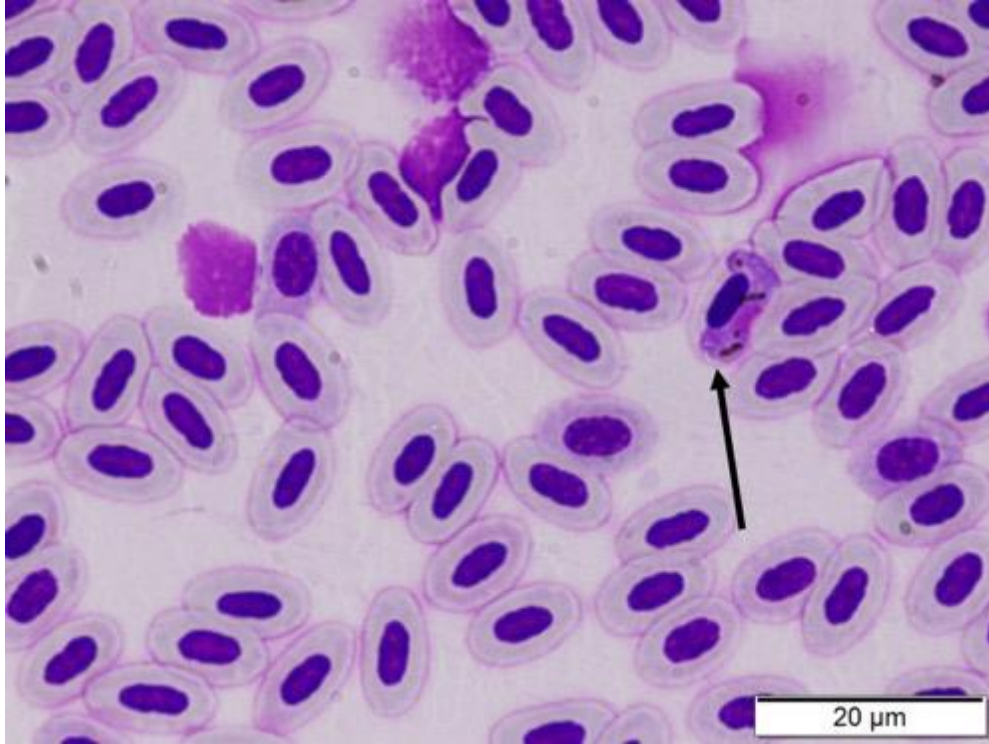


**Şekil 4.39** *Plasmodium homonucleophilum*'un eritrositik gelişim dönemi (meront)

## 12- Kanatlı Türü: *Motacilla alba*

### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus motacillae*/YWT2

*Haemoproteus motacillae* gametositlerinin enfekte eritrositlerin çekirdeğinin çevresinde geliştiği fakat tamamen kuşatmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca gametositlerin, eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştığı gözlenmiştir. Makrogametositlerde genellikle dambıl şeklindeki yapıların daha baskın olduğu, ameboid şekilli gametositlerin ise daha nadir görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4. 40). Tamamen gelişen gametositlerin, eritrositlerin çekirdeği ve yüzeyine sıkıca tutunduğu ve eritrositleri tamamen doldurdukları görülmüştür. Orta büyüklükteki gametositlerde çubuk benzeri büyük (1.0 ila 1.5  $\mu$ m) pigment granülleri ortaya çıktığı ve bunların daha yoğun olarak gelişmiş gametositlerde bulunduğu tespit edilmiştir.

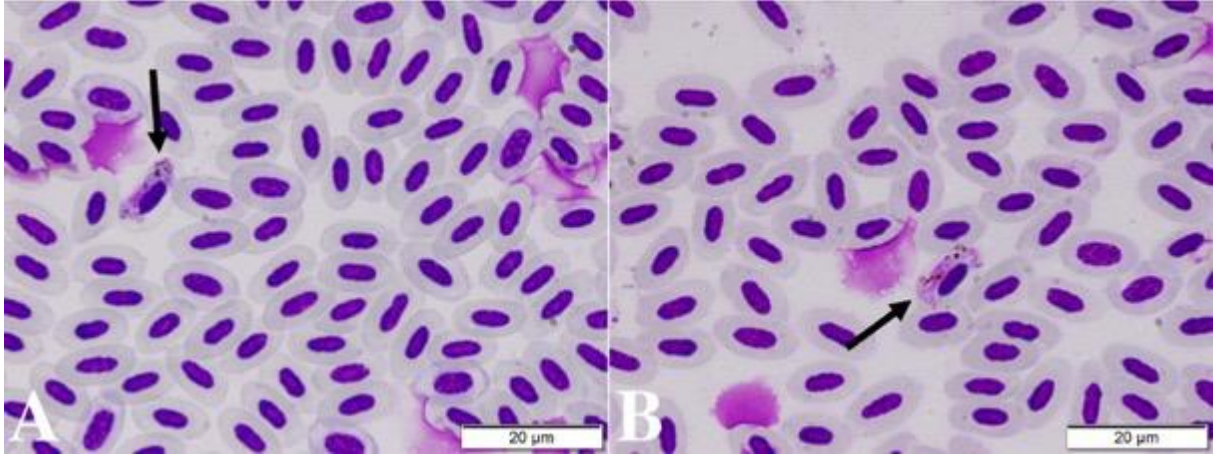


Şekil 4.40 *Haemoproteus motacillae*'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

## 13- Kanatlı Türü: *Motacilla flava*

### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus motacillae*/YWT1

*Haemoproteus motacillae*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 12-a'da verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.41** *Haemoproteus motacillae*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

#### 14- Kanatlı Türü: *Panurus biarmicus*

##### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus palloris*/WW1

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

##### b) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp.*/GRW05

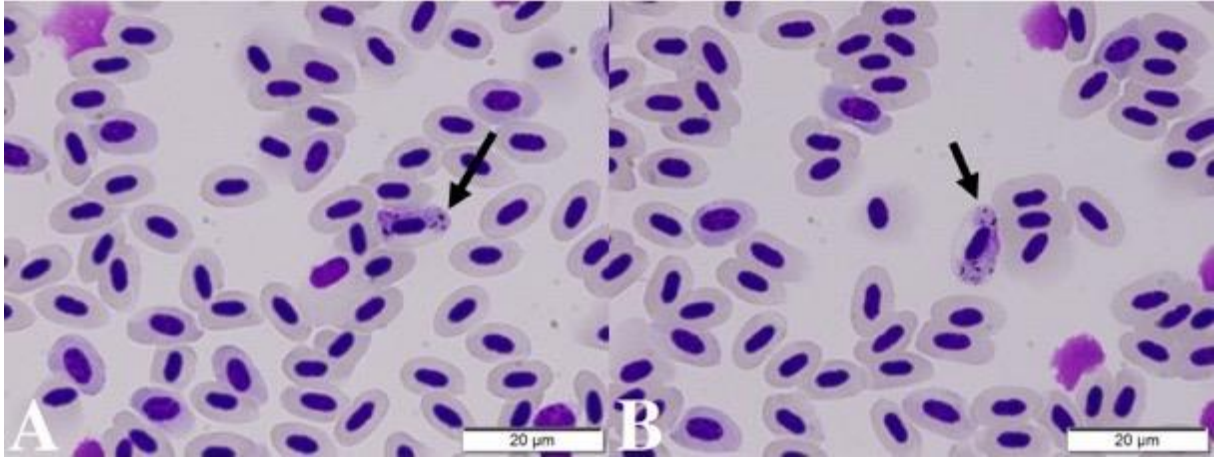
Başlık 1-b'de *Haemoproteus belopolskyi* olarak morfolojik identifikasyonu yapılan GRW05 nesli, *P. biarmicus*'a ait kan frotilerinde tespit edilememiştir.

#### 15- Kanatlı Türü: *Passer domesticus*

##### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus passeris*/PADOM05

*Haemoproteus passeris* gametositlerinin enfekte eritrosit çekirdeğinin çevresinde geliştiği fakat tamamen kuşatmadığı görülmüştür. Genç ve olgun gametositlerin, eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştığı gözlenmiştir. Makrogametositlerde genellikle dambıl şeklindeki yapıların daha baskın olduğu tespit edilmiştir. Tamamen gelişmiş gametositlerin, eritrosit çekirdeği ve yüzeyine sıkı sıkıya tutunduğu, eritrositleri kutuplarına kadar doldurduğu ve çekirdeğini yana doğru yerinden oynattıkları belirlenmiştir. Çok sayıda genç gametositin, eritrositlerin yüzeyine sıkı sıkıya tutunduğu ve eritrosit çekirdeğine doğru gelişim gösterdiği gözlenmiştir. Pigment granüllerinin genellikle orta (0.5-1.0 µm) ve bazen küçük (<0.5 µm) boyutta ve ortalama 10 adet olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.42).

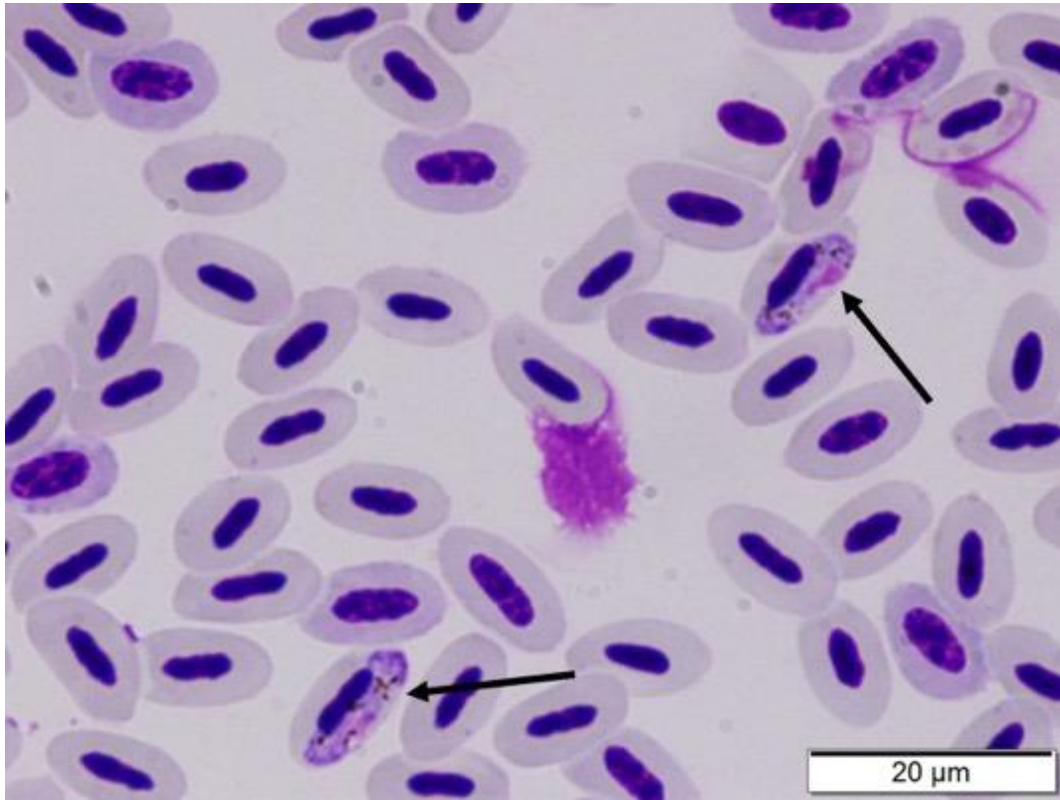




**Şekil 4.42** *Haemoproteus passeris*'in eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./PADOM03 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus passeris*)**

Başlık 15-a'da verilen *H. passeris*'e ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen PADOM03 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. passeris* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.43).

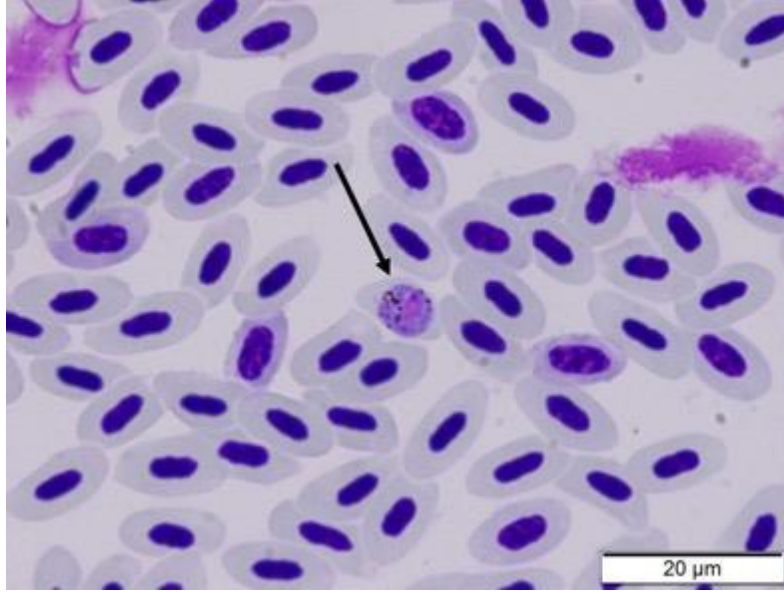


**Şekil 4.43** *Haemoproteus passeris*'in eritrositik gelişim dönemleri (makrogametositler)



**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium relictum*/SGS1**

*Plasmodium relictum*'a ait morfolojik tanımlamalar başlık 2-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.44'de gösterilmiştir.

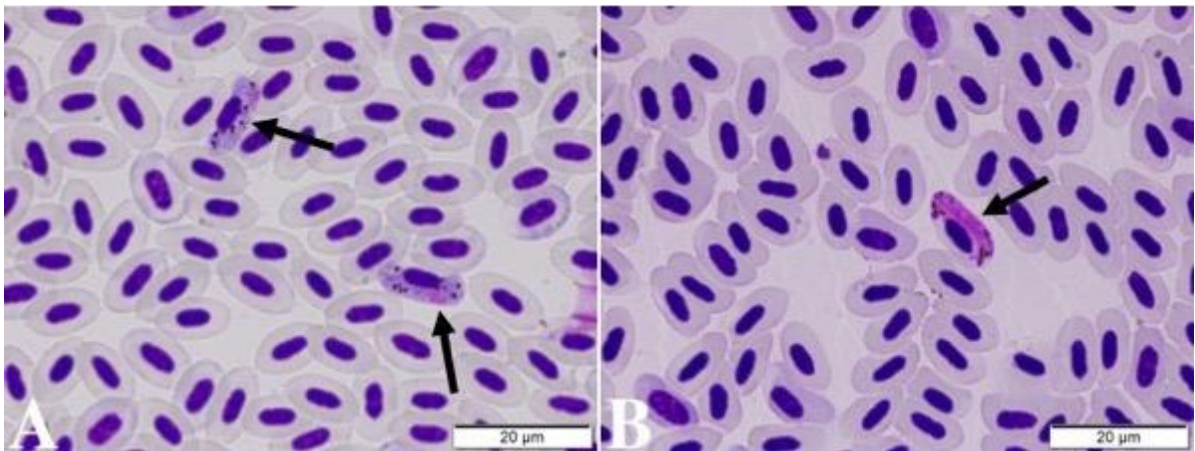


**Şekil 4.44** *Plasmodium relictum*'un eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

**16- Kanatlı Türü: *Passer hispaniolensis***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus passeris*/PADOM05**

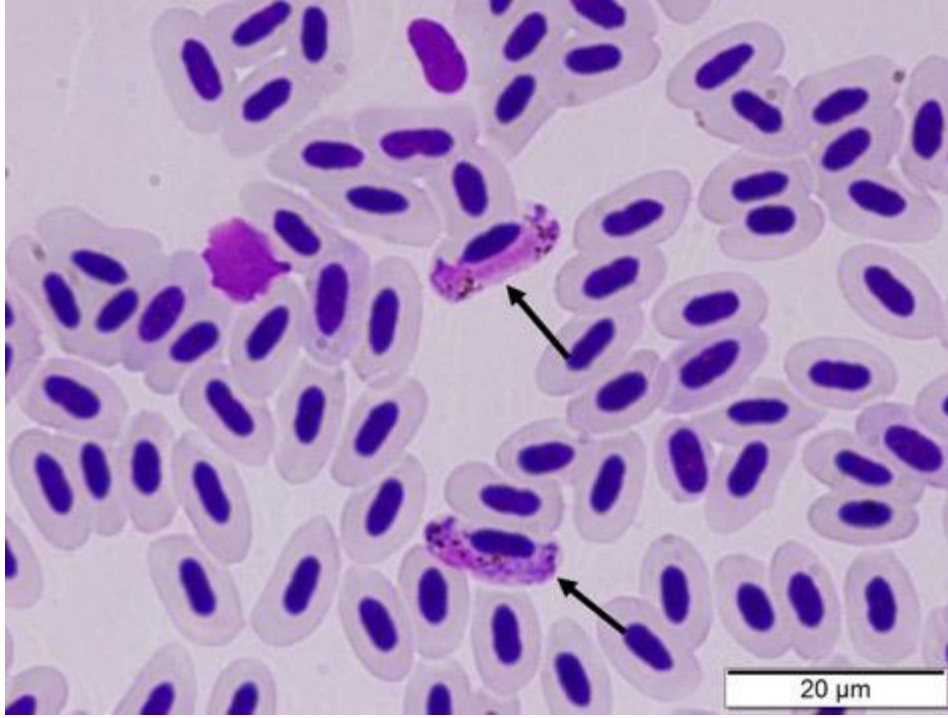
*Haemoproteus passeris*'e ait morfolojik tanımlamalar başlık 15-a'da verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.45'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.45** *Haemoproteus passeris*'in eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametositler; B: Mikrogametosit

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./PADOM03 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus passeris*)**

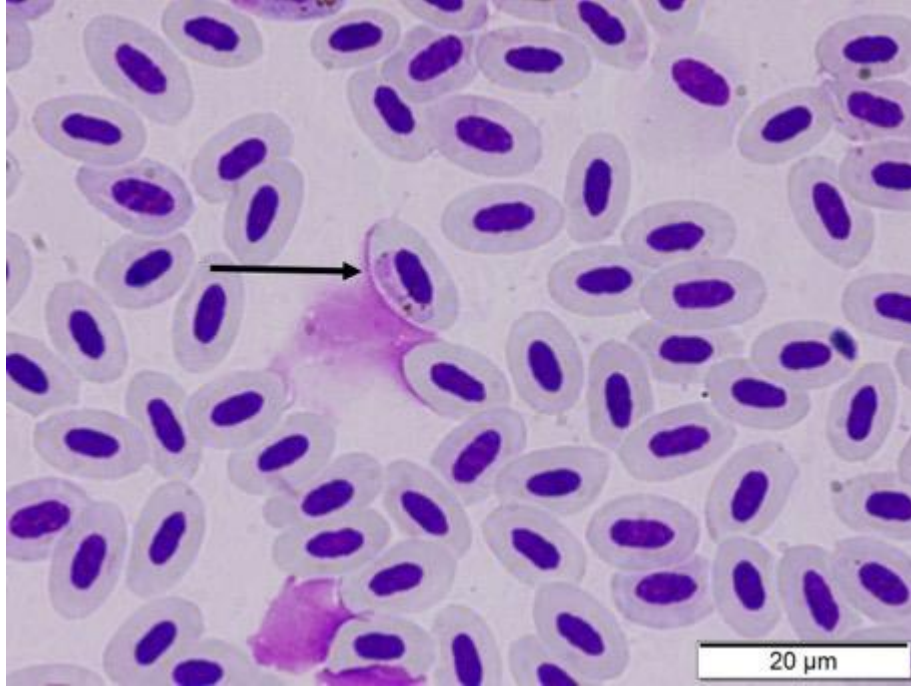
Başlık 15-a'da verilen *H. passeris*'e ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen PADOM03 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. passeris* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.46).



**Şekil 4.46** *Haemoproteus passeris*'in eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler)

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./PAHIS2 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus paranucleophilus*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde genç gametositlerin eritrosit çekirdeklerine sıkı bir şekilde tutunduğu ancak eritrositlerin kenar boşluklarını tamamen doldurmadıkları gözlenmiştir. Makrogametositlerin, eritrositlerin çekirdekleri etrafında, ince halteridial veya hafif düzensiz bir şekilde yerleştikleri belirlenmiştir. Eritrositlerin çekirdeklerine sıkı bir şekilde yapışmış ve  $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplamış gametositlerin, çekirdekleri hafifçe yerinden oynattıkları tespit görülmüştür. Olgun gametositlerin diğer türlere kıyasla eritrosit uçlarını doldurmadıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.47). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, PAHIS2 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. paranucleophilus* olarak identifiye edilmiştir.



**Şekil 4.47** *Haemoproteus paranucleophilus*'un eritrositik gelişim dönemi (genç gametosit)

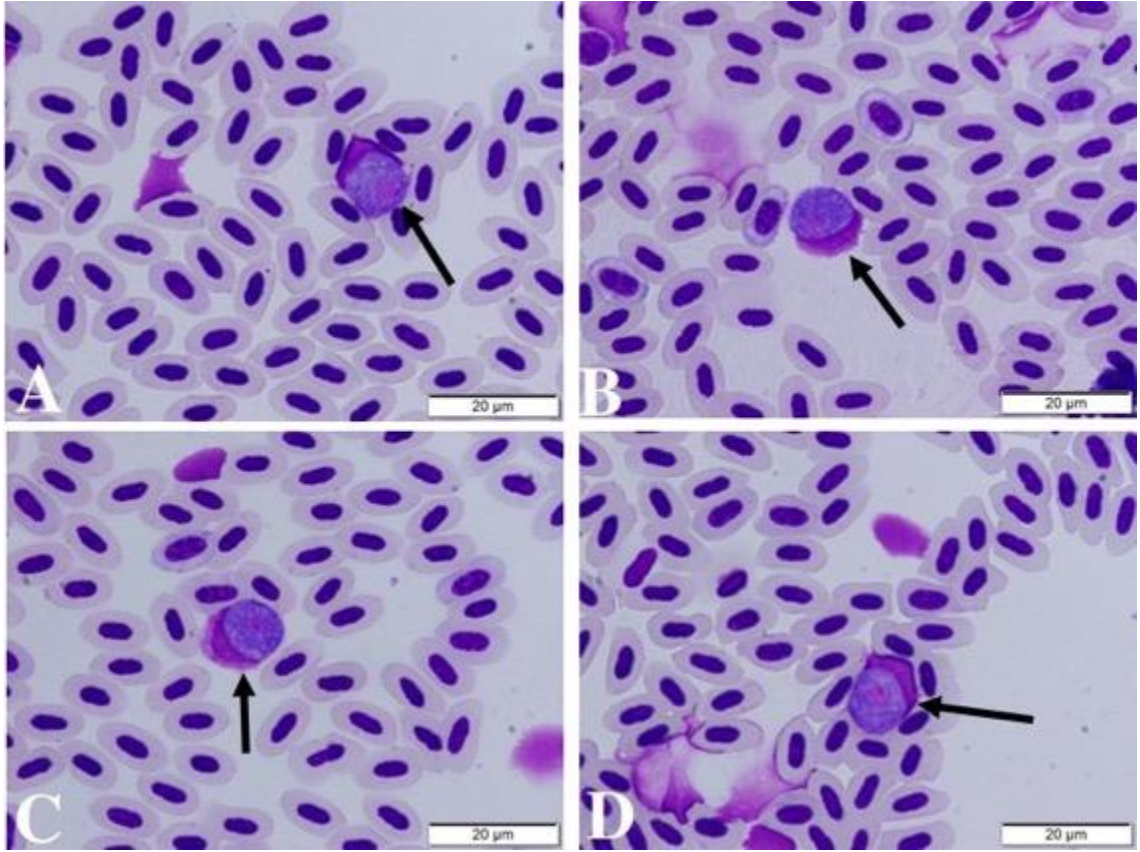
**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./PAHIS03 (yeni tanımlanan nesil)**

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**e) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./RECOB3 (Morfolojik identifikasyon: *Leucocytozoon sakharoffi*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin yuvarlak konak hücrelerinde gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Konak hücrenin nükleusunun şapka benzeri veya band benzeri bir yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.48). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, RECOB3 nesline ait gelişim formları, *L. sakharoffi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.48).



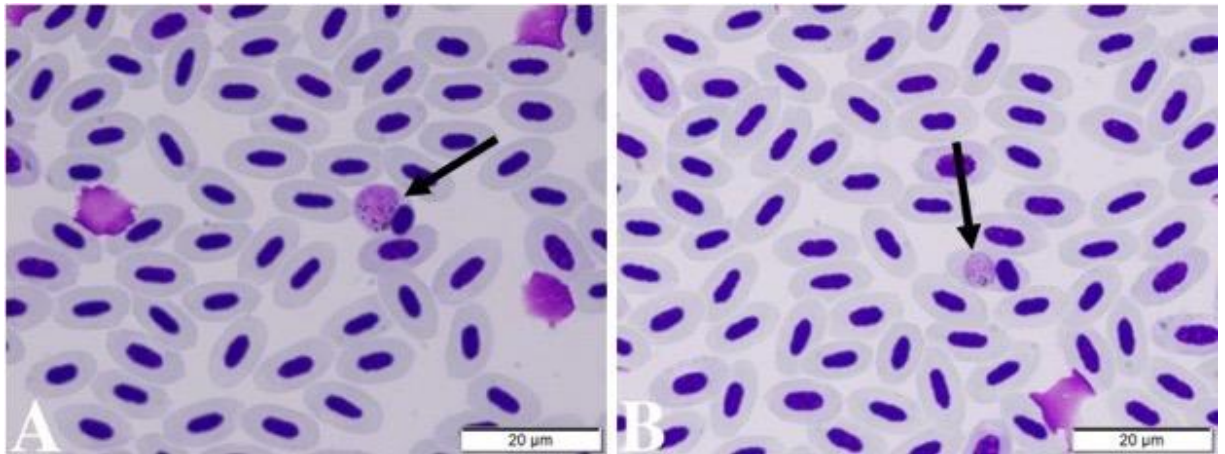


**Şekil 4.48** *Leucocytozoon sakharoffi*'nin gelişim dönemleri. A-D: Makrogametositler

#### 17- Kanatlı Türü: *Passer montanus*

##### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Plasmodium relictum*/SGS1

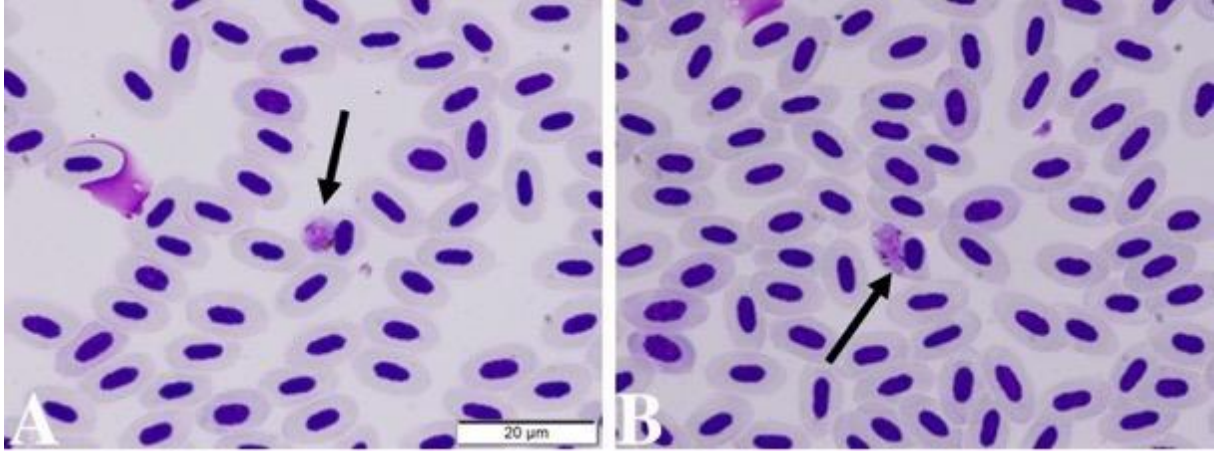
*Plasmodium relictum*'a ait morfolojik tanımlamalar başlık 2-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.49'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.49** *Plasmodium relictum*'un eritrositik gelişim dönemleri A-B Makrogametositler

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium relictum*/GRW11**

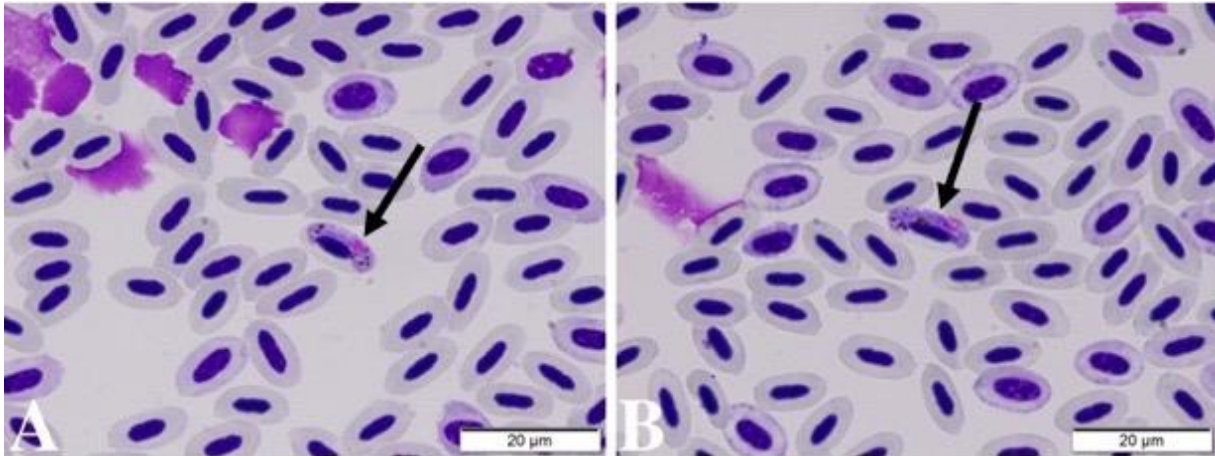
*Plasmodium relictum*'a ait morfolojik tanımlamalar başlık 2-b'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.50'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.50** *Plasmodium relictum*'un eritrositik gelişim dönemleri A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus passeris*/PADOM05**

*Haemoproteus passeris*'e ait morfolojik tanımlamalar başlık 15-a'da verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.51'de gösterilmiştir.



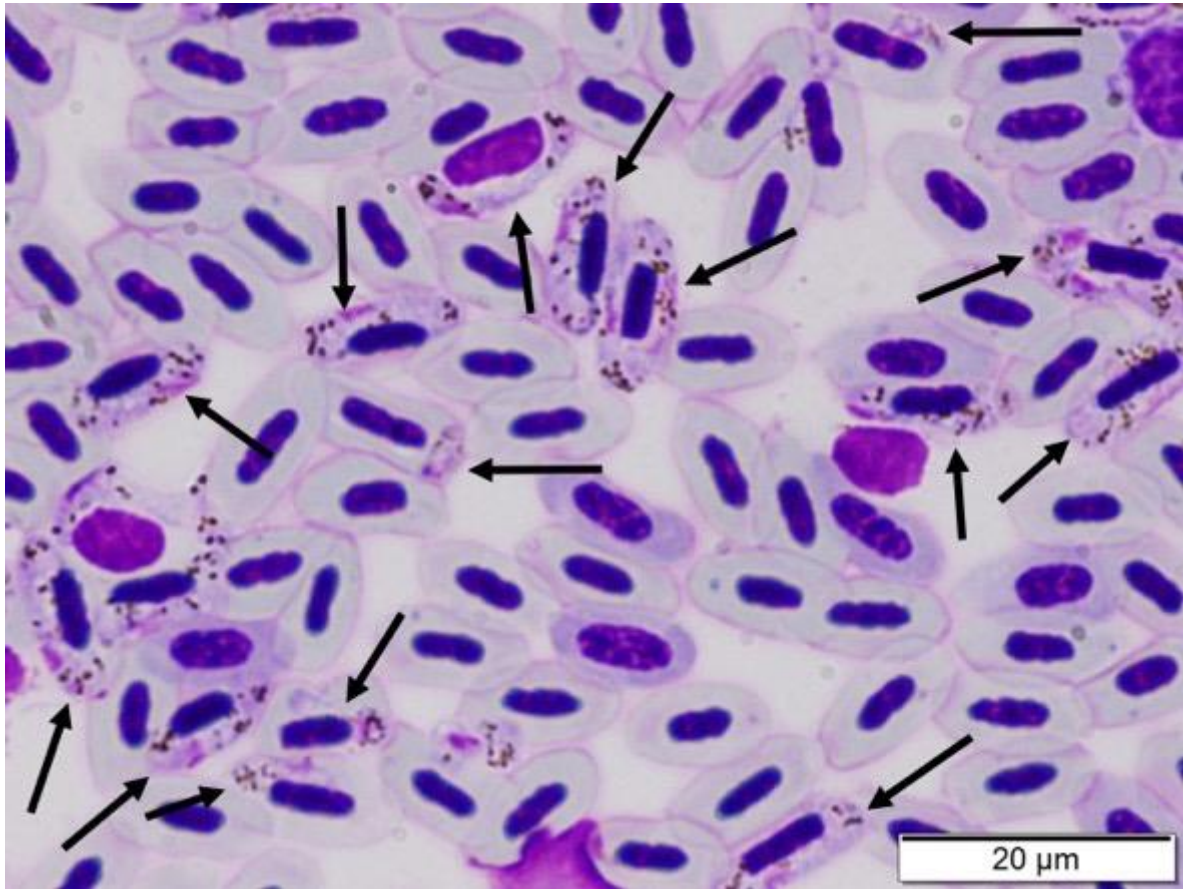
**Şekil 4.51** *Haemoproteus passeris*'in eritrositik gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler



## 18- Kanatlı Türü: *Phylloscopus trochilus*

### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Haemoproteus palloris*/WW1

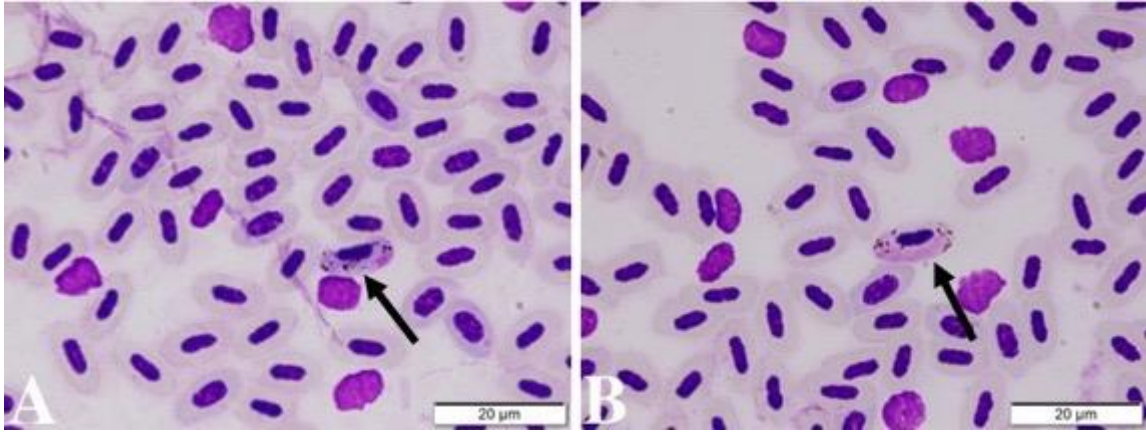
*Haemoproteus palloris*'te diğer haemoproteid türlerden farklı olarak sitoplazmanın soluk boyandığı görülmüştür. Gametositlerin olgun eritrositlerde geliştiği, sitoplazmanın soluk-mavi ve heterojen görünüşte olduğu ve volutin granüllerinin bulunmadığı dikkati çekmiştir. Gametositlerin çoğunluğunda değişken boyutta birkaç vakuol veya vakuol benzeri boşluk mevcut olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gametositlerin enfekte eritrositlerin çekirdeği boyunca geliştiği, çekirdeği uçlarıyla kapattığı ancak tamamen kuşatmadığı tespit edilmiştir. Gelişen gametosit ve eritrosit çekirdeği arasında genellikle ince yarık benzeri boşluk görülmüştür. Parazit büyüdükçe gametositlerin eritrositlerin yüzeyine yapıştığı ve gametosit ile eritrosit çekirdeği arasındaki boş alanın yavaş yavaş kapanmaya başladığı belirlenmiştir. Ayrıca parazit olgunlaştıkça gametositlerin eritrositlerin kutuplarını doldurdıkları ve enfekte hücrenin çekirdeğini yana doğru hafifçe yerinden oynattıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52 *Haemoproteus palloris*'in eritrositik gelişim dönemleri.

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus majoris*/WW2**

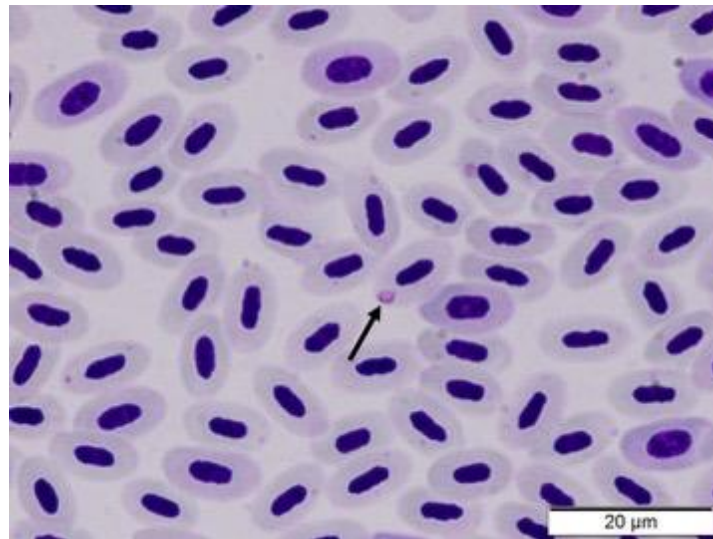
*Haemoproteus majoris* gametositlerinin enfekte eritrositlerin çekirdeğinin çevresinde geliştiği ancak çekirdekleri tamamen kuşatmadıkları gözlenmiştir. Gametositlerin, eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştıkları ve dambıl şekilli gametositlerin makrogametositlerin sayısının %10'undan fazla oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca pigment granüllerinin yuvarlak, orta (0.5-1.0 µm), bazen küçük (<0.5 µm) boyutta ve ortalama gametosit başına yaklaşık 10 adet oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.53).



**Şekil 4.53** *Haemoproteus majoris*'in eritrositik gelişim dönemleri A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium ashfordi*/GRW02**

*Plasmodium ashfordi*'ye ait morfolojik tanımlamalar başlık 4-d'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemi Şekil 4.54'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.54** *Plasmodium ashfordi*'nin eritrositik gelişim dönemi (trofozoit)

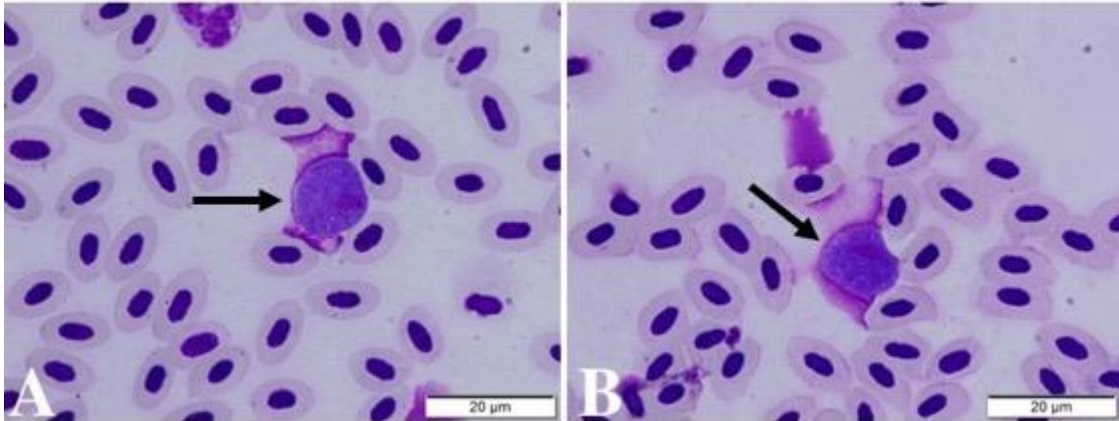
**d) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./BT2**

Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**19- Kanatlı Türü: *Pica pica***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./PICPIC01 (yeni tanımlanan nesil), (Morfolojik identifikasyon: *Leucocytozoon berestneffi*)**

Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin yuvarlak konak hücrelerinde gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Konak hücrenin nükleusunun şapka benzeri veya band benzeri bir yapıda olduğu ve gametositlerin 2/3'ünü çevrelediği gözlenmiştir (Şekil 4.55). Elde edilen bu spesifik bulgular ve *Pica* soyuna ait kuşlarda tanımlanan *Leucocytozoon* türleri de göz önüne alındığında, PICPIC01 nesline ait gelişim formları, *L. berestneffi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.55).



**Şekil 4.55** *Leucocytozoon berestneffi*'nin gelişim dönemleri. A-B: Makrogametositler

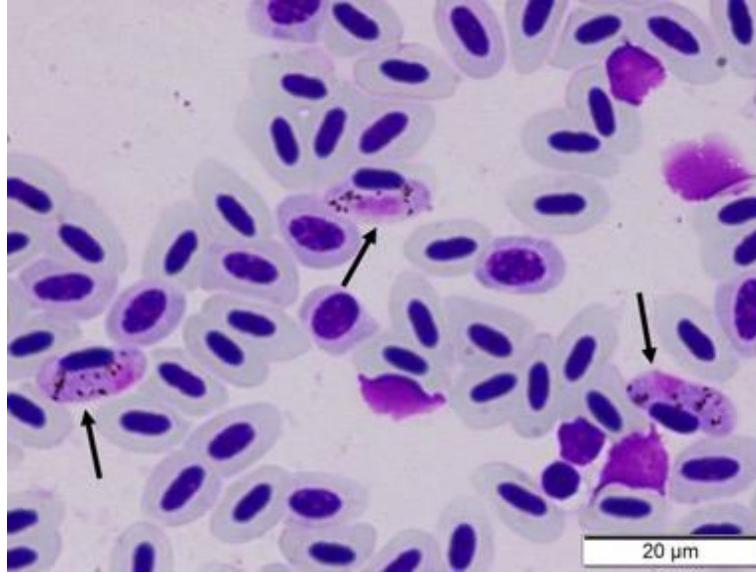
**20- Kanatlı Türü: *Riparia riparia***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus hirundinis*/DELURB1**

*Haemoproteus hirundinis* gametositlerinin enfekte eritrosit çekirdeğinin etrafında geliştikleri ve çekirdeği tamamen çevrelemedikleri belirlenmiştir. Genç ve tamamen gelişmiş gametositlerin, çekirdeğe ve eritrositlerin yüzeyine yapıştıkları görülmüştür. Dambıl şeklindeki gametositlere genellikle rastlanılmamıştır (%10'dan az). Tamamen gelişmiş gametositlerin, kutuplarına kadar eritrositleri doldurdukları tespit edilmiştir (Şekil 4.56). Pigment granüllerinin ortalama olarak



gametosit başına yaklaşık dokuz tane olmak üzere küçük ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) ve büyük ( $1.0-1.5 \mu\text{m}$ ) boyutta oldukları belirlenmiştir.

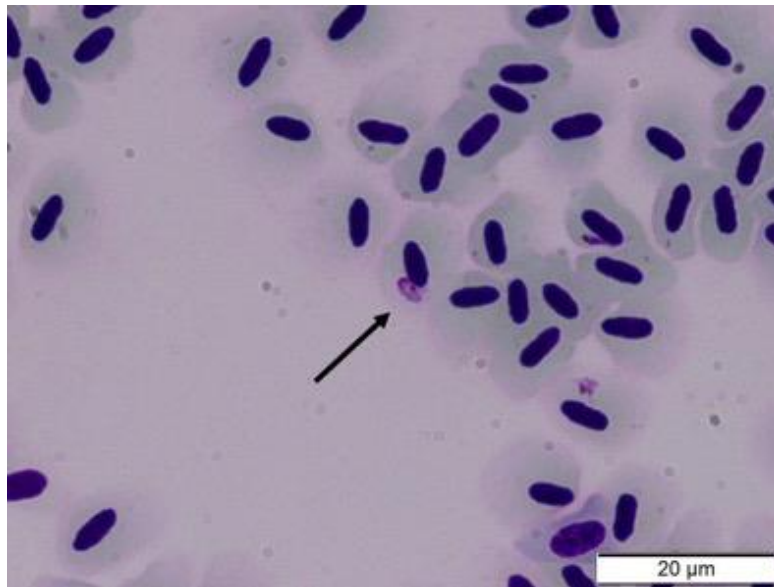


**Şekil 4.56** *Haemoproteus hirundinis*'in eritrositik gelişim dönemleri (makro ve mikrogametositler)

## 21- Kanatlı Türü: *Saxicola rubetra*

### a) *Haemosporidian* parazit tür/nesil: *Plasmodium homonucleophilum*/SW2

*Plasmodium homonucleophilum*'a ait morfolojik tanımlamalar başlık 4-c'de verilmiş ve eritrositik gelişim dönemleri Şekil 4.57'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.57** *Plasmodium homonucleophilum*'un eritrositik gelişim dönemi (trofozoit)

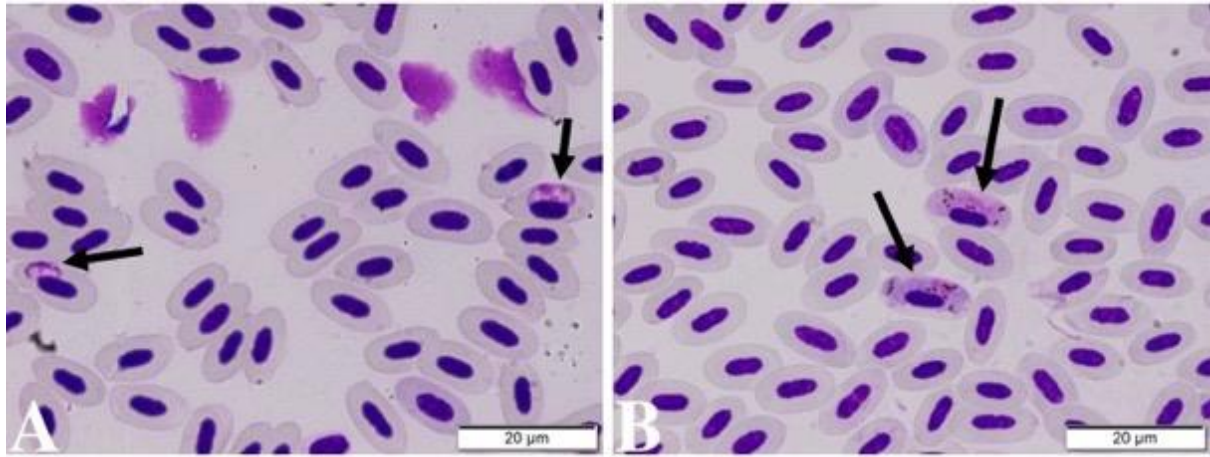
**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Plasmodium relictum*/GRW11**

Bu nesle ait eritrositik gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**22- Kanatlı Türü: *Sturnus vulgaris***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus pastoris*/LAMPUR01**

*Haemoproteus pastoris* gametositlerinin enfekte eritrositlerin çekirdeğinin çevresinde geliştikleri ve eritrositleri tamamen doldurdıkları gözlenmiştir. Ancak bu gametositlerin eritrosit çekirdeğini tamamen kuşatmadıkları tespit edilmiştir. Genç ve tamamen gelişmiş gametositlerin, eritrositlerin çekirdeğine ve yüzeyine yapıştıkları belirlenmiştir. Dambıl şeklindeki gametositlere genellikle rastlanılmamıştır (%10'dan az). Amaboid şekilli makrogametositler gözlenmiştir. Tam olarak gelişen makrogametositlerde çekirdeğin genellikle alt kısımda bulunduğu ve enfekte olmuş eritrositlerin çekirdeğine yakın konumda olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.58). Pigment granüllerinin ortalama olarak gametosit başına yaklaşık 11 tane olmak üzere küçük ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) ve orta ( $0.5-1.0 \mu\text{m}$ ) boyutta oldukları tespit edilmiştir.

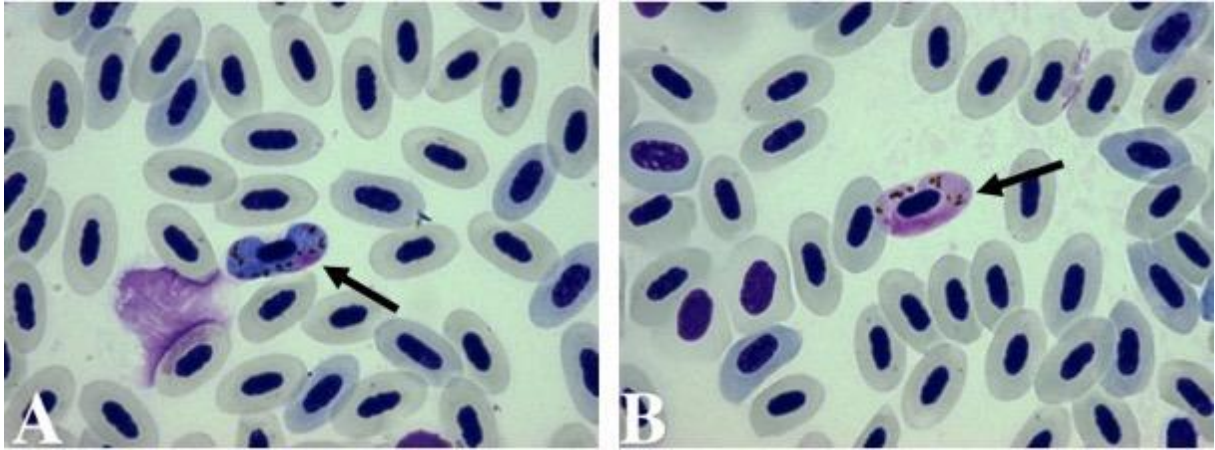


**Şekil 4.58** *Haemoproteus pastoris*'in eritrositik gelişim dönemleri. A: Genç gametositler; B: Makro ve mikrogametositler

### 23- Kanatlı Türü: *Sylvia atricapilla*

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./SYAT10* (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus parabelopolskyi*)**

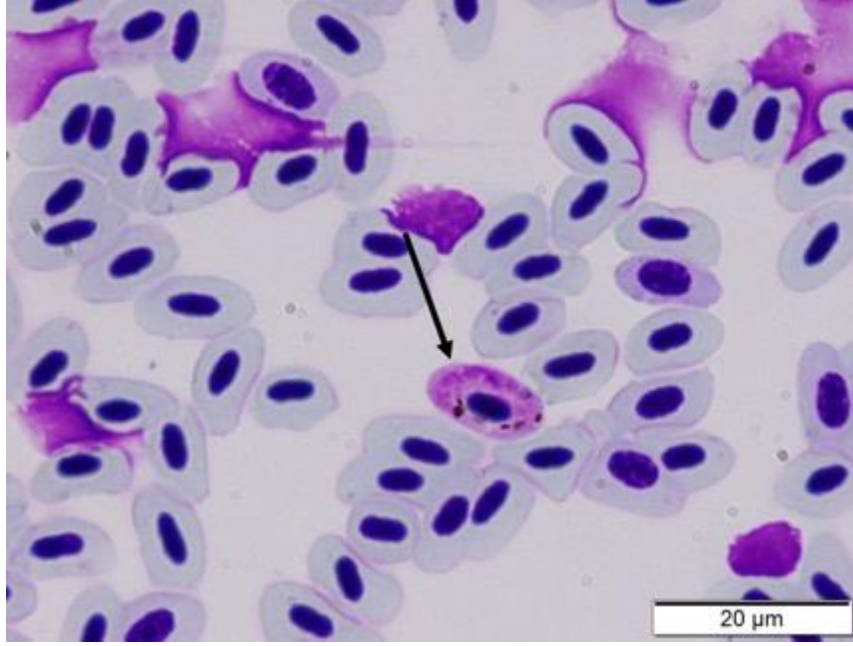
Giemsa boyalı ince yayma frotilerin incelenmesinde gametositlerin enfekte eritrositlerin çekirdekleri etrafında gelişim gösterdikleri gözlenmiştir. Bunun yanında gametositlerin çekirdekleri uçları ile kuşattıkları ve sonrasında tam olarak çevreledikleri tespit edilmiştir. *H. belopolskyi* gametositlerinden farklı olarak frotilerde görülen gametositlerin daha küçük çekirdek ölçülerine sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.59). Elde edilen bu spesifik bulgular çerçevesinde, SYAT10 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. parabelopolskyi* olarak identifiye edilmiştir.



**Şekil 4.59** *Haemoproteus parabelopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemleri. A: Makrogametosit; B: Mikrogametosit (x100)

**b) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus sp./SYAT36* (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus parabelopolskyi*)**

Başlık 23-a'da verilen *Haemoproteus parabelopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen SYAT36 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. parabelopolskyi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.60).



**Şekil 4.60** *Haemoproteus parabelopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemi (mikrogametosit)

**c) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Leucocytozoon* sp./SYAT22**

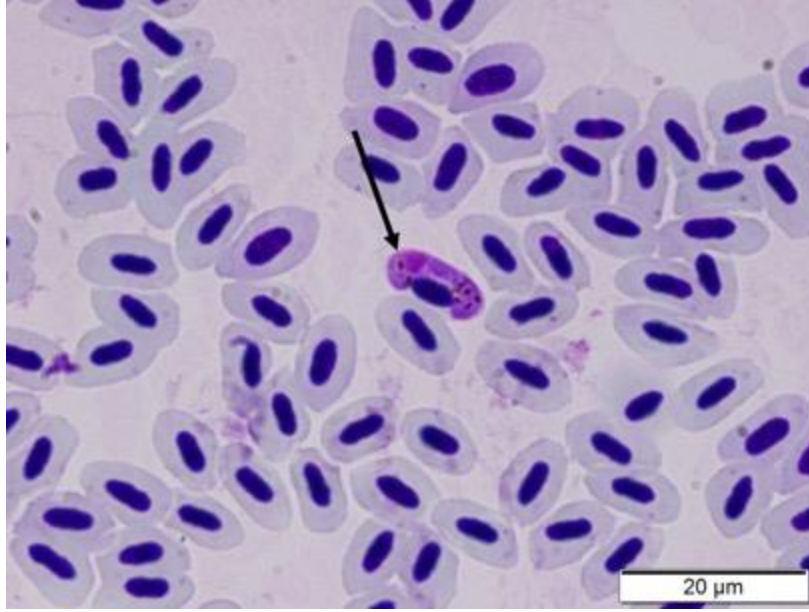
Bu nesle ait gelişim dönemleri ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilememiştir.

**24- Kanatlı Türü: *Sylvia communis***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./CWT6 (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus parabelopolskyi*)**

Başlık 23-a'da verilen *Haemoproteus parabelopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen CWT6 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. parabelopolskyi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.61).



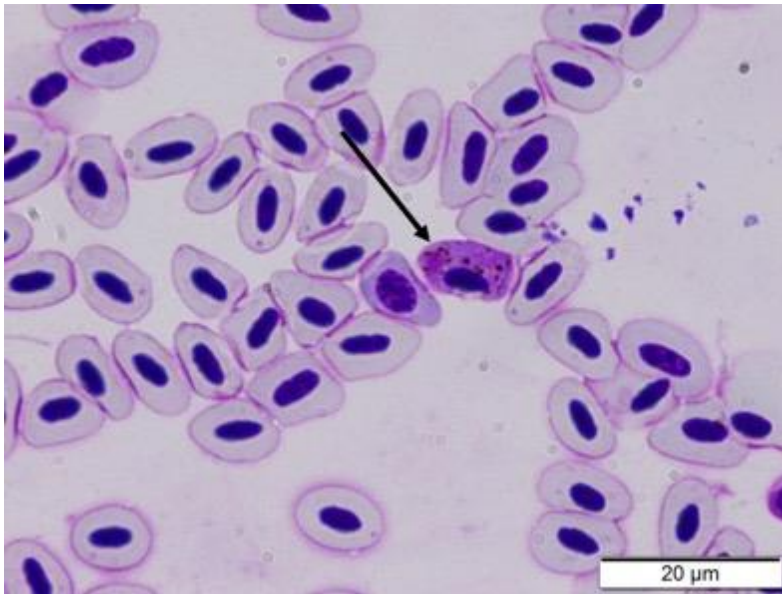


**Şekil 4.61** *Haemoproteus parabelopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

**25- Kanatlı Türü: *Sylvia crassirostris***

**a) Haemosporidian parazit tür/nesil: *Haemoproteus* sp./SYNIS04 (yeni tanımlanan nesil), (Morfolojik identifikasyon: *Haemoproteus parabelopolskyi*)**

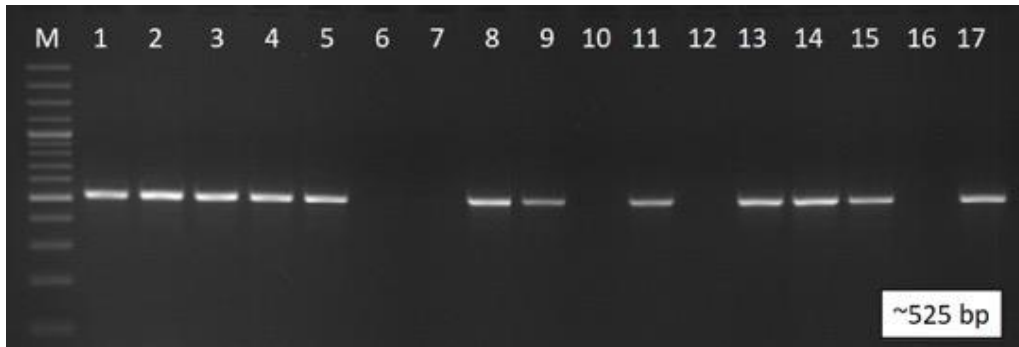
Başlık 23-a'da verilen *Haemoproteus parabelopolskyi*'ye ait morfolojik tanımlamalar çerçevesinde, ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde tespit edilen SYNIS04 nesline ait eritrositik gelişim formları, *H. parabelopolskyi* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 4.62).



**Şekil 4.62** *Haemoproteus parabelopolskyi*'nin eritrositik gelişim dönemi (makrogametosit)

#### 4.4.2 *Culicoides* ve Sivrisinek Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu

Çalışma süresince örneklenen, morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla tür teşhisleri sağlanan toplam 5665 dişi *Culicoides* ve 3250 dişi sivrisinek örneğinin haemosporidian parazitler yönünden moleküler analiz sonuçları Tablo 4.19'da, mt-cytb nested PCR analizleri sonucu bazı izolatlarda belirlenen amplikonların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.63'de verilmiştir. Haemosporidian parazitlerin araştırılmasında moleküler identifikasyon ve kan beslenme analizlerinde kullanılan *Culicoides* türleri için 358, sivrisinek türleri için ise 301 örnekten elde edilen bireysel genomik DNA izolatları ve geri kalan *Culicoides* türleri için 5307, sivrisinek türleri için de 2949 örnekten oluşturulmuş baş/toraks ve abdomen havuzlarından (~10 örnek/havuz) elde edilmiş genomik DNA izolatları kullanılmıştır (Tablo 4.19). Tablo 4.19'da görüldüğü *Culicoides* türlerine ait bireysel örneklerin toplam 236'sı (%65,92), 526'şar abdomen ve baş/toraks havuzlarından elde edilen izolatların her iki havuz izolatları için de 443'ü (%84,22), *Plasmodium/Haemoproteus* tür veya nesilleri ile enfekte belirlenmiştir. Sivrisinek türlerine ait bireysel örneklerin 73'ü (%24,25), 297'şer abdomen ve baş/toraks havuzlarından elde edilen izolatların abdomen havuzları için 72'si (%24,24), baş/toraks havuzları için ise 43'ü (%14,48) *Plasmodium/Haemoproteus* tür veya nesilleri ile enfekte saptanmıştır. *Culicoides* ve sivrisinek örneklerinin hiçbirinde *Leucocytozoon* sp. pozitifliği saptanmamıştır. Vektör potansiyelleri açısından sporozoit gelişimi temelinde baş/toraks pozitiflikleri temel alınmış ve minimum enfeksiyon oranları (MIRs) ilgili formülasyona göre hesaplanmıştır. En yüksek MIRs *Culicoides* türlerinden *C. nubeculosus* komp.'de belirlenmiş bunu sırasıyla *C. gejjelensis*, *C. submaritimus*, *C. circumscriptus*, *C. longipennis*, *C. festivipennis* ve *C. newsteadii* izlemiştir. Sivrisinek türlerinde ise MIRs en yüksek *Cx. pipiens* kompleks türlerinde belirlenmiş bunu *Ae. vexans* izlemiştir. *Anopheles* türlerine ait baş/toraks havuzlarında pozitiflik saptanmamış ve dolayısıyla MIRs belirlenmemiştir.



**Şekil 4.63** Bazı *Plasmodium/Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* pozitif insekt örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker, 1-5,8,9: *Plasmodium/Haemoproteus*, 11, 13-15, 17: *Leucocytozoon*

**Tablo 4.19** İncelenen *Culicoides* ve sivrisinek örneklerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları

| İnsekt Türü          | İncelenen Örnek Sayısı |     |     | Plasmodium/Haemoproteus |       |      |       |      |       | MIRs* |
|----------------------|------------------------|-----|-----|-------------------------|-------|------|-------|------|-------|-------|
|                      | Bireysel               | AH  | BTH | Bireysel                |       | AH   |       | BTH  |       |       |
|                      |                        |     |     | Sayı                    | %     | Sayı | %     | Sayı | %     |       |
| Culicoides           |                        |     |     |                         |       |      |       |      |       |       |
| C.nubeculosus komp.  | 150                    | 338 | 338 | 123                     | 82,00 | 308  | 91,12 | 302  | 89,35 | 89,48 |
| C.riethi             | 45                     | 0   | 0   | 33                      | 73,33 | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 73,33 |
| C. circumscriptus    | 100                    | 128 | 128 | 47                      | 47,00 | 90   | 70,31 | 97   | 75,78 | 76,08 |
| C. submaritimus      | 48                     | 45  | 45  | 34                      | 70,83 | 38   | 84,44 | 38   | 84,44 | 84,82 |
| C. gejelensis        | 10                     | 0   | 0   | 2                       | 20,00 | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 20,00 |
| C. duddingstoni      | 9                      | 2   | 2   | 2                       | 22,22 | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 22,22 |
| C. punctatus         | 12                     | 4   | 4   | 0                       | 0,00  | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 0,00  |
| C. longipennis       | 11                     | 4   | 4   | 8                       | 72,73 | 3    | 75,00 | 2    | 50,00 | 64,52 |
| C. festivipennis     | 6                      | 2   | 2   | 2                       | 33,33 | 1    | 50,00 | 1    | 50,00 | 62,50 |
| C. newsteadi         | 7                      | 2   | 2   | 5                       | 71,43 | 1    | 50,00 | 1    | 50,00 | 50,00 |
| Sivrisinek           |                        |     |     |                         |       |      |       |      |       |       |
| An. sacharovi        | 140                    | 174 | 174 | 2                       | 1,43  | 5    | 2,87  | 0    | 0,00  | 0,00  |
| Cx. pipiens kompleks | 110                    | 103 | 103 | 62                      | 56,36 | 48   | 46,60 | 42   | 40,78 | 40,82 |
| An. maculipennis     | 20                     | 10  | 10  | 0                       | 0,00  | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 0,00  |
| Ae. vexans           | 18                     | 9   | 9   | 2                       | 11,11 | 2    | 22,22 | 1    | 11,11 | 12,20 |
| An. claviger         | 13                     | 1   | 1   | 0                       | 0,00  | 0    | 0,00  | 0    | 0,00  | 0,00  |

AH: Abdomen havuz; BTH: Baş/Toraks Havuz; MIRs: Minimum enfeksiyon oranı

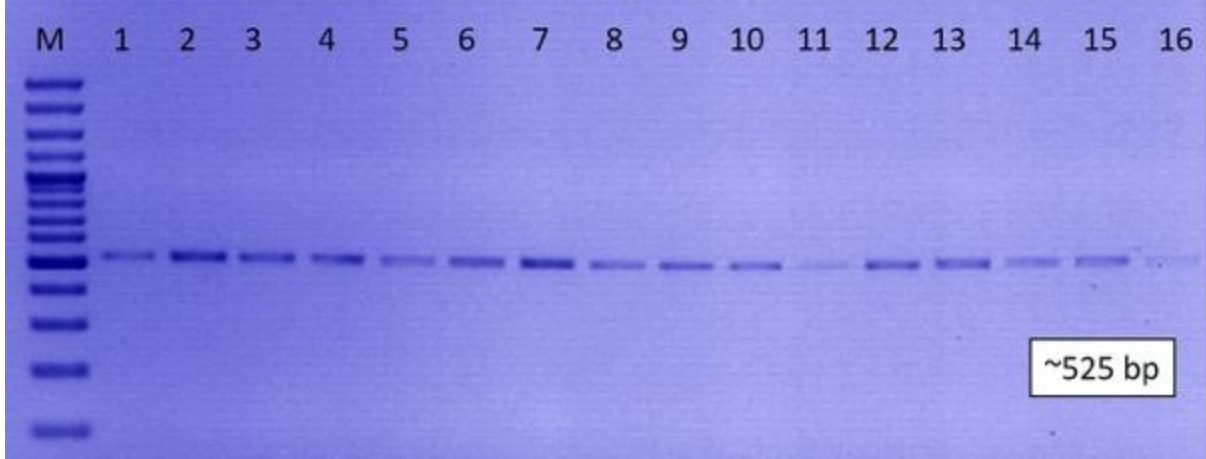
\* MIRs belirlenmesinde, havuzu bulunmayan türlerde bireysel örnekler için belirlenen pozitiflik oranları, havuz oluşturulan türlerde ise BTH pozitiflikleri için ilgili formülasyonla belirlenen oranlar temel alınmıştır.

Kuş türü ve haemosporidian parazit soyu temelinde uygun konsantrasyonda belirlenen izolatlar ait ampikonlar jelden pürifiye edilmiş (Şekil 4.64) ve sonrasında gen spesifik nested primerlerle çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Bazı düşük konsantrasyonda olan izolatların sekanslanmasında klonlama ve plazmid pürifikasyonları yapılmıştır. Bu izolatlar ait sekanslar rekombinant plazmid DNA sekansı içerisinde uygun yazılım ile belirlenmiş ve karakterize edilmiştir. Sekansların değerlendirilmesinden önce PCR primerleri ilgili izolatlar ait sekanslardan trimlenerek çıkarılmış ve 458 bp barkod bölge elde edilerek filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Haemosporidian parazitlerle enfekte belirlenen kuş örneklerine ait izolatların sekans analizleri sonucu belirlenen parazit tür veya nesilleri ve GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.20'de verilmiştir. *Culicoides* türlerinden izole edilip sekans analizlerine tabii tutulan bireysel izolatlar için toplam 45, abdomen havuz izolatları için toplam 60 ve baş/toraks havuz izolatları için toplam 67 *Haemoproteus/Plasmodium* pozitif izolatının sırasıyla 17, 16 ve 67'si *Haemoproteus*; 28, 44 ve 0'ı ise *Plasmodium* nesilleri olarak karakterize edilmiştir. Sivrisinek türlerinden izole edilip sekans analizlerine tabii tutulan bireysel izolatlar için toplam 12, abdomen havuz izolatları için toplam 25 ve baş/toraks havuz izolatları için toplam 22



*Haemoproteus/Plasmodium* pozitif izolatının sırasıyla 11, 12 ve 22'si *Plasmodium*; 1, 13 ve 0'ı ise *Haemoproteus* nesilleri olarak karakterize edilmiştir.

Çalışmada insektlerde tespit edilen 25 neslin daha önce karakterize edilmiş olan tür veya nesillerle identik olduğu belirlenirken *Haemoproteus* soyunda belirlenen iki nesil (CIRCUM06, RW4) Dünya'da ilk kez karakterize edilmiş ve moleküler veri bankasına kazandırılmıştır.



**Şekil 4.64** Bazı *Plasmodium/Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* izolatlarına ait jelpürifiye mt-cyb gen bölgesi ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker, 1-9: *Plasmodium/Haemoproteus*, 10-16: *Leucocytozoon*

**Tablo 4.20** Sekans analiz sonuçlarına göre *Culicoides* ve sivrisinek türlerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu

| Tür                        | Sekanslanan izolat sayısı |    |    | Haemosporidia Sekans Karakterizasyonu |                                        |                               |                                                  |
|----------------------------|---------------------------|----|----|---------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|
|                            | B                         | A  | BT | <i>Plasmodium</i> tür/nesil           | Sayı (B, A, BT)<br>(GenBank Aksesyon*) | <i>Haemoproteus</i> tür/nesil | Sayı (B, A, BT)<br>(GenBank Aksesyon*)           |
| <b><i>Culicoides</i></b>   |                           |    |    |                                       |                                        |                               |                                                  |
| <i>C.nubeculosus</i> komp. | 12                        | 28 | 26 | P.<br>circumflexum/TURDUS1            | 1 (B), 8 (A)                           | H.belopolskyi/<br>ARW1        | 3 (B), 1 (A), 10 (BT)<br>(MF095634)              |
|                            |                           |    |    |                                       |                                        | H. payevskyi/RW1              | 3 (B) 9 (BT)<br>(MF095635)                       |
|                            |                           |    |    | P. relictum/SGS1                      | 2 (B), 12 (A)                          | Haemoproteus sp./RW4          | 3 (B), 5 (A), 7 (BT)<br>(MF095636)               |
|                            |                           |    |    |                                       |                                        | Haemoproteus sp./GRW05        | 2 (A),<br>(MF095637)                             |
| <i>C.riethi</i>            | 7                         | 0  | 0  | P.<br>circumflexum/TURDUS1            | 3 (B)                                  | H.belopolskyi/<br>ARW1        | 3 (B),<br>(MF095638)                             |
|                            |                           |    |    | P. ashfordi/GRW02                     | 1 (B)                                  |                               |                                                  |
| <i>C. circumscriptus</i>   | 5                         | 20 | 22 | P.<br>circumflexum/TURDUS1            | 1 (B), 7 (A)                           | Haemoproteus sp./GAGLA05      | 1 (B), 1 (BT)<br>(MF095639)<br>(KX831071)        |
|                            |                           |    |    | Plasmodium sp./PADOM02                | 1 (B), 5(A)                            | Haemoproteus sp./GRW05        | 4 (A), 4 (BT),<br>(MF095640-41)<br>(KX831072,78) |
|                            |                           |    |    |                                       |                                        | H. noctuae/CIRCUM01           | 1 (B), 4 (BT),<br>(MF095642)<br>(KX831073)       |
|                            |                           |    |    |                                       |                                        | Haemoproteus sp./CUKI1        | 3 (BT),<br>(MF095643)<br>(KX831074)              |

|                         |   |   |    |                         |              |                           |                                          |
|-------------------------|---|---|----|-------------------------|--------------|---------------------------|------------------------------------------|
|                         |   |   |    | Plasmodium sp./RTSR1    | 1 (B), 4 (A) | Haemoproteus sp./CIRCUM03 | 2 (A), 4 (BT), (MF095644) (KX831075, 76) |
|                         |   |   |    |                         |              | Haemoproteus sp./CIRCUM02 | 3 (BT), (MF095645)                       |
|                         |   |   |    |                         |              | Haemoproteus sp./CIRCUM06 | 3 (BT), (MF095646) (KX831077)            |
| <i>C. submaritimus</i>  | 5 | 7 | 12 | Plasmodium sp./PADOM02  | 2 (B), 4 (A) | H. noctuae/CIRCUM01       | 1 (A), 5 (BT), (MF095647)                |
|                         |   |   |    | P. homonucleophilum/SW2 | 1 (B), 2 (A) | Haemoproteus sp./CIRCUM06 | 2 (B), 7(BT), (MF095648)                 |
| <i>C. geigelensis</i>   | 3 | 1 | 2  | P. circumflexum/TURDUS1 | 3 (B), 1 (A) | H. lanii/RBS4             | 2 (BT), (MF095649)                       |
| <i>C. longipennis</i>   | 6 | 2 | 2  | P. homonucleophilum/SW2 | 3 (B), 1 (A) | H. lanii/RBS4             | 1 (B), 1 (BT), (MF095650)                |
|                         |   |   |    | Plasmodium sp./PADOM02  | 2 (B), 1 (A) | H. passeris PADOM05       | 1 (BT), (MF095651)                       |
| <i>C. festivipennis</i> | 3 | 1 | 1  | P. ashfordi/GRW02       | 2 (B)        | H. passeris PADOM05       | 1 (BT), (MF095652)                       |
|                         |   |   |    | P. homonucleophilum/SW2 | 1 (B)        | Haemoproteus sp./CIRCUM06 | 1 (A)                                    |
| <i>C. newsteadi</i>     | 3 | 1 | 2  | P. circumflexum/TURDUS1 | 2 (B), 1 (A) | H. palloris WW1           | 2 (BT), (MF095653)                       |
|                         |   |   |    | P. homonucleophilum/SW2 | 1 (B)        |                           |                                          |
| <i>C. duddingstoni</i>  | 1 | 0 | 0  | P. circumflexum/TURDUS1 | 1 (B)        | -                         | -                                        |
| <b>Sivrisinek</b>       |   |   |    |                         |              |                           |                                          |

|                                 |   |    |    |                            |                                                  |                           |       |
|---------------------------------|---|----|----|----------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|-------|
| <i>An. sacharovi</i>            | 1 | 2  | 0  | Plasmodium<br>sp./PADOM02  | 1 (A)                                            | H. passeris<br>PADOM05    | 1 (B) |
|                                 |   |    |    |                            |                                                  | H.<br>noctuae/CIRCUM01    | 1 (A) |
| <i>Cx. pipiens<br/>kompleks</i> | 9 | 21 | 21 | Plasmodium sp./CXPIP20     | 1 (B), 3 (A), 3 (BT),<br>(MF095654)              | H. belopolskyi/<br>ARW1   | 3 (A) |
|                                 |   |    |    | Plasmodium sp./CXPIP21     | 2 (B), 3 (A), 4 (BT),<br>(MF095655)              | H.belopolskyi/ MW1        | 2 (A) |
|                                 |   |    |    | Plasmodium sp./CXPIP22     | 2 (B), 4 (BT),<br>(MF095656)                     | H. palloris WW1           | 2 (A) |
|                                 |   |    |    | Plasmodium sp./CXPIP23     | 1 (B), 4(A), 3 (BT),<br>(MF095657)<br>(KX831079) | H. lanii/RB1              | 1 (A) |
|                                 |   |    |    | Plasmodium<br>sp./DONANA02 | 3 (BT) (MF135616)                                |                           |       |
|                                 |   |    |    | P. ashfordi/GRW02          | 1 (B), 2 (BT),<br>(MF095658)                     | H. lanii/RBS4             | 2 (A) |
|                                 |   |    |    | P.<br>circumflexum/TURDUS1 | 2 (B), 1 (A), 1 (BT),<br>(MF095659)              |                           |       |
| <i>Ae. vexans</i>               | 2 | 2  | 1  | Plasmodium<br>sp./AEDVEX01 | 2 (B), 1 (BT),<br>(MF095660)                     | Haemoproteus<br>sp./GRW05 | 2 (A) |

B: Bireysel örnek; A: Abdomen havuzu; BT: Baş/Toraks havuzu

\*: Vektörlük potansiyelleri açısından sadece BT havuzlarından (*C. riethi* için bireysel izolat) elde edilen sekansların haemosporidian tür ve nesli bazında GenBank kayıtları sağlanmış ve aksesyon numaraları verilmiştir.

#### 4.4.3 Kanatlı ve insekt örneklerinde moleküler olarak karakterize edilen Haemosporidian parazitlerin filogenetik analizleri

Araştırma yöresinde kuş, sivrisinek ve *Culicoides* türlerinde moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan *Plasmodium*, *Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* tür ve nesillerinin filogenetik yapıları sırasıyla Şekil 4.65-4.67'de gösterilmiştir. Bayesian (BA) ve maximum likelihood (ML) analizleri ile oluşturulan filogenetik ağaçlar benzer topoloji sergilemiş ve BA posterior olasılıkları ile ML bootstrap destekleri bayesian filogenetik ağaçları üzerinde gösterilmiştir. *Plasmodium* nesilleri için oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 4.65) görüleceği üzere çalışmamızda *Ae. vexans* ve *Cx. pipiens* kompleks türlerinde belirlenen *Plasmodium* sp. AEDVEX01 ve *Plasmodium* sp. CXPIP22 nesillerinin birbirlerine yüksek identiklik gösterdikleri (%99,4) ve birlikte yine *Cx. pipiens* komplekste saptanan *P. circumflexum* TURDUS1 nesline filogenetik olarak yakın oldukları (ort. %3,6±0,9 genetik farklılık) görülmüştür. Bu üç nesil ile birlikte küme oluşturan *Plasmodium* sp. PADOM02 nesli araştırma yöresinde sivrisinek türlerinden *An. sacharovi* ve passerin kuşlardan Bıyıklı Kamışçında (*Acrocephalus melanopogon*) belirlenmiş ve kümelenildiği ilgili nesillere ortalama %3,3±0,7 genetik farklılık göstermiştir. Bu nesillerin filogenetik yapıları yüksek bootstrap (>69) ve posterior olasılıklarla (>0.74) desteklenmiştir. MalAvi veri tabanı incelemelerinde AEDVEX01 ve CXPIP22 nesillerinin yalnızca çalışmamızda da belirlenen insekt türlerinden rapor edildiği, TURDUS1 ve PADOM02 nesillerinin ise *Cx. pipiens* ile birlikte *Culex* soyundaki diğer bazı sivrisinekler ile birlikte en yüksek Passeriformes takımındaki kuş türleri olmak üzere diğer bazı takımlardaki kuş türlerinden de bildirildiği görülmüştür (Şekil 4.65). Çalışmada Ağaç Serçesi (*Passer montanus*), Serçe (*Passer domesticus*) ve Florya (*Chloris chloris*) türlerinde belirlenen *P. relictum* SGS1 neslinin en yüksek identikliği (%99,8) Ağaç Serçesi (*Passer montanus*) ve Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) türlerinden identifiye ettiğimiz *P. relictum* GRW11 nesli ile gösterdiği, *Cx. pipiens* komplekste saptanan *Plasmodium* sp. CXPIP20 neslinin de bu iki *Plasmodium* nesline filogenetik olarak daha yakın olduğu (ort. %0,5±0,3 genetik farklılık) ve birlikte küme oluşturdıkları belirlenmiştir (Şekil 4.65). Bu nesillerin filogenetik yapıları yine yüksek bootstrap (>69) ve posterior olasılıklarla (>0.74) destek görmüştür. Ayrıca filogenetik ağaç üzerinde (Şekil 4.65) de görüleceği üzere SGS1 *P. relictum* neslinin farklı takımlardaki yüksek sayıda kanatlı türünü (en yüksek Passeriformes takımı) enfekte edebildiği; GRW11 neslinin de yine en yüksek Passeriformes takımında yer alan türlerde bulunduğu dikkati çekmiştir. Araştırmamızda Küçük Balaban'da (*Ixobrychus minutus*) identifiye ettiğimiz *Plasmodium* sp. IXOMIN02 ve IXOMIN03 nesilleri dünyada ilk kez karakterize edilmiş ve tanımlanmıştır. Bunlardan IXOMIN02 nesli en yüksek identikliği %96,4 ile *P. relictum* SGS1 nesline göstermiş ve bu neslin yer aldığı küme ile birlikte gruplanmıştır.

(Şekil 4.65). IXOMIN03 ise en yüksek identikliğı %99,6 ile çalışmada *Cx. pipiens* komplekste identifiye ettiğimiz *Plasmodium* sp. DONANA02 nesli ile göstermiş ve bu iki nesil çalışmada yine *Cx. pipiens* kompleks ve Küçük Balaban'da identifiye edilen CXPIP21 (yalnızca *Cx. pipiens*'ten izole) ve CXPIP23 (hem *Cx. pipiens* hem de Küçük Balaban'dan izole) ile filogenetik olarak yakın bulunmuş (ort. %1,5±0,5 genetik farklılık) ve birlikte gruplanma göstermiştir. Bu nesillerin filogenetik yapılanmaları Şekil 4.65'de görüleceğı üzere yüksek bootstrap (>85) ve posterior olasılıklarla (>0.92) destek görmüştür. Ayrıca MalAvi veri tabanı incelemelerinde DONANA02 neslinin *Cx. modestus*'tan, CXPIP21 ve CXPIP23 nesillerinin ise sırasıyla *Cx. pipiens* ile *Cx. pipiens* ve *Ochlerotatus caspius*'tan rapor edildiğı görülmüştür. Araştırmamızda Büyük Kamışçın'dan (*Acrocephalus arundinaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. SYBOR10 ve *Plasmodium* sp. GRW10 nesilleri ile Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. RTSR1 neslinin genetik olarak yakın oldukları (ort. %1,6±0,5 genetik farklılık) ve birarada küme oluşturdıkları saptanmıştır (Şekil 4.65). Ayrıca bu üç nesil yine çalışmamızda Kırdıra Kamışçını (*Acrocephalus schoenobaenus*), Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) ve Mavigerdan'da (*Luscinia svecica*) belirlenen *P. homonucleophilum* SW2 nesli ile de filogenetik olarak yakın oldukları (ort. %9,7±1,5 genetik farklılık) ve birlikte gruplanma gösterdikleri görülmüştür. Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) ve Mavigerdan'da (*Luscinia svecica*) karakterize edilen *P. homonucleophilum* SW2 nesli ile Büyük Kamışçın'dan (*Acrocephalus arundinaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. SYBOR10 nesli bu kuş türleri için ilk kayıtları oluşturmıştır. İlgili nesillerin filogenetik yapılanmaları yine yüksek bootstrap (>85) ve posterior olasılıklarla (>0.92) desteklenmiştir. SYBOR10, GRW10, RTSR1 ve SW2 nesillerinin MalAvi veri tabanında en fazla Passeriformes takımındakiler olmak üzere farklı takımlardaki kuşlardan rapor edildiğı dikkati çekmiştir (Şekil 4.65). Araştırmada Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*), Kırdıra Kamışçını (*Acrocephalus schoenobaenus*) ile vektörlerden *Cx. pipiens*'te izole edilen *P. ashfordi* GRW02 nesli, yine Kırdıra Kamışçınından (*Acrocephalus schoenobaenus*) izole edilmiş *P. elongatum* GRW06 nesli küme oluşturarak (%93,1 identiklik oranı) SYBOR10, GRW10, RTSR1 ve SW2 nesillerinin oluşturduğu grup ile birlikte üst kümelenme göstermiştir. MalAvi veri tabanında *P. elongatum* GRW06 neslinin en fazla Passeriformes takımındaki türlerde olmak üzere toplam 12 kuş takımında rapor edildiğı görülmüştür (Şekil 4.65). Çalışmamızda Kırdıra Kamışçınından (*Acrocephalus schoenobaenus*) izole edilerek karakterize edilmiş *P. elongatum* GRW06bu kuş türü için ilk kayıt olmuştur. *P. ashfordi* GRW02 neslinin ise MalAvi kayıtlarında yine Passerin kuşlarda çok olmak üzere şimdiye kadar iki takımda bildirildiğı dikkati çekmiştir.





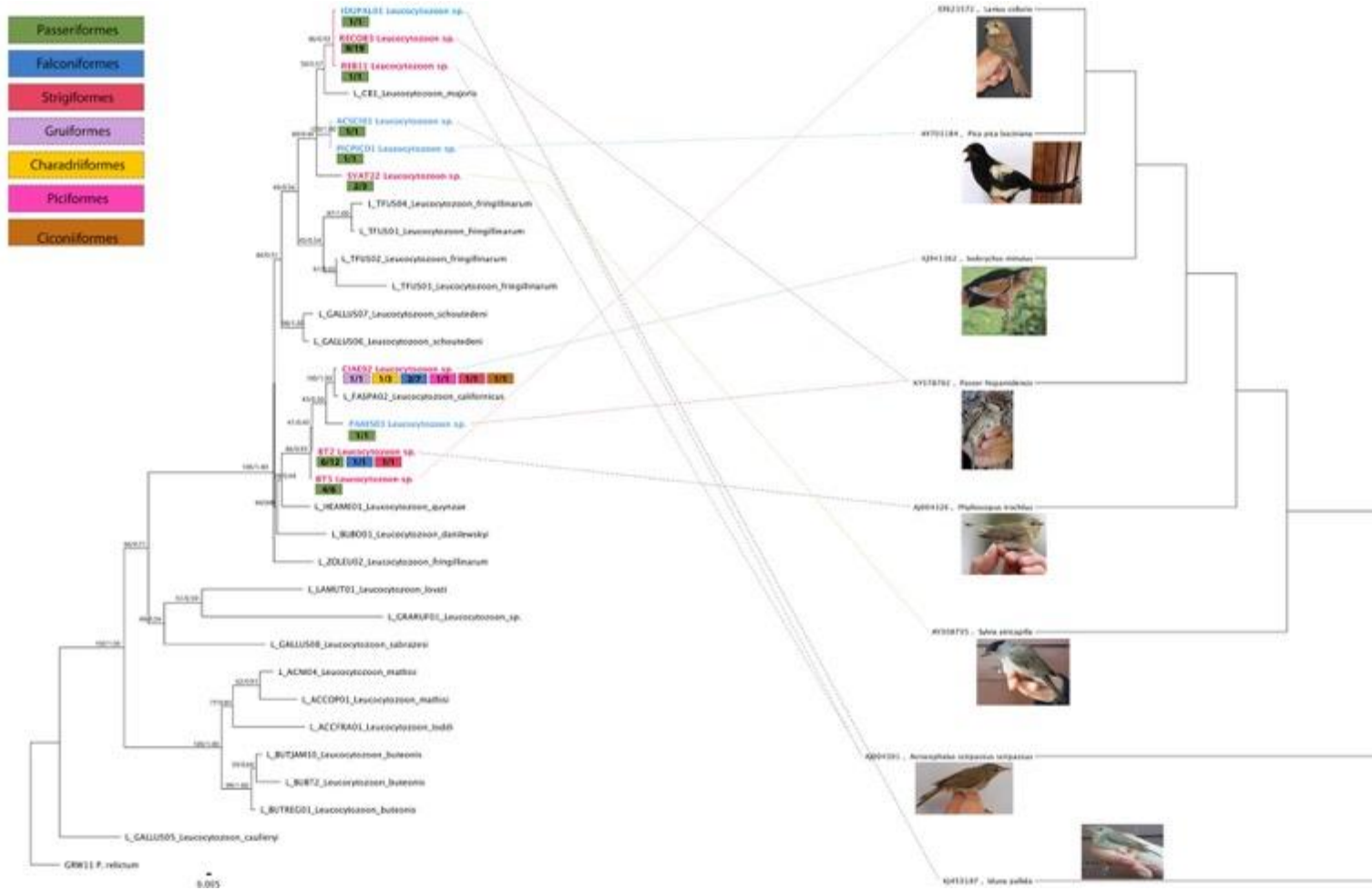
Araştırma yöresinde kanatlı konak ve potansiyel vektör *Culicoides* türlerinde belirlenen *Haemoproteus* tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları Şekil 4.66'da verilmiştir. Kara Başlı Ötleğende (*Sylvia atricapilla*) belirlenen *Haemoproteus* sp. SYAT36 ve SYAT10 nesillerinin %99,6 identik oldukları ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ile *C. nubeculosus* komplekste saptanan *H. payevski* RW1 nesli ile beraber küme oluşturdukları görülmüştür (Ort %95,2 identiklik). Ak Gözlü Ötleğen (*Sylvia crassirostris*) ve Ak Gerdanlı Ötleğende (*Sylvia communis*) identifiye edilen sırasıyla SYNIS04 ve CWT6 nesillerinin birbirine genetik olarak yakın (%97,3 identiklik) oldukları görülmüştür. *Haemoproteus* sp. SYNIS04 nesli Ak Gözlü Ötleğen (*Sylvia crassirostris*) için Dünya'da ilk kez bildirilmiştir. SYAT36, SYAT10 ve RW1 kümesi ile SYNIS04 ve CWT6 kümesine dış dal olarak yerleşim gösterdiği belirlenen Kum Kırlangıcından (*Riparia riparia*) ilk kez izole edilmiş DELURB1 nesli her iki kümeye sırasıyla ortalama %93,4 ve %93,8 genetik identiklik gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik analizlerle beraber ilgili nesillere ait eritrositik gelişim evrelerinin morfolojik analizleri sonucu SYAT10, SYAT36, SYNIS04 ve CWT6 nesillerinin tür tanımlanması yapılmış ve *H. parabelopolskyi* olarak karakterize edilmişlerdir. Şekil 4.66'da görüleceği üzere ilgili türün parafiletik olduğu belirlenmiştir. Yine ilgili nesillerin MalAvi veri bankası incelemelerinde yalnızca aynı aile veya soydan passerin kuşlarda rapor edildiği görülmüştür. Araştırmada Kızıl Sırtlı Örümcekuşu (*Lanius collurio*)'dan izole edilmiş olan *H. lanii* RB1 ve *Haemoproteus* sp. RBS5, RBS6 ile yine aynı kuş türü ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ile potansiyel vektör *C. gejjelensis* ve *C. longipennis*'den izole edilen *H. lanii* RBS4 nesilleri genetik olarak yüksek identiklik göstermiş (ort. %99,4) ve küme oluşturmuşlardır. Floryada (*Chloris chloris*) belirlenen ve Dünyada ilk kez karakterize edilen CARCHL01 nesli morfolojik analizlerle birlikte *H. fringillae* türüne ait olarak belirlenmiş olup *H. lanii* RB1, RBS4-6 nesillerine genetik olarak yakın bulunmuş (ort. %96,05) ve ilgili kümeye dış dal olarak bağlanmıştır (Şekil 4.66). *C. circumscriptus*'tan izole edilen GAGLA05 nesli yine ilgili *H. lanii* nesilleri ve *H. fringillae* CARCHL01 nesli ile yakın ilişkili belirlenmiş ve dış dal oluşturarak aynı kümeye dahil olmuştur (Şekil 4.66). Araştırmada diğer bir Kızıl Sırtlı Örümcekuşundan (*Lanius collurio*) izole edilmiş olan RBS7 nesli morfolojik analizlerle *H. lanii*'ye ait olarak belirlenmesine karşın aynı kuş türünden izole edilmiş diğer *H. lanii* nesillerine daha uzak belirlenmiş (ort %97,3 identiklik) ve bu türün filogenetik olarak parafiletik olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ve Kırdıra Kamışçınlarından (*Acrocephalus schoenobaenus*) izole edilen ARW1, SW3, MW3, ACDUM2 ve Ak Mukallitte (*Iduna pallida*) saptanan HIP2 nesillerinin birbirlerine en yüksek genetik yakınlığı gösterdikleri (%99,1) ve morfolojik identifikasyonlarla tümünün *H. belopolskyi* türüne ait oldukları belirlenmiştir. İlgili nesiller Şekil 4.66'da görüldüğü üzere *H. belopolskyi* içinde birinci kümeyi oluşturmuştur. Yine morfolojik analizlerle *H. belopolskyi* türüne ait oldukları

saptanan ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Çalı Kamışçını (*Acrocephalus palustris*), Kindıra Kamışçını (*Acrocephalus schoenobaenus*), Büyük Kamışçın (*Acrocephalus arundinaceus*), Bıyıklı Kamışçın (*Acrocephalus melanopogon*) ve Bıyıklı Baştankara (*Panurus biarmicus*) türlerine ait örnekler ile potansiyel vektör *C. circumscriptus*'ta belirlenen SW1, MW1 ve GRW05 nesilleri birbirlerine filogenetik yakın bulunarak (ort. %99,0 identiklik) ikinci kümeyi oluşturmuştur. Bu nesillerden GRW05'in bu çalışma ile morfolojik olarak identifikasyonu gerçekleştirilmiş ve tür ismi verilmiştir. Ayrıca GRW05 nesli ise Çalı Kamışçını (*Acrocephalus palustris*), Bıyıklı Kamışçın (*Acrocephalus melanopogon*) ve Bıyıklı Baştankara'dan (*Panurus biarmicus*) ilk kez izole edilip karakterize edilmiştir. Yine filogenetik analiz sonuçları *H. belopolskyi*'nin monofiletik olduğunu göstermiştir. Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) ilk kez izole edilip karakterize ettiğimiz *H. nuclecondensus* GRW01 nesli en yüksek identikliği (%99,6) *H. belopolskyi* MW1 nesli ile göstermiş ve *H. belopolskyi* ikinci filogenetik kümesinde yer aldığı görülmüştür. Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*) izole edilen *H. paranucleophilus* PAHIS2 nesli filogenetik olarak en yüksek identikliği %96,4 ile RBS7 nesli ile göstermiş ve ayrı bir dalda yerleşim göstermiştir. Çalışmamızda Serçe (*Passer domesticus*), Söğüt Serçesi (*Passer hispaniolensis*), Ağaç Serçesi (*Passer montanus*), Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Büyük Kamışçını (*Acrocephalus arundinaceus*) ve potansiyel vektörler *C. newsteadi*, *C. longipennis* ve *C. festivipennis*'ten izole edilip karakterize edilen PADOM03, PAHIS1 ve PADOM05 nesilleri monofiletik bir grup oluşturmuş (Şekil 4.66) ve ortalama %97,8 identik bulunmuşlardır. PADOM03 Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*), PAHIS1 Büyük Kamışçından (*Acrocephalus arundinaceus*), PADOM05 de Ağaç Serçesi (*Passer montanus*) ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ile ilgili vektör türlerinden ilk kez identifiye edilip karakterize edilmiştir. Tüm ilgili nesillerin morfolojik identifikasyonlarla *H. passeris* türüne ait oldukları belirlenmiştir. Benekli Bülbülden (*Luscinia luscinia*) izole edilen *H. attenuatus* ROBIN1 neslinin filogenetik olarak *H. passeris* grubuna yakın olduğu (ort %96,2 identiklik) görülmüştür. Araştırmada Ak Kuyruksallayan (*Motacilla alba*) ve Sarı Kuyruksallayanda (*Motacilla flava*) belirlenen sırasıyla *H. motacillae* YWT2 ve YWT1 nesilleri monofiletik olarak karakterize edilmiş ve birbirlerine %99,4 identik bulunmuşlardır. YWT2 nesli Dünyada ilk kez Ak Kuyruksallayandan (*Motacilla alba*) rapor edilmiştir. İlgili türe ait nesiller ayrıca en yüksek filogenetik yakınlığı ortalama %97,2 oran ile *H. passeris* PADOM05 nesline göstermiştir. Çalışmada potansiyel vektör türlerinden ilk kez izole edilip karakterize edilen CIRCUM01, CIRCUM02 ve CIRCUM06 (çalışma ile ilk kez bulunup karakterize edildi) nesilleri monofiletik bir grup oluşturmuş (Şekil 4.66) ve ortalama %96,0 identik bulunmuşlardır. İlgili nesiller ayrıca araştırmada Söğütbülbülünden (*Phylloscopus trochilus*) izole edilen *H. majoris* WW2 nesli ile filogenetik gruplanma

göstermişlerdir. Filogenetik olarak ayrı bir dalda yerleşen ve Sığırcıkta (*Sturnus vulgaris*) belirlenen *H. pastoris* LAMPUR01 nesli en yüksek identikliği %97,3 ile CUKI1 nesline göstermiştir. Diğer nesillerden filogenetik olarak daha uzak belirlenen ve monofiletik bir grup oluşturan *H. palloris* WW1, *Haemoproteus* sp. RW4, CUKI1 ve CIRCUM03 nesilleri sırasıyla Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*), Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Bıyıklı Baştankara (*Panurus biarmicus*), potansiyel vektörler *C. newsteadi*, *C. nubeculosus* kompleks ve *C. circumscriptus*'tan izole edilip karakterize edilmiştir (Şekil 4.66). RW4 nesli ilk kez Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*), moleküler olarak bildirilmiştir. İlgili nesiller ortalama %97,7 genetik identiklik göstermiştir.



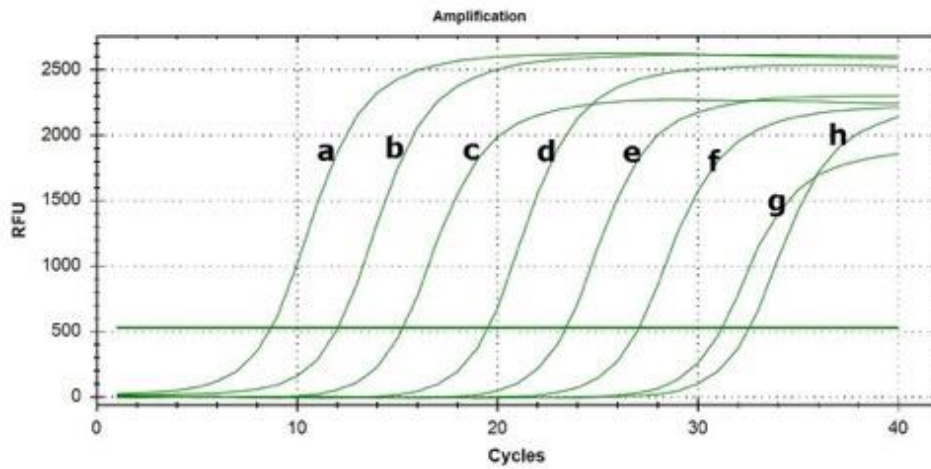
Çalışmada belirlenen *Leucocytozoon* nesillerinin (Mavi karakterde belirtilenler ilk kez tanımlanan nesiller, kırmızı karakterde belirtilenler çalışmada izole edilmiş nesilleri göstermektedir) morfolojik tür tanımlaması yapılan nesillerle birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.67’de gösterilmiştir. Söğüt Serçesi (*Passer hispaniolensis*), Ak Mukallit (*Iduna pallida*) ve Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) izole edilen sırasıyla *Leucocytozoon* sp. RECOB03, IDUPAL01 ve REB11 nesilleri birbirine yüksek identiklik (ort. %99,7) göstererek filogenetik kümelenme göstermişlerdir (Şekil 4.67). Bu nesillerden IDUPAL01 nesli Dünyada ilk kez karakterize edilmiştir. RECOB03 nesli de ilgili kuş türünden ilk kez izole edilip bildirilmiştir. Ayrıca RECOB03 neslinin morfolojik identifikasyonlarla *L. sakharoffi* türüne ait olduğu saptanmıştır. İlgili nesiller ayrıca morfolojik tür tanımlaması yapılmış MalAvi veri tabanında kayıtlı *L. majoris* CB1 nesline yakın bulunmuş (ort. %96,9 identiklik) ve filogenetik gruplanma göstermiştir (Şekil 4.67). Yine bu çalışma ile ilk kez tanımlanan Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) ve Saksığan (*Pica pica*) izole edilmiş sırasıyla ACSCI01 ve PICPIC01 nesilleri birbirlerine %99,9 identiklik göstererek gruplanma göstermiştir (Şekil 4.67). PICPIC01 nesli morfolojik identifikasyonlarla *L. berestneffi* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Yukarıdaki iki filogenetik gruba dış dal olarak bağlanan ve Kara Başlı Ötleğinde (*Sylvia atricapilla*) belirlenen SYAT22 nesli iki gruba sırasıyla ortalama %96,0 ve %96,2 genetik identiklik göstermiştir. Küçük Balabandan (*Ixobrychus minutus*) identifiye edilen CIAE02 nesli MalAvi veri tabanında kayıtlı *L. californicus* FASPA02 nesline %99,5 identiklik göstererek cluster oluşturmuştur (Şekil 4.67). Yine araştırmamızda Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*) bulunarak ilk kez tanımlanan PAHIS03 nesli CIAE02 ve FASPA02 nesillerine genetik olarak yakın bulunmuş (ort. %95,0 identiklik) ve filogenetik gruplanma göstermiştir (Şekil 4.67). Çalışmada Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*) ve Kızıl Sırtlı Örümcekkuşundan (*Lanius collurio*) izole edilen sırasıyla BT2 ve BT5 nesilleri birbirlerine %99,5 identik belirlenmiş ve PAHIS03, CIAE02 ve FASPA02 filogenetik grubuna yakın yerleşim göstermişlerdir bulunmuşlardır (Şekil 4.67). BT5 neslinin morfolojik identifikasyonlarla *L. balmoralis* türüne ait olduğu belirlenmiştir.



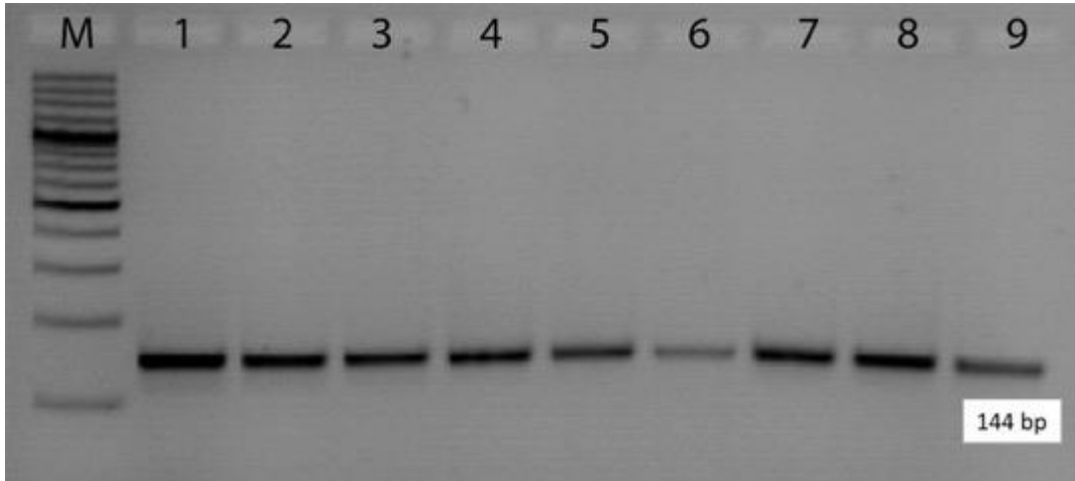
**Şekil 4.67** Araştırmada kanatlı konaklarda belirlenen *Leucocytozoon* tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BA ve ML analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmayla Dünyada ilk kez belirlenen nesiller mavi kalın karakterde diğer belirlenen nesiller kırmızı kalın karakterde gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar sırasıyla ML bootstrap desteği ve BA posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Günümüze kadar ilgili nesillerin rapor edildiği kanatlı konak aile ve tür sayısı (her neslin altında ilgili takımın rengi ile beraber sırasıyla verilmiştir) ayrıca şekil üzerinde gösterilmiştir. Dış dal olarak çalışmamızda da identifiye edilen *P. relictum* GRW11 nesli kullanılmıştır.

#### 4.5 Haemosporidian Parazitlerin Real Time PCR Analiz Sonuçları

*Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin soy düzeyinde kantitatif identifikasyonları için mt-cytb bölgesini hedef alan dizay ettiğimiz primerlerle çalışmada belirlenen çeşitli kanatlı konaklardan izole edilmiş haemosporidian nesillerine ait genomik DNA ve sekans karakterizasyonu yapılmış nesillere ait linearize plazmidlerde real time PCR analizleri sonucu tüm örneklerde amplifikasyon eğrileri belirlenmiştir (Şekil 4.68). Aynı zamanda real time PCR analizleri sonucu elde edilen ampliconlar agaroz jel üzerinde yürütülerek hedef büyüklükte (144 bp) ampliconların varlığı teyit edilmiştir (Şekil 4.69).



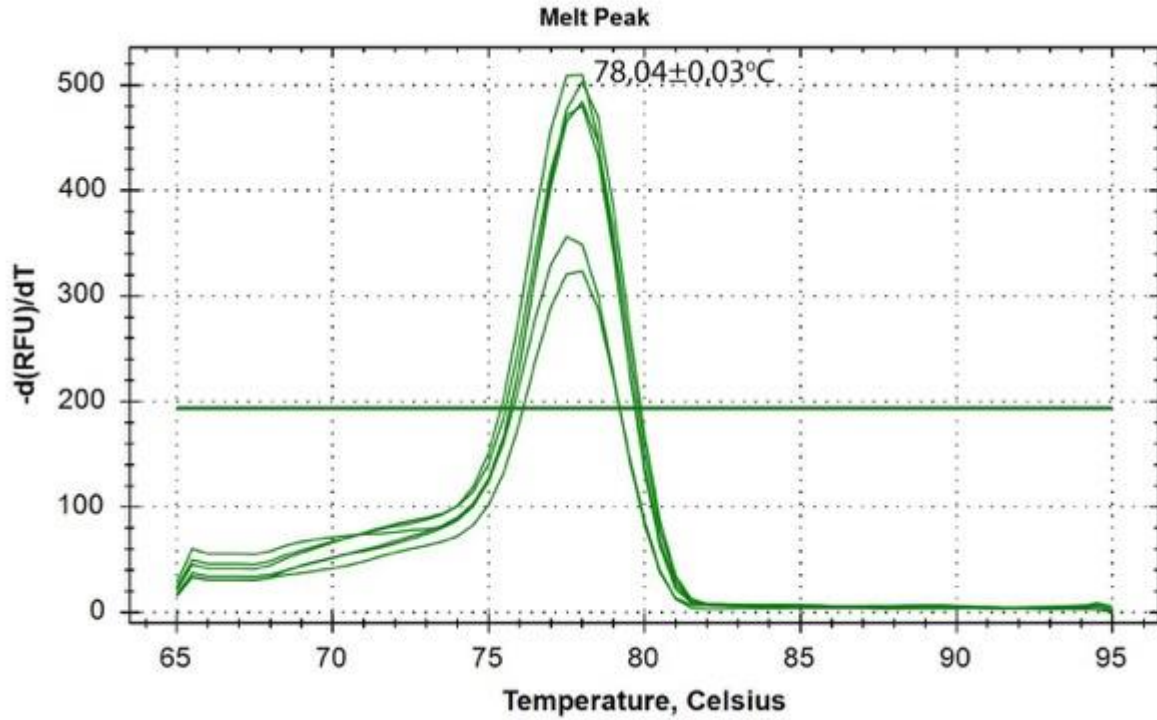
**Şekil 4.68** Sybergreen Real Time PCR’da genomik DNA ve linearize plazmid DNA izolatlarında belirlenen amplifikasyon eğrileri. a,c,f: *Haemoproteus* izolatları, b,d,g: *Plasmodium* izolatları, e,h: *Leucocytozoon* izolatları



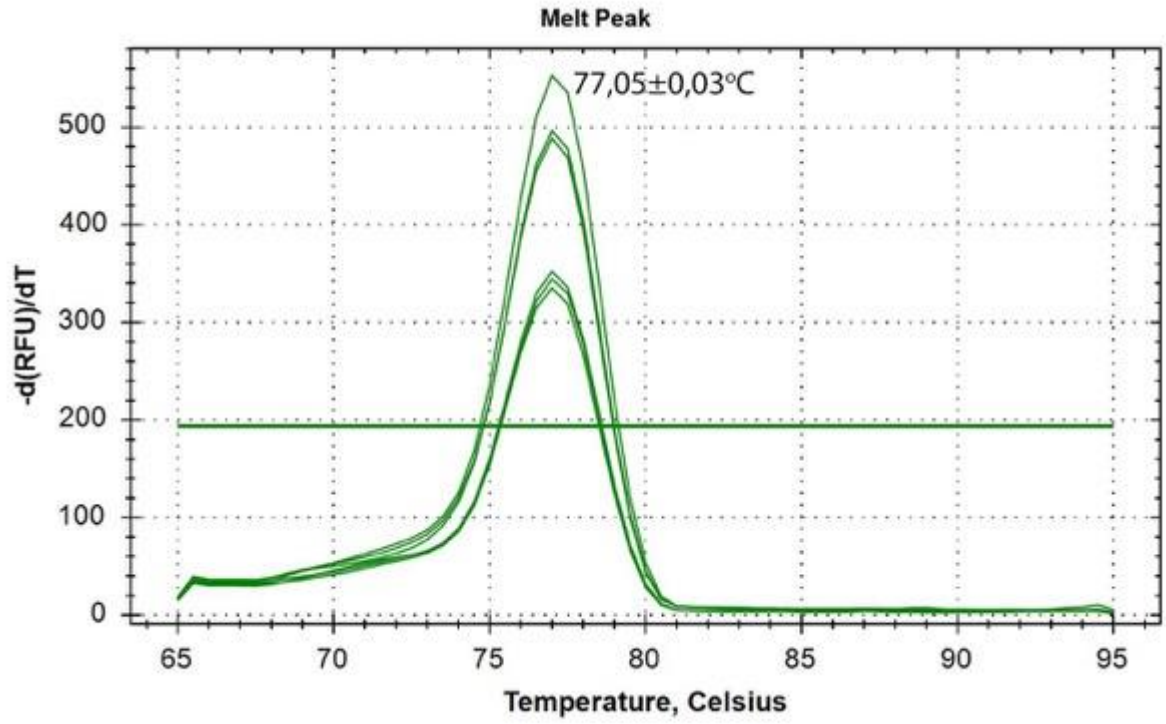
**Şekil 4.69** Sybergreen Real Time PCR’da genomik DNA ve linearize plazmid DNA izolatlarına ait ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü. M: Marker (100 bp), 1-3: *Haemoproteus* izolatları, 4-6: *Plasmodium* izolatları, 7-9: *Leucocytozoon* izolatları



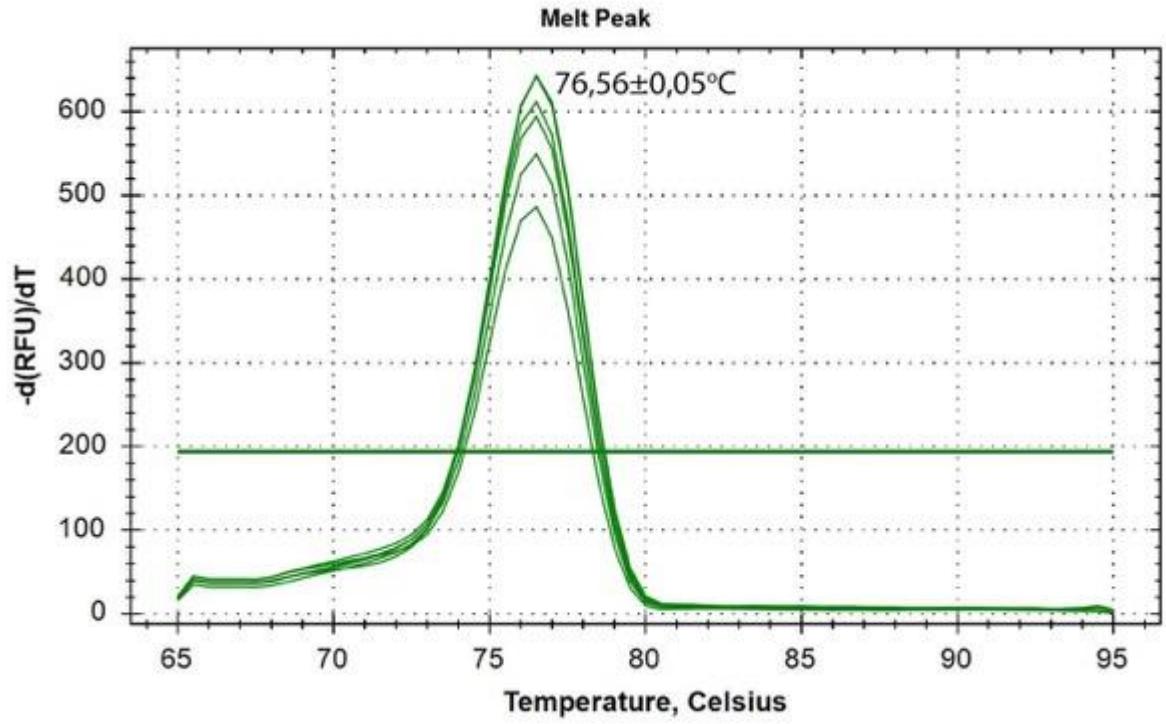
Erime eğrisi (Melting curve) analizlerinde spesifik olarak *Haemoproteus* nesillerinin  $78,04 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  ( $77,90-78,20^{\circ}\text{C}$ ), *Plasmodium* nesillerinin  $77,05 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  ( $77,00-77,20^{\circ}\text{C}$ ) ve *Leucocytozoon* nesillerinin de  $76,56 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$  ( $76,40-76,60^{\circ}\text{C}$ ) erime sıcaklığı gösterdikleri belirlenmiş (Şekil 4.70-73) ve çalışmada belirlenen izolatlar temelinde erime eğrisi analizleri ile bu üç haemosporidia soyuna bağlı nesillerin ayrılabilirdiği tespit edilmiştir. Nested PCR analizleri ile haemosporidian nesilleri yönünden pozitif belirlenen ve sonrasında sekans karakterizasyonu yapılan çeşitli kuşlardan elde edilmiş izolatlara ait genomik DNA'ların real time PCR ve erime eğrisi analizleri sonucu belirlenen erime sıcaklıklarının sekans analiz sonuçları ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca erime sıcaklıklarına göre seçilen bazı *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerine ait real time PCR ampikonları agaroz jelden pürifiye edilerek saflaştırılmış ve sonrasında real time PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen ilgili izolatlara ait nükleotid sekansları da erime eğrisi analiz sonuçlarını doğrulamıştır.



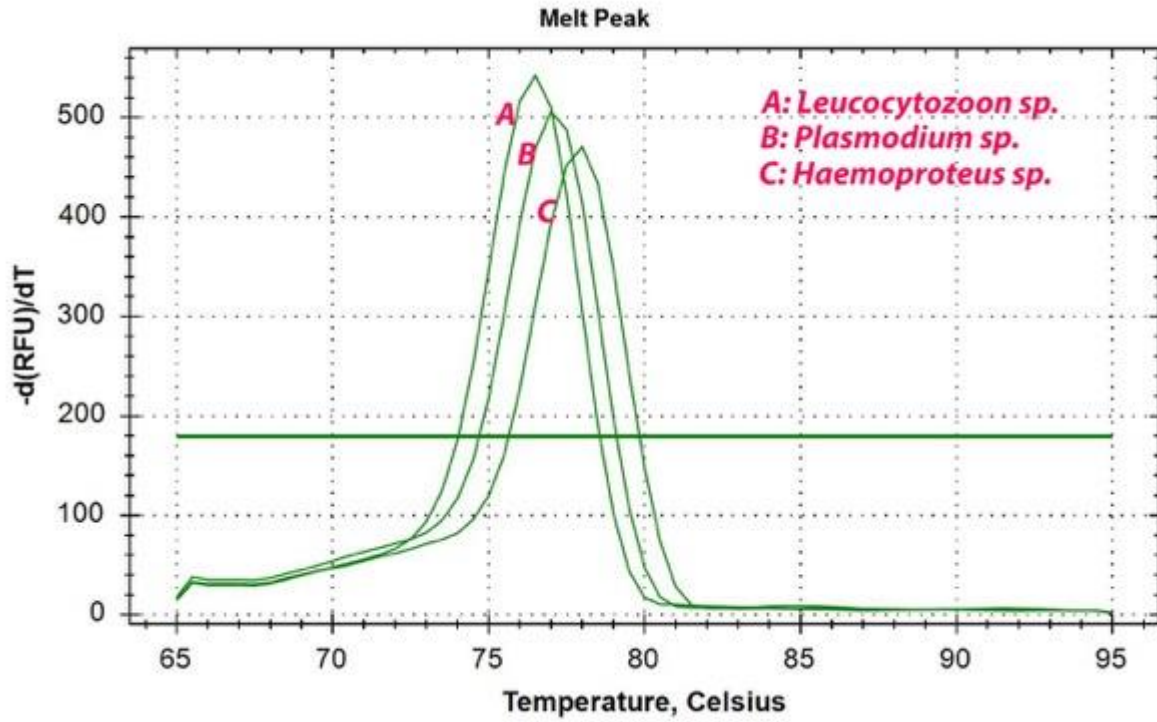
**Şekil 4.70** Sybergreen Real Time PCR'da erime eğrisi analizlerinde *Haemoproteus* nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları.



**Şekil 4.71** Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde *Plasmodium* nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları.

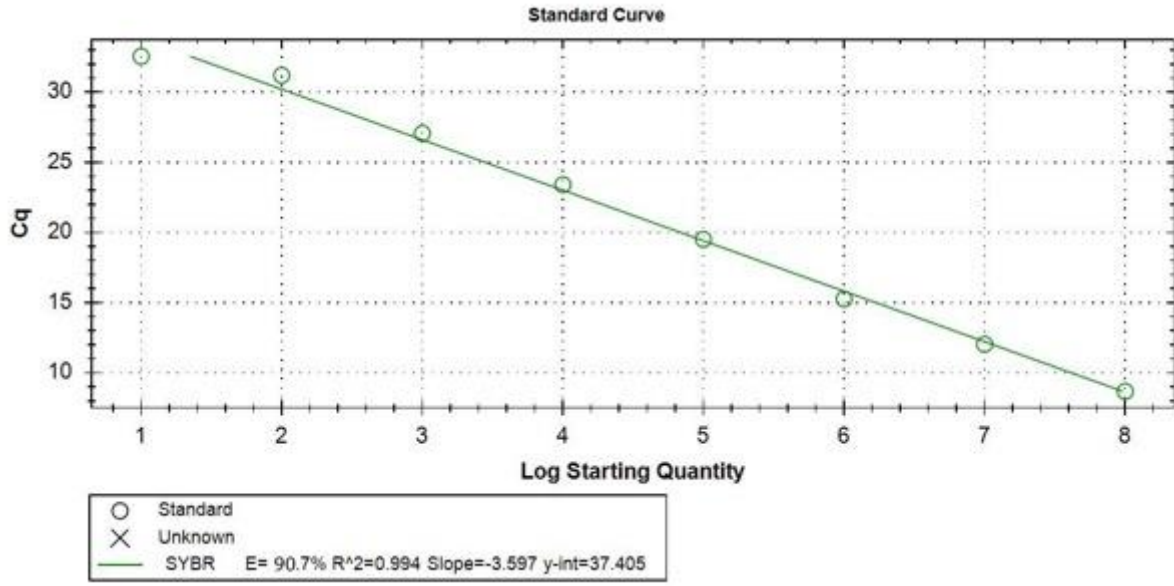


**Şekil 4.72** Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde *Leucocytozoon* nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısıları.

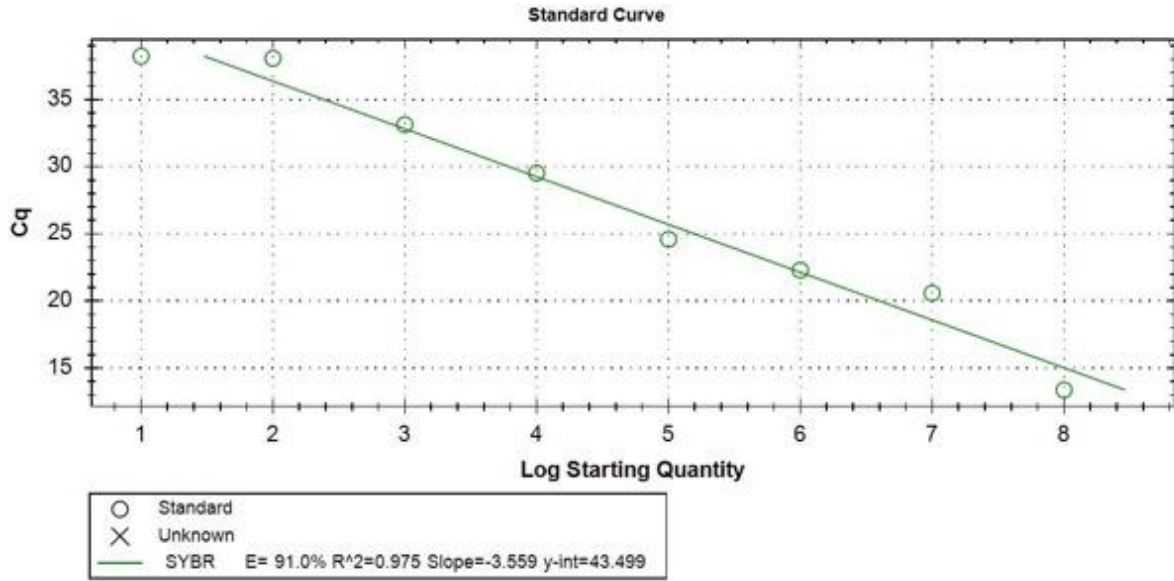


**Şekil 4.73** Sybergreen Real Time PCR’da erime eğrisi analizlerinde *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerine ait izolatlar için belirlenen spesifik erime ısılarının birlikte görünümü.

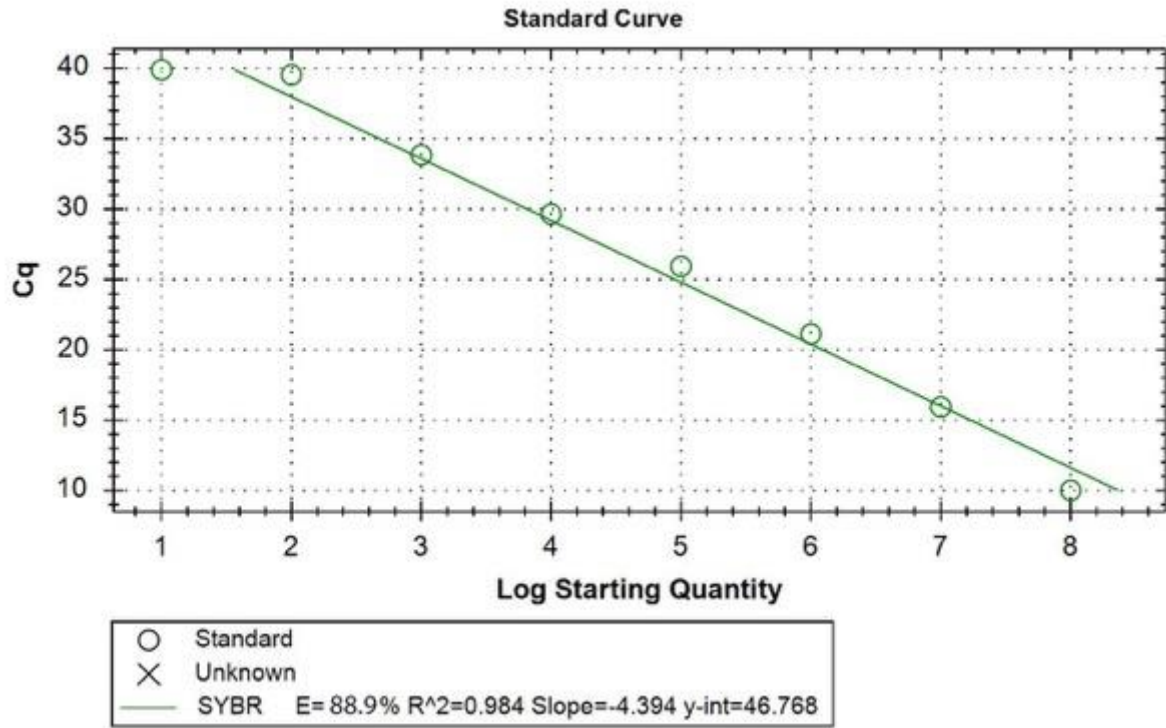
Geliştirilen sybergreen real time PCR tekniğinin sensitivite analizleri için linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğriler *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesilleri için sırasıyla Şekil 4.74-4.76’de verilmiştir. Her üç standart eğri analiz sonuçlarında da  $1 \times 10^1/\mu l$  DNA kopya düzeyinde testin etkin olarak amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. *Haemoproteus* nesilleri için real time PCR sensitivite analizlerinde  $>0.99$  saptanma katsayısıyla (coefficient of determination- $R^2$ ) slope değeri -3.60 belirlenmiş ve reaksiyon etkinliği (E) %90,7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.84). *Plasmodium* nesilleri için real time PCR sensitivite analizlerinde  $>0.97$  saptanma katsayısıyla (coefficient of determination- $R^2$ ) slope değeri -3.56 saptanmış ve reaksiyon etkinliği (E) %91,0 olarak bulunmuştur. *Leucocytozoon* nesilleri için de real time PCR sensitivite analizlerinde  $>0.98$  saptanma katsayısıyla (coefficient of determination- $R^2$ ) slope değeri -4.39 belirlenmiş ve reaksiyon etkinliği (E) %88,9 olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.74** Sybergreen Real Time PCR'da *Haemoproteus* linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı. 1:  $1 \times 10^8$ ; 2:  $1 \times 10^7$ ; 3:  $1 \times 10^6$ ; 4:  $1 \times 10^5$ ; 5:  $1 \times 10^4$ ; 6:  $1 \times 10^3$ ; 7:  $1 \times 10^2$ ; 8:  $1 \times 10^1$  kopya DNA/ $\mu$ l



**Şekil 4.75** Sybergreen Real Time PCR'da *Plasmodium* linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı. 1:  $1 \times 10^8$ ; 2:  $1 \times 10^7$ ; 3:  $1 \times 10^6$ ; 4:  $1 \times 10^5$ ; 5:  $1 \times 10^4$ ; 6:  $1 \times 10^3$ ; 7:  $1 \times 10^2$ ; 8:  $1 \times 10^1$  kopya DNA/ $\mu$ l



**Şekil 4.76** Sybergreen Real Time PCR'da *Leucocytozoon* linearize plazmid DNA izolatu ile oluşturulan standart eğri ve etkinlik oranı. 1:  $1 \times 10^8$ ; 2:  $1 \times 10^7$ ; 3:  $1 \times 10^6$ ; 4:  $1 \times 10^5$ ; 5:  $1 \times 10^4$ ; 6:  $1 \times 10^3$ ; 7:  $1 \times 10^2$ ; 8:  $1 \times 10^1$  kopya DNA/ $\mu$ l

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Avrupa ve Orta Doğu'nun en önemli sulak alanlarını içeren ülkelerinden biri Türkiye'dir. Ülkemizin üç kıta arasında geçiş noktası olması, üç tarafının denizlerle çevrili olması, iklim çeşitliliği gibi özellikleri Türkiye'yi sulak alanlar bakımından bulunduğu coğrafyanın en önemli ülkelerinden biri yapmıştır (Balkaya ve Çelikoba, 2005). Ayrıca Palearktik bölgede yer alan Türkiye Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları arasındaki kuş göç yolları üzerinde köprü vazifesi görmektedir. Aynı zamanda coğrafi konumundan dolayı farklı iklim şartlarına ve değişik yaşam ortamlarına sahip olduğu için kuş faunası açısından oldukça zengindir (Kaya vd., 1999). Doğu Avrupa ve Batı Sibirya'da kuluçkaya yatan birçok türden yüz milyonlarca kuş her yıl güneye bazen Orta Doğu ülkelerine, bazen de Güney Afrika'ya kadar Türkiye üzerinden göç ederler. Türkiye'de 18 takım ve 70 familya'ya ait 470'e yakın kuş türünün bulunduğu bildirilmiştir (Kence ve Bilgin, 1996; Gündoğdu, 2002). Göçmen kuşlar ve kuş faunası açısından bu kadar öneme sahip olan ülkemizde kanatlı haemosporidian enfeksiyonları üzerine morfolojik identifikasyona dayalı sınırlı sayıda prevalans çalışmaları dışında moleküler ekolojik ve epidemiyolojik çalışmaların bulunmadığı görülmektedir. Bu açıdan çalışmamızda kanatlı haemosporidian etkenlerinin (*Hemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Plasmodium*) göçmen kuşlar için Avrupa ve Ortadoğu'nun en önemli konaklama istasyonlarından birisi olan ve zengin kuş faunasına sahip Sultan Sazlığı ekosisteminde kanatlı konak ve vektörler bazında moleküler ekolojisinin ortaya konmuş olması ve risk potansiyellerinin belirlenmesi Türkiye için ilk ve model bir çalışma olmuştur.

Sultan sazlığı barındırdığı kuş varlığı ile Avrupa ve Ortadoğu'nun en önemli sulak alanlarından biridir. Yoğun saz ve bitki örtüsüyle kaplı, besin maddesi bakımından oldukça zengin tatlı su ekosistemi; tatlı su ekosistemi ile ekolojik olarak ilişkili tuzlu su ekosistemi, farklı ekolojik istekleri olan değişik türde çok sayıda kuşun beslenmesi, barınması, konaklanması ve kuluçkaya yatması yönünden ideal ortamlar oluşturmuştur. Ekosistemin Anadolu yarımadası üzerinde birleşen, Afrika, Asya ve Avrupa kıtaları arasında süregelen iki kuş göç yolu üzerinde bulunması, Türkiye'nin en önemli sulak alanlarından Tuz gölü, Seyfe gölü ve Ereğli sazlıkları ile ılıman iklim koşullarına sahip Akdeniz kıyı sulak alanlarına yakın olması, Sultan sazlığına kuşlar için vazgeçilmez bir sulak alan olma avantajı sağlamaktadır. Bölgede günümüze kadar 301 kuş türü tespit edilmiştir. Kuş türü ve sayısının özellikle sulak alan ekosistemindeki su seviyesinin değişimi ve aylara bağlı olarak büyük farklılık gösterdiği kaydedilmiştir (Turan, 2004). Çalışmamızda, iki sezon boyunca kuşların göç ve üreme dönemleri dikkate alınarak ekosistemin farklı noktalarında uygun sis ağıları (mist nets) ile altı dizi içerisinde 23 aileye ait 39 türden toplam 565 kuş örneklenmiştir. Her iki örnekleme sezonunda da sis ağılarıyla en



yüksek Passeriformes takımında yer alan kuşlar (2105 yılı 309 kuş, 2016 yılı 227 kuş) toplanarak halkalanmıştır. Bunu sırasıyla 17, 8, 2, 1'er örnekle Pelecaniformes, Coraciiformes, Piciformes, Charadriiformes ve Bucerotiformes takımlarındaki kuş türleri izlemiştir. Passeriformes takımında en çok yakalanıp örneklenen kuş türleri ise sırasıyla *P. hispaniolensis* (Söğüt Serçesi), *A. melanopogon* (Bıyıklı Kamışçın) ve *Pa. biarmicus* (Bıyıklı Baştankara) olmuştur.

Sivrisinekler ve *Culicoides* soyundaki sokucu sinekler medikal, veteriner ve çevresel önemleri ile Diptera dizisi içerisinde oldukça önem arz etmektedir. Bu önemleri sebebiyle örneklerin detaylı identifikasyonu temelinde ayrıntılı DNA barkod referans kütüphaneleri oluşturulmaya başlanmış ve Barcode of Life Data Systems (BOLD; [www.boldsystem.org](http://www.boldsystem.org)) (Ratnasingham ve Hebert, 2007) üzerinden örneklerin tür identifikasyonları için spesifik markerlar geliştirilmiştir. DNA barkodlama amacıyla en yaygın kullanılan ve referans olan gen bölgelerinin başında mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mt-COI) bölgesi gelmektedir. Mt-COI bölgesini kodlayan gen, enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu kullanan organizimlerde universal olarak bulunmasıyla birçok organizmanın filogenetik analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hebert vd., 2003b; Nielsen ve Kristensen, 2015). Dünyanın birçok bölgesinde vektör potansiyeli olan başta sivrisinek, *Culicoides* ve simuliid türleri olmak üzere birçok artropod üzerine moleküler düzeyde genotipleme ve DNA barkodlama çalışmaları artan bir ivme ile devam etmesine karşın Türkiye'de ilgili insektler üzerine genetik çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda Sultan Sazlığı yöresinin çeşitli sivrisinek ve *Culicoides* türlerinin gelişimi için oldukça uygun bir ekosisteme sahip olduğu görülmüştür. Çalışma periyodu boyunca insekt tuzakları ile çok sayıda sivrisinek ve *Culicoides* örnekleri toplanmıştır. Sivrisinek türleri içerisinde en yaygın tür *An. sacharovi* belirlenmiş bunu sırasıyla *Cx. pipiens* kompleks, *An. maculipennis*, *Ae. vexans* ve *An. claviger* türleri izlemiştir. *An. sacharovi*, Maculipennis kompleks içerisinde yer almakta olup *An. atroparvus* ve *An. labbranchiae* ile birlikte Palearktik bölgede geçmişten günümüze en etkin sıtma vektörlerinden biri olarak nitelenmektedir (Romi vd., 2001; Linton vd., 2003). Çalışmada elde edilen bulgularla araştırma yöresinin turistik potansiyeli de göz önüne alındığında *P. vivax* sıtmasının en etkin vektörü olarak nitelenen *An. sacharovi*'nin uygun ekosistem içerisinde yüksek popülasyonlara ulaşmasının, yöreye gelebilecek olası portörler de dikkate alındığına yüksek risk arz ettiği görülmüştür. Türkiye'de *An. sacharovi* üzerine moleküler araştırmaların sınırlı olduğu gözükmemektedir. Bugüne kadar, morfolojik özelliklerine göre Türkiye'den 13 *Anopheles* türü rapor edilmiştir (Postiglione vd., 1973; Ramsdale ve Snow, 2000). Buna karşın, *An. sacharovi*'nin de yer aldığı Maculipennis Kompleks grubundaki bazı türlerin yumurta, larva ve erginlerinin morfolojik teşhisleri oldukça güçtür ve hatta bazı durumlarda imkansızdır (Patsoula



vd., 2007). Bu açıdan ilgili kompleks türlerin identifikasyonunda moleküler teknikler önem kazanmıştır. Akıner ve Çağlar (2010), Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde yayılış gösteren *Anopheles* türlerini araştırdıkları çalışmalarında Maculipennis Kompleks grubundaki türlerin identifikasyonu ve ayırımında ribozomal ITS-2 gen bölgesini kullanmışlar ve *An. sacharovi* ile birlikte *An. maculipennis* ss. ve *An. melanoon* nesillerini yaygın olarak belirlemişlerdir. Şimşek vd. (2011), Adana, Antalya, Burdur, Hatay, Isparta, Kayseri, Niğde, Mersin, Muğla ve Osmaniye'den örnekledikleri sivrisinek nesillerinden izole ettikleri gDNA izolatlarının ribosomal ITS-2 gen bölgelerine göre karakterizasyonlarını gerçekleştirmişler ve *An. sacharovi*, *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* türlerinin identifikasyonu ve dağılımlarını belirlemişlerdir. Araştırmada (Simsek vd., 2011) ayrıca genel olarak bilindiği gibi (Hebert vd., 2003a) ilgili gen bölgesinde intraspesifik farklılıkların bulunmadığını, interspesifik farklılıkların ise yüksek olduğuna dikkat çekmişler ve çalışmadaki türlerin ayırımında ilgili gen bölgesinin etkinliğine dikkat çekmişlerdir. Ancak bilindiği üzere özellikle insektlerde evrimsel analizler ve filogenetik yapılanmaların araştırılmasında ITS-2 gibi protein kodlamayan ribosomal gen bölgeleri intraspesifik nükleotid varyasyonlarının çok düşük olması sebebiyle genellikle tercih edilmemektedir (Hebert vd., 2003a). Araştırmamızda Sultan Sazlığı yöresinde belirlenen sivrisinek ve *Culicoides* nesillerinin identifikasyonları standart morfolojik kriterlere göre referans interaktif yazılımlar (Rawlings, 1996; Schaffner, 2001; Mathieu vd., 2012) ile gerçekleştirilmiş ve sonrasında tür identifikasyonları mt-COI DNA barkodları ile konfirme edilmiş ve nesillerin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Ribosomal DNA (rDNA) ile kıyaslandığında mitochondrial DNA COI gen bölgesinin bazı avantajları bulunmaktadır: 1-) Evrimleşme oranı 5-10 kat daha hızlıdır (Castro vd., 1998) ki bu durum bu gen bölgesinin özellikle tür bazında sınıflandırmada öne çıkmasını sağlamaktadır (Beebe vd., 2002; Hebert vd., 2003b), 2-) mt-DNA haplotiptir ve böylece sekanslamadan önce yeterli konsantrasyonda PCR ürünleri mevcut ise klonlama basamağına gereksinim göstermez, klonlama basamağı moleküler marker olarak rDNA kullanıldığında gereklidir (Hemmerter vd., 2009), 3-) Genom içerisinde çok sayıda kopyası bulunmaktadır ki bu durum amplifikasyonu çok daha kolay hale getirmektedir (Ruiz-Lopez vd., 2012). Daha üst taksonomideki COI sekansları arasındaki farklılıklar artış gösterir (Cywinska vd., 2006). COI barkodlama aralığı tür içinde genellikle %2'dir (Hebert vd., 2003b). Türler arasındaki yüksek farklılıklar muhtemelen kriptik türlerin varlığıyla alakalı olarak coğrafik izolasyondan kaynaklanmaktadır (Hebert vd., 2003b; Wang vd., 2012). Araştırmamızda *Anopheles* soyunda *An. sacharovi*, *An. maculipennis* ve *An. claviger* olmak üzere üç tür belirlenmiş bunlardan *An. sacharovi* en yaygın sivrisinek türü bulunmuştur. Çalışmamızda araştırma yöresinde izole edilen *An. sacharovi* haplotipleri arasında ortalama  $0,4 \pm 0,2$  genetik farklılık belirlenmiş ve filogenetik olarak monofiletik

olduğu görülen bu haplotiplerin Azerbaycan ve İran izolatlarına yakın oldukları belirlenmiştir. *An. maculipennis* türü içinde iki haplotip belirlenmiş ve aralarındaki genetik farklılık  $2,1 \pm 0,6$  bulunmuştur. İki ayrı filogenetik küme içerisinde yer alan bu haplotipler İran ve Belçika izolatu ile yüksek identik bulunmuştur. Çalışmamızda *An. claviger* için belirlenen haplotip ise en yüksek yakınlığı Hollanda izolatuyla göstermiş ve birlikte ayrı bir kümede yer almıştır. Bu proje çalışması ile ilk kez Türkiye’de ilgili *Anopheles* türlerinin mt-COI DNA barkodları sağlanmış ve filogenetik yapılanmaları üzerine veriler elde edilmiştir.

Çalışmamızda yörede ikinci yaygın belirlenen *Culex pipiens* komplekste yer alan sivrisinekler tüm dünyada yayılış göstermekte olup birçok önemli hastalığın naklinde potansiyel vektörlük yapmaktadırlar (Shaikevich vd., 2016). Günümüzde bu kompleks içinde birçok tür, alt tür ve formların varlığı gösterilmiş olup bunların çoğunun West Nile virus ve Rift Valley Fever virus gibi arboviruslara, filarial nematodlara ve kanatlı plasmodium türlerine vektörlük yaptıkları ortaya konmuştur (Farajollahi vd., 2011). Bunun yanında *Culex* soyunun, tarif edilen 750’den fazla türüyle (Becker vd., 2003) birlikte yüksek medikal ve veteriner öneme sahip olduğu bilinmektedir (Werblow vd., 2014). *Culex* soyu içerisinde *Culex* alt soyuna bağlı Avrupa’da 7 türün varlığı bilinmekte olup (Hubalek, 2008), bunların arasında *Cx. pipiens* en yaygın holarktık tür olarak nitelenmektedir (Werblow vd., 2014). Palaearktik biyoformları *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* ile birlikte *Cx. pipiens*’in yer aldığı *Cx. pipiens* kompleks ayrıca Avrupa’da görülmeyen *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* ve *Cx. globocoxitus* türlerini de kapsamaktadır (Farajollahi vd., 2011). Bu kompleks taksa içerisinde *Cx. pipiens* Linnaeus, 1758 ve *Cx. quinquefasciatus* Say, 1823 nesillerinin sırasıyla ılıman ve tropikal bölgelerde en yaygın sivrisinek türleri olduğu bilinmektedir (Shaikevich vd., 2016). *Culex pipiens* sensu stricto L. 1758 olarak bilinen kompleksin, “pallens” Coquillett 1898, “molestus” Forskål 1775 ve “pipiens” olmak üzere üç intraspesifik formu bulunmaktadır (Ward, 1992). Bu kompleksin üyelerinin taksonomik durumu üzerine, çelişkili kanıtların bulunması ve özellikle *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* s.s. form *pipiens* ve/veya form *molestus* arasında çeşitli hibrit popülasyonların var olması (Urbanelli vd., 1997; Gomes vd., 2012; Micieli vd., 2013) neticesinde bir görüş birliği henüz bulunmamaktadır. Ayrıca *Cx. pipiens pallens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* gibi *Culex pipiens* kompleksin diğer üyeleri arasında da Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde hibritlerin varlığı rapor edilmiştir (Ohashi vd., 2014). Türkiye’de *Cx. pipiens* kompleks üzerine yapılan çalışmaların genellikle ergin ve larva dönemleri bazında morfolojik identifikasyonlara dayalı prevalans çalışmaları tarzında olduğu görülmektedir. Bu çalışmaların çoğunda *Cx. pipiens* kompleks tek isimle *Cx. pipiens* türü olarak ele alınmış ve bir çok bölgede farklı oranlarda dağılım gösterdikleri kaydedilmiştir (Yildirim vd., 2011; Şahingöz Demirpolat, 2016). Türkiye’de *Cx. pipiens* kompleks üyelerinin genotiplendirilerek karakterizasyonlarının

sağlandığı üç çalışmanın (Ergunay vd., 2014; Gunay vd., 2015; Şahingöz Demirpolat, 2016) varlığı gözükmemektedir. Günay vd. (2015); Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen ve morfolojik analizlerle *Culex* soyunda belirlenen *Cx. (Barraudius) modestus*, *Cx. laticinctus*, *Cx. mimeticus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens form molestus* (Laboratuvar kolonisi olarak belirtilmiş), *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. theileri*, *Cx. torrentium*, *Cx. tritaeniorhynchus* ve *Cx. hortensis* türlerinin mt-COI gen bölgesine göre barkodlamalarını ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. Bununla birlikte coğrafik olarak yalnızca tropikal bölgelerde yayılım gösteren ve Avrupa'da bulunmadığı rapor edilen (Smith ve Fonseca, 2004) ve yine morfolojik olarak *Cx. pipiens* kompleks tür veya biyoformlarından ayrılamayan *Cx. quinquefasciatus* türünün ilgili çalışmada (Gunay vd., 2015) Türkiye'den ilk kayıt olarak bildirilmiş olması da ileri konfirmasyona ihtiyaç göstermektedir. Nitekim mt-COI parsiyel sekans analizleriyle *Cx. pipiens* kompleks tür ve/veya biyoformlarının hibrit nesiller de göz önüne alındığında kesin sınırlarla ayrılmadığı ve filogenetik yapılanmalarının kompleks yapı sergilediği bilinmektedir (Smith ve Fonseca, 2004; Şahingöz Demirpolat, 2016). Bu açıdan çeşitli referanslarda da bildirildiği ilgili kompleksteki tür veya biyoformlar microsatellite analizleri gibi moleküler tekniklerle genotiplendirilmekte ve identifikasyonları sağlanmaktadır (Smith ve Fonseca, 2004; Bahnck ve Fonseca, 2006; Shaikevich vd., 2016). Benzer olarak Ergünay ve ark. (2014) da Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen sivrisinek örneklerinde Batı Nil Virüsü'nu araştırdıkları çalışmalarında mt-COI sekans analizleri ile *Cx. quinquefasciatus* türünün varlığını rapor etmişlerdir. Tüm bu verilerin hibrit nesiller de göz önüne alınarak bu komplekse ait tür ve/veya biyoformlar ile *Cx. torrentium* için mevcut referans genotipleme yöntemleri ile konfirmasyona ihtiyacı olduğu düşünülmüştür. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında yürütülmüş olan bir tez çalışmasında (Şahingöz Demirpolat, 2016) Kayseri yöresinden örneklenmiş *Cx. pipiens* kompleks örnekleri içinde *Cx. pipiens* biyoformları ile *Cx. torrentium* TaqMan real time PCR ve microsatellite analizleri ile araştırılmış, mt-COI sekans analizleri ile izolatlar karakterize edilmiş ve Türkiye'de ilk kez hibrit nesillerin varlığı ortaya konmuştur. Çalışmamızda *Cx. pipiens* kompleks içinde üç farklı haplotip karakterize edilmiş ve bu haplotipler arasında ortalama  $1,1 \pm 0,4$  genetik farklılık belirlenmiştir. Üç haplotipin de filogenetik ağaç üzerinde ayrı kümelerde yer aldığı görülmüş ve bu haplotiplerden SS-Cx.pip1 İran (JQ958371) ve Portekiz izolatlarıyla (LC102132, LC102133) %100 identiklik göstererek filogenetik gruplanma göstermiştir. SS-Cx.pip2 haplotipi yine bir İran izolatıyla (JQ958370) %99,8 benzerlik gösterirken, Türkiye ve Amerika Birleşik Devletlerinden rapor edilmiş bazı izolatlar ile %100 identik bulunmuştur. Diğer haplotiplerden daha uzak belirlenen SS-Cx.pip3 haplotipi ise yine Türkiye'den rapor edilmiş bir izolatla (KU949592) %100 identik bulunmuş ve ayrı bir kümede yer almıştır. Tüm bu veriler Sultan Sazlığı yöresinde farklı genotipik

karakterde *Cx. pipiens* kompleks nesillerine ait popölasyonların varlığını ve gelişimleri için bölgenin uygun bir ekosistem oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda Sultan Sazlığı ekosisteminde daha düşük popölasyon yoğunluğunda belirlenen *Ae. vexans* Yeni ve Eski Dünyada taşkın su sivrisineği olarak bilinmekte olup Dünyada yaygın görülen türlerden biridir (Fyodorova vd., 2006; Darsie vd., 2016). Bu irrite edici tür yağmur ve takiben su birikimleri ve suyun çekilmesinin devamlı olduğu taşkın suların görüldüğü habitatlarda yüksek popölasyon yoğunluklarına ulaşabilir (Solorzano vd., 2010). *Ae. vexans* agresif insan sokucu bir tür olarak bilinmekte olup çoğunlukla memelilerden nadiren de kuşlardan kan emdiği bilinmektedir (Hassan vd., 2003; Gingrich ve Williams, 2005). *Ae. vexans* başta Batı Nil Virusu, St. Louis ensefaliti, doğu at ensefaliti ve Yellow Rift Valley fever olmak üzere 30'un üzerinde virüsü nakledebildiği (Goddard vd., 2002; Cupp vd., 2004), bununla birlikte *Dirofilaria* türlerine (Ludlam vd., 1970; Yildirim vd., 2011) ve kanatlı *Plasmodium* (Inci vd., 2012) etkenlerine de vektörlük yapabildiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Türkiye'de günümüze kadar *Ae. vexans* üzerine daha çok morfoloji tabanlı prevalans çalışmalarının (Bişkin vd., 2010) yapıldığı ve çeşitli bölgelerde farklı oranlarda dağılıma sahip olduğu bildirilmesine karşın moleküler karakterizasyon ve filogenetik yapıları üzerine herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *Ae. vexans* nesillerinin mt-COI barkodları elde edilmiş ve filogenetik karakterizasyonu yapılmıştır. İlgili tür içerisinde bir haplotip belirlenmiş olup bu haplotip Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'dan rapor edilmiş izolatlara genetik olarak yüksek identiklik göstermiştir.

*Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) soyundaki sokucu sinekler kan ile beslenen en küçük sinekler olarak bilinmekte olup vücut uzunlukları 1-3 mm arasında değişmektedir (Mellor vd., 2000). *Culicoides* soyu medikal ve veteriner öneme sahip birçok patojene biyolojik vektörlük yapan çok sayıda türü içermesiyle önem arz etmektedir. Şimdiye kadar birçok nematod ve protozoon türünün yanısıra 50'nin üzerinde arbovirus türü çeşitli *Culicoides* türlerinden izole edilmiş olup bu türlerin veteriner (Mellor vd., 2000; Meiswinkel vd., 2004) ve insan patojenlerinin (Linley, 1985; Carpenter vd., 2013) naklindeki rolleri üzerine derlemeler yazılmıştır. *Culicoides* türlerinin insanlardan oportunistik beslenmesi de ayrıca turizm, ormancılık ve tarım endüstrisi üzerine etki gösterebilmektedir (Mellor vd., 2000). Günümüzde *Culicoides* sineklerinin en büyük ekonomik etkisi mavi dil virüsü (BTV), epizootic haemorrhagic disease virüsü (EHDV) ve Afrika At Vebası virusunu (AHSV) nakletmeleriyle ilişkilidir. *Culicoides*lerin son zamanlarda Orthobunyavirus ve Schmallenberg virusun da vektörü oldukları ortaya konmuştur (Elbers vd., 2013). Ayrıca çeşitli *Culicoides* türleri kanatlı haemosporidianlarından *Haemoproteus* türlerine ait nesillere aktif vektörlük yapmaktadır

(Bernotiene ve Valkiunas, 2016). *Culicoides* soyu karışık bir soy olarak tarif edilmesine (Jones vd., 1985) karşın yaklaşık son otuz yıl içinde *Culicoides* türleri üzerine taksonomik çalışmaların büyük çoğunluğunun morfolojik analizlere dayandığı görülmektedir. Sistematik için “moleküler entomoloji”nin gelişimi klasik taksonomi uzmanlığının gelişimine hızlı bir alternatif oluşturmuş (Tautz vd., 2003), genetik karakterizasyon ve *Culicoides* türlerinin filogenetik tür konsepti yoluyla ayrımları artan bir önem kazanmıştır (Harrup vd., 2015). Bu proses özellikle arboviruslar ve *Haemoproteus* türlerine ait nesillerin yeni coğrafik bölgelerde ortaya çıkmasıyla hızlanmış olup klasik taksonomik uzmanlığın yokluğunda epidemiyolojik sorulara yanıt oluşturma için lokal faunanın hızlı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır (Carpenter vd., 2009). *Culicoides* oldukça yüksek çeşitliliğe sahip bir soy olup şimdiye kadar tarif edilmiş 1300’ün üzerinde tür ile tüm dünyada yayılış göstermektedir (Harrup vd., 2015). Bu soy içerisinde Avrupa’da birçok türü tarif edilen *Culicoides* alt soyu oldukça önemli bir gruba oluşturmaktadır. *Culicoides* alt soyunda Türkiye’nin de içerisinde yer aldığı Palearktik bölgede bulunan tür sayısı kesin olarak bilinmemekte olup göstermiş oldukları geniş morfolojik çeşitlilik sebebiyle birçok araştırmacı tarafından “tür kompleksleri” olarak ifade edilmişlerdir. Bu son durum da ilgili taksayı birleştirmekte ve muhtemelen birçok tarif edilmemiş türü gizlemektedir (Meiswinkel vd., 2004; Pages vd., 2009). Bunun yanında farklı türlerin intraspesifik morfolojik ve genetik varyasyonlarının coğrafik dağılımlarını ortaya çıkarmak oldukça önem arz etmektedir (Nielsen ve Kristensen, 2015). *Culicoides*lerin tür düzeyinde identifikasyonları bazı durumlarda uzman taksonomistler için dahi güçlük oluşturabilmektedir. Tür kompleksleri içindeki sibling türlerin morfolojik ayrımlarının oldukça güç olduğu bildirilmiştir (Meiswinkel vd., 2004; Pages vd., 2009). Bu zorluğun üstesinden gelebilmek için özellikle evcil hayvanlarda hastalık oluşturan etkenlerin yayılımında sorumlu olan türler başta olmak üzere *Culicoides* türlerinin ortaya çıkarılmasında moleküler teknikler (COI-barkodları veya diğer moleküler markerlar) kullanılmaya başlanmıştır (Cetre-Sossah vd., 2004; Gomulski vd., 2006; Nolan vd., 2007; Augot vd., 2010). Örneklerin tür düzeyinde DNA barkod identifikasyonlarını takiben yeni morfolojik karakterlerin bulunması veya yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılan tür identifikasyonlarının konfirmasyonu mümkün olmuştur (Nielsen ve Kristensen, 2015). Türkiye’de günümüze kadar *Culicoides* türlerine ait nesillerin genetik karakterizasyonları üzerine oldukça sınırlı veri bulunmaktadır. Bu sınırlı çalışmalardan birinde (Dik vd., 2014) Güney ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinden toplanmış *Culicoides* soyunda *Oecacta*, *Beltranmyia* ve *Monoculicoides* soy altlarında yer alan sırasıyla *C. schultzei*, *C. circumscriptus* ve *C. nubeculosus* türlerinin ribozomal ITS-1 gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler identifikasyonu yapılmıştır. Türkiye’de *Culicoides* türlerinin mt-COI gen bölgesi bazında karakterizasyonlarının ve DNA barkodlarının sağlandığı kapsamlı yalnızca bir çalışma (Yıldırım

vd., 2016) bulunmaktadır. Bu çalışmada (Yıldırım vd., 2016) Batı Karadeniz Bölgesi ve Konya yöresinden toplanmış *Culicoides pulicaris* komplekste yer alan tür ve/veya haplotiplerin mt-COI gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonları yapılmış ve filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur. İlgili çalışmada (Yıldırım vd., 2016) Pulicaris komplekste analizlere dahil edilen izolatlara ait nükleotid sekanslarında 22 farklı haplotipi ortaya koyan 151 polimorfik bölge saptanmış ve *C. fagineus*, *C. flavipulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadii*, *C. pulicaris*, *C. punctatus* türleri moleküler olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Çalışmamızda Sultan Sazlığı yöresinde en yaygın türler *C. nubeculosus* kompleks türleri olarak belirlenirken en düşük yayılımı gösteren türler ise *C. dunningtoni* ve *C. gejjelensis* bulunmuştur. *C. nubeculosus* kompleksde yer alan türlerde kanat morfolojisi büyük ölçüde simetrik bir yapı sergilemekte olup kanat morfolojisine göre tür identifikasyonları zorluk arz etmektedir (Mathieu vd., 2012). Bu amaçla çalışmada ilgili komplekste belirlenen dişi örneklerden seçilen örneklerin spermateka yapısı incelenmiş ve tamamının *C. riethi* türüne ait oldukları görülmüştür. Ayrıca bu morfolojik identifikasyon sonuçları sekans analizleri ile de konfirme edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar *C. nubeculosus* kompleks olarak nitelenen nesillerin büyük olasılıkla *C. riethi* türüne ait olabileceğini göstermiştir. Çalışmada belirlenen türler arasında *C. riethi*, *C. circumscriptus*, *C. submaritimus*, *C. gejjelensis*, *C. dunningtoni*, *C. longipennis* ve *C. festivipennis* türlerine ait nesiller için Türkiye’de ilk olarak mt-COI DNA barkodları sağlanmış ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Ayrıca *C. submaritimus* ve *C. longipennis* nesillerine ait mt-DNA barkodları Dünyada ilgili türler için ilk moleküler verileri oluşturmuş ve *C. longipennis* türü çalışmamızla moleküler taksonomiye kazandırılmıştır. Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen türlere ait mt-COI sekansları arasında 27 farklı haplotipi ortaya koyan 158 polimorfik bölge saptanmıştır. Bu sonuçlar karakterize edilen türlerde intraspesifik ve interspesifik nükleotid farklılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca filogenetik analizler tüm türlere ait nesillerin monofiletik karakterde olduğunu göstermiştir. Çalışmada morfolojik analizlerle *C. circumscriptus* olarak tanımlanmış haplotiplerden SSCcircum1,2,3,5 haplotiplerinin birbirine genetik olarak daha yakın olduğu ve filogenetik gruplanma gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatlar İsveç’ten rapor edilmiş izolatlarla da genetik olarak yakın bulunmuşlardır. SSCcircum4 haplotipi ise yukarıdaki haplotiplerden genetik olarak daha uzak belirlenmiş ve Cezayir’den kaydedilmiş bir izolatla en yüksek identikliği göstermiştir. Çalışmada karakterize edilen iki *C. festivipennis* haplotipi arasında genetik farklılık düşük bulunmuş ve bu haplotipler en yüksek identikliği İsveç’ten bildirilmiş bir izolatla göstermiştir. *C. gejjelensis* için belirlenen bir haplotipin Slovakya’dan bildirilmiş bir izolatla çok yakın olduğu, Fransa izolatıyla ise %2,0 genetik farklılık gösterdiği görülmüştür. *C. punctatus* haplotipleri arasındaki genetik farklılık da düşük ( $0,4 \pm 0,2$ ) belirlenmiş ve bunlardan SSCpunc3 haplotipi Batı Karadeniz

izolatlarından ERU Cpun1 ve ERU Cpun6 ile en yüksek identikliğı gösterip (%99,6) küme oluşturmuştur. SSCpunc1,2,4 haplotipleri ise Batı Karadeniz izolatlarından ERU Cpun5 ile Danimarka ve İngiltere izolatlarına yüksek derecede identik belirlenmiştir (%99,9). *C. newsteadi* içinde belirlenen bir haplotipin yine Batı Karadenizden rapor edilmiş bir izolatla %99,8 benzer olduğu görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen *C. riethi* haplotipleri arasında ortalama %0,5 genetik farklılık tespit edilmiş ve SSCrieth5 haplotipi İsveç izolatlarına daha yakın bulunarak (%99,7) birlikte alt küme oluşturmuştur. SSCrieth1,2,3,4,6 haplotipleri de İsveç ve Slovakya'dan rapor edilmiş izolatlarla sırasıyla ortalama %1,0 ve %1,3 genetik farklılık göstermiştir. Bu çalışma ile Dünyada ilk kez mt-COI barkodlaması ve filogenetik karakterizasyonu sağlanan *C. longipennis* için iki haplotip belirlenmiştir. Bu haplotipler arasında %1,3 genetik farklılık görülmüştür. Ayrıca *C. longipennis*'in mt-COI gen bölgesi filogenisine göre incelenen türler içerisinde *C. riethi*'ye daha yakın olduğu ve birlikte üst küme oluşturdukları görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen *C. dunningstoni* haplotipleri arasında ortalama %0,4 saptanmış olup ilgili haplotipler bir arada küme oluşturmuş ve en yüksek identikliğı %99,1 ile İsveç'ten bildirilmiş bir izolatla göstermiştir. Yine bu çalışma ile Dünyada ilk kez mt-COI barkodlaması ile karakterize edilen *C. submaritimus* için 4 haplotip belirlenmiştir. Bu haplotipler arasında ortalama genetik farklılık %0,3 bulunmuş ve *C. submaritimus*'un incelemesi yapılan türlerden filogenetik olarak daha uzak küme oluşturduğu görülmüştür.

Kan emici insekt türlerinin vektörlük potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda vektör etkinliğı üzerine coğrafik alan, ekolojik faktörler ve kan beslenmesinde konak tercihlerinin önemli olduğu bilinmektedir (Rossi vd., 1999; Garcia-Rejon vd., 2010). Bir bölgede vektörlük potansiyeli belirlenen bir türün diğer bazı bölgelerde vektör etkinliğinin düşük olduğu veya hiç olmadığı görülmektedir. Kan ile beslenen (haematophagous) artropodların beslenme yapıları ve konak tercihleri, birçok patojenin çoğalması ve omurgalı konaklara bulaşması açısından oldukça önemlidir (Dye ve Hasibeder, 1986). Vektörlerde beslenme yapılarının ve konak tercihlerinin belirlenmesinin, vektör-kaynaklı hastalıklarla etkili mücadele stratejilerinin ve politikalarının oluşturulmasına, salgın risklerinin azalmasına ve hem insan hem de hayvanlarda bu hastalıkların ekoepidemiolojilerinin daha iyi anlaşılmasına oldukça önemli katkısı vardır. Çalışmamızda kanatlı kanı ile beslenme açısından en yüksek pozitiflik (%60,0) yörede yaygın sivrisinek türlerinden biri olarak belirlenen *Cx. pipiens* kompleks türlerinde saptanmış olup ilgili türün kanatlı *Plasmodium* etkenlerinin nakli açısından risk oluşturduğu düşünülmüştür. Benzer şekilde Amerika (Gomez-Diaz ve Figuerola, 2010) ve Avrupa'da (Figuerola vd., 2007; Vazquez vd., 2010) yapılan çeşitli araştırmalarda *Cx. pipiens*'in kan beslenmesinde kanatlı konak spekturumu %64-97 oranında belirlenmiş ve memeli konaklara göre kan beslenmesinde kanatlı konak tercihi önemli bulunmuştur. Bruno Gomes vd. (2013),



Portekiz’de örnekledikleri *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* biyoformlarının kan beslenmesinde serolojik yöntemlerle kanatlı tercihinin %90’ın üzerinde belirlemişler ve bu kanatlıların büyük çoğunluğunun Passeriformes takımında yer aldığını saptamışlardır. Korkmaz vd., (2016) Kayseri yöresinden örnekledikleri *Cx. pipiens* komplekse ait toplam 376 örneğin 148’ini (%39,4) moleküler analizlerle kanatlı ve/veya memeli kanı yönünden pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar (Korkmaz vd., 2016) pozitif belirlenen örneklerin %29,1’inin yalnızca memeli, %66,2’sinin yalnızca kanatlı, %4,7’sinin ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif olduğunu kaydetmiş ve *Cx. pipiens* kan beslenmesinde kanatlı tercihinin önemli olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmamızda kanatlı mt-cytb sekans analizleri ile konak türü tayininde *Cx. pipiens* kompleks türlerinin kan beslenmesinde en çok Passeriformes takımında yer alan kuşları tercih ettiği çok daha az olarak da Falcaniformes ve Strigiformes takımlarındaki kuşlardan beslendiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuç yukarıdaki araştırmalarla birlikte çeşitli araştırmacıların bulguları (Figuerola vd., 2007; Garcia-Rejon vd., 2010; Vazquez vd., 2010; Gomes vd., 2013) ile paralellik göstermiştir. Yine mt-cytb sekans analiz sonuçlarına göre ilgili sivrisinek türünün Passeriformes takımındaki *Passer* ve *Acrocephalus* soyundaki türlerden daha fazla kan beslenmesi yaptığı dikkati çekmiştir. Çalışmada en yaygın belirlenen *An. sacharovi* ile birlikte yörede çok daha sınırlı yayılış gösteren diğer *Anopheles* türleri *An. maculipennis* ve *An. claviger* dişilerinin kanatlı kanı beslenme oranları (%5,0-%7,69) düşük bulunmuştur. Nitekim ilgili türlerin kan beslenmesinde sıklıkla daha büyük memeli gruplarını tercih ettikleri ve insanlar için de invaziv oldukları çeşitli araştırmalarda (Apperson ve Lanzaro, 1991; Robertson vd., 1993; Demirhan ve Kasap, 1995; Apperson vd., 2004) saptanmıştır. Çalışmada yine düşük yaygınlıkta belirlenen *Ae. vexans* dişilerinin kanatlı kanı ile beslenme oranı %27,8 olarak belirlenmiştir. Oldukça agresif bir tür olarak bilinmekte olan bu türün yoğunlukla memelilerden nadiren de kuşlardan kan emdiği bildirilmiştir (Lee vd., 2002; Hassan vd., 2003; Gingrich ve Williams, 2005). Ancak araştırmamızda %30’a yaklaşan kanatlı kanı pozitifliği belirlenmiş olması muhtemelen ekosistemdeki kanatlı kuş yoğunluğu ile ilişkili olabileceğini ve oldukça invaziv olan bu türün kanatlılardan da kan emmeye adaptasyonunun yüksek olduğunu göstermiştir.

*Culicoides* sineklerinin Orta Doğu ve Akdeniz bölgesi gibi birçok bölgede kan beslenmesinde konak spektrumları büyük ölçüde bilinmemektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar (Bartsch vd., 2009; Garros vd., 2011; Lassen vd., 2011; Ninio vd., 2011; Calvo vd., 2012; Lassen vd., 2012), bu türlerin omurgalı konak uygunluğunda çok çeşitli memeli ve kanatlılardan kan beslemesi yapabildiğini öne çıkarmıştır. Birçok *Culicoides* türü memeli veya kanatlılardan beslenmesine karşın bazı türlerin sürüngenler ve kurbağalardan da beslenebildiği kaydedilmiştir (Borkent, 2005). Ergin *Culicoides* sineklerinin yaşam sürelerinin

uzunluğu sıcaklığa bağımlıdır ve birçok tür için bu süre tam olarak belirlenememiştir (Slama vd., 2015). Bu sürenin tekrar tekrar kan beslenmenin görüldüğü birkaç haftadan birkaç aya kadar sonlanabileceği ileri sürülmektedir (Hebert vd., 2003a). Kan üzerindeki bu bağımlılık *Culicoides*lerin çeşitli patojenleri nakledebilmesi için uygun ortamı sağlamaktadır. Bu açıdan *Culicoides* sokucu sineklerin kan beslenme tercihlerinin belirlenmesi vektör kapasitelerinin değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda araştırma yöresinden izole edilen *Culicoides* türlerine ait örneklerin büyük oranda kanatlı kanı ile beslendikleri moleküler analizlerle ortaya konmuştur. Bu türler arasında özellikle *C. submaritimus*, *C. gejjelensis*, *C. riethi*, *C. circumscriptus*, *C. longipennis* ve *C. newsteadi* örneklerinde kanatlı kanı beslenme oranları %70'in üzerinde belirlenmiştir. Slama vd. (2015), Tunus'ta örnekledikleri *Culicoides* türlerinin başta insan olmak üzere büyük çoğunluğunun memelilerden kan beslemesi yaptığını mt-cytb sekans analizleri ile belirlemişler ve çalışmamızda da belirlenen *C. newsteadi* türünde kanatlı kanı pozitifliği saptamışlardır. Lassen vd. (2012) Danimarka'nın farklı bölgelerinde örnekledikleri *Culicoides* türlerinin kan besleme analizlerinde çalışmamızda da belirlenen *C. circumscriptus*, *C. dunningtoni*, *C. festivipennis* türlerinin yanısıra *C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. reconditus* ve *C. salinarius* türlerine ait örneklerin çoğunluğunun Passeriformes takımı ve bazılarının da Colimbiformes takımındaki kuş türlerinden kan beslemesi yaptığını belirlemişlerdir. Benzer olarak çalışmamızda kanatlı kanı pozitif belirlenen *Culicoides* türlerinin kan beslenmesinde konak türü tayini amacıyla yapılan mt-cytb sekans analizlerinde en yüksek oranı Passeriformes takımındaki kuş türleri göstermiştir.

Kan beslenme analiz sonuçlarına paralel olarak sivrisinek ve *Culicoides* türlerine ait bireysel örnekler ile baş/toraks (BTH) ve abdomen havuzlarının haemosporidian parazitler yönünden moleküler incelemelerinde birçok türe ait örneğin pozitif olduğu görülmüştür. Çeşitli araştırmalarda (Ishtiaq vd., 2008; Njabo vd., 2011) bildirilen metodolojiye uygun olarak muhtemel enfektif ve/veya enfekte sivrisinek ve *Culicoides* örneklerinin belirlenebilmesi amacıyla tür teşhisi yapılan her bir sineğin baş-toraks (enfektif) ile abdomeni (enfekte) diseke edilerek havuzlar oluşturulmuş ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Bilinildiği gibi enfektif dönem sporozoitler dişi sivrisineklerin beslenmeleri esnasında tükrük bezleri vasıtasıyla nakledilmektedir. Tükrük bezleri toraksta yan kısımlarda özofagusa doğru uzanır (James ve Rossignol, 1991). Fertilizasyon ve oocyst gelişimi (non enfektif dönem) ise sivrisineğin orta bağırsak kısmında (abdomen) şekillenmektedir. Bu açıdan BTH pozitiflikleri muhtemel vektör potansiyelinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Ishtiaq vd., 2008; Njabo vd., 2011; Inci vd., 2012). Nitekim BTH havuzlarından elde edilen pozitif izolatların sekans analizleri hem sivrisinek (*Plasmodium* sp.) hem de *Culicoides* (*Haemoproteus* sp.) türleri için vektörlüklerini yaptıkları parazitleri teyit ederken abdomen ve bireysel havuzlarda muhtemelen enfekte kan

alınmasına bağılı olarak vektör olmadıkları parazitlere (Sivrisineklerde *Haemoproteus*, *Culicoides* örneklerinde *Plasmodium* sp. pozitiflikleri) ait sekansları da göstermiştir. Bu açıdan çalışmada insekt türlerinde minimum enfeksiyon oranlarının (MIRs) hesaplanmasında BTH pozitiflikleri temel alınmıştır. Çalışmamızda sivrisinek türleri arasında *Plasmodium* türleri ile en yüksek MIRs *Cx. pipiens* kompleks türlerinde belirlenmiş bunu *Ae. vexans* izlemiştir. *Anopheles* türlerine ait baş/toraks havuzlarında pozitiflik saptanmamış ve dolayısıyla MIRs belirlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlarla Sultan Sazlığı ekosisteminde *Cx. pipiens* kompleks türlerinin, araştırma yöresinde kanatlı türlerinden de izole edilmiş olan *Plasmodium* nesilleri için muhtemelen vektör görevi yaptığını buna karşın kan beslenme analiz sonuçları ile paralel olarak moleküler analiz sonuçları ilgili *Plasmodium* nesillerinin nakli açısından *Anopheles* türlerinin vektörlük potansiyelinin düşük olduğunu düşündürmüştür. Nitekim elde edilen bu sonuçlar çeşitli araştırmacıların (Turell vd., 2000; Ejiri vd., 2009; Lalubin vd., 2013; Martinez-de la Puente vd., 2015) bulguları ile paralellik göstermiştir. Ancak tüm bu verilerin deneysel çalışmalarla tükrük bezlerinde ilgili parazit nesillerine ait sporozoit gelişiminin ve uygun konaklara naklinin gösterilmesiyle (Valkunas, 2005) desteklenmesi gerekmektedir.

*Culicoides* türlerinde haemosporidianların araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Çalışmamızda *Culicoides* türlerinde %80'nin üzerinde BTH pozitiflikleri belirlenmiştir. Bobeva vd. (2013), Bulgaristan'ın bazı bölgelerinde *Culicoides* türlerine ait örneklerde moleküler olarak %2,17 oranında *Haemoproteus* pozitifliği bildirmişler ve *C. pictipennis* ve *C. circumscriptus* türlerini muhtemel potansiyel vektörler olarak kaydetmişlerdir. Ferraguti vd. (2013), İspanya'da çeşitli bölgelerden örnekledikleri 97 *Culicoides* örneğinin 13'ünde Haemosporidian pozitifliği bildirmişler ve *C. circumscriptus*'un önemli bir vektör olduğunun altını çizmişlerdir. Santiago-Alarcon vd. (2013), Almanya'da örnekledikleri 22 *Culicoides* türünden *C. kibunensis*, *C. pictipennis* ve *C. scoticus* türlerine ait örneklerde *Haemoproteus* pozitiflikleri bildirmişler ve bunların sekans analizleri ile karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yine Bernotiene ve Valkunas (2016), Rusya'dan örneklenip moleküler olarak analiz ettikleri 300 *Culicoides* örneğinin beşinde (%1,67) pozitiflik belirlemişler ve *C. impunctatus*, *C. punctatus* ve *C. pictipennis* türlerine ait pozitif örneklerde *Haemoproteus* nesillerinin karakterizasyonunu sağlamışlardır. Bobeva vd. (2014), Bulgaristan'da topladıkları toplam 735 (640'ı nesil vermiş, 90'ı kan emmiş örnek) *Culicoides* örneğinden 17'sinde haemosporidian pozitifliği saptamışlar ve sekans analizleri ile *Haemoproteus* nesillerini *C. alazanicus*, *C. circumscriptus* ve *C. festvipennis* türlerinde belirlemişlerdir. Çalışmamızda BTH temelinde hesaplanan MIRs oranları yukarıdaki araştırmacıların bildirmiş olduğu orandan çok daha yüksek saptanmıştır. Bu sonuç da yine Sultan Sazlığı yöresinin çok çeşitli göçmen veya lokal kuş türlerinin yanısıra potansiyel vektör *Culicoides* türleri için de ideal bir ekosistem oluşturmamasından ileri geldiği

düşünülmüştür. Araştırma yöresinde en yüksek MIRs *C. nubeculosus* komp.'de belirlenmiş bunu sırasıyla *C. geigelenensis*, *C. submaritimus*, *C. circumscriptus*, *C. longipennis*, *C. festivipennis* ve *C. newsteadi* izlemiş olup bu türlerden *C. circumscriptus* ve *C. festivipennis* için *Haemoproteus* pozitiflikleri ve potansiyel vektörlük rolleri yukarıdaki ilgili araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir.

Araştırmamızda Passeriformes takımından farklı ailelere bağlı toplam 536 kuşta haemosporidan parazitlerin %33,8 prevalans gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada örnekleme alınan kuş türleri bazında prevalansların değerlendirilmesi noktasında sis ağırları ile yakalanan kuş türlerinin homojen olmaması açısından kesin bir değerlendirme yapabilmek mümkün olmamıştır. Ancak örneklem sayısı istatistik açıdan uygun olan (>30) kuş türleri incelendiğinde *Haemoproteus/Plasmodium* nesilleri ile pozitiflik en yüksek Passeridae ailesinde *P. hispaniolensis*'de belirlenmiş bunu Sylviidae ailesinde *Acrocephalus scirpaceus*, *Ac. arundinaceus*, *Ac. melanopogon*, Panuridae ailesinde *Panurus biarmicus* ve Hirundinidae ailesinde *Hirundo rustica* izlemiştir. Çalışmada incelenen kuş popülasyonlarında *Leucocytozoon* nesillerinin prevalansı *Haemoproteus/Plasmodium* nesillerine oranla oldukça düşük belirlenmiş ve bu nesillerin de %3,36'sının *Haemoproteus/Plasmodium* nesilleri ile miks seyrettiği görülmüştür. Bu sonuçlarla Sultan Sazlığı ekosisteminin *Leucocytozoon* nesillerinin bulaşma dinamiklerinde vektör-konak-parazit bütününde optimum koşulları oluşturmadığı düşünülmüştür. Nitekim pozitif belirlenen kuşların büyük çoğunluğunun göçmen kuşlar olması muhtemelen başka coğrafyalarda enfeksiyonu almış olabileceklerini göstermektedir. Aynı zamanda yörede yapılan insekt örneklemelerinde simuliid sineklere tesadüf edilememesi de bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Nitekim *Leucocytozoon* türlerinin bulaşmasının diğer vektör kaynaklı enfeksiyonlarda olduğu gibi temel anlamda uygun vektörlerin mevcudiyeti ve bu vektörlerin kan emdiği kanatlı konağın periferik dolaşımında yeterli sayıda gametositi alabilmelerine bağlı olduğu da çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (Desser vd., 1968; Khan ve Fallis, 1970).

Çalışmamızda göçmen kuşlardaki haemosporidian parazitlerin prevalansı yerli kuşlara oranla yüksek saptanmış ve bu farklılık da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Nitekim göçmen ve yerel kuşlar arasındaki kanatlı haemosporidian parazit çeşitliliği ve prevalanslarının araştırıldığı çalışmalarda (Greiner vd., 1975; Valkiunas, 1993; Paperna vd., 2016), göçmen kuşların yerel kuşlara kıyasla daha yüksek oranda çeşitlilik ve prevalansa sahip oldukları bildirilmiştir. Yerel kuşlarda parazit enfeksiyonlara karşı immün direnç gelişiminde görev alan organların (dalak ve *Bursa fabricius*) göçmen kuşlara kıyasla daha az gelişmiş bir yapı göstermesinin parazit prevalanslarında saptanan bu farklılıkta etkili olduğu rapor edilse de

(Moller vd., 2004) asıl önemli faktörün, tek bir biyotik ortamda ikamet eden türlere kıyasla göçmen kuşların, mevsimsel olarak üreme alanları, dinlenme istasyonları ve kışlama alanları gibi iki veya daha fazla biyotik ortam arasında geçiş yapmaları ve daha farklı epidemiyolojik risklere maruz kalmaları olduğu bildirilmiştir (Valkiunas, 2005; Hellgren vd., 2007b; Paperna vd., 2016). Ayrıca subtropik ve tropik coğrafyalarda kışlayan göçmen kuşların bu bölgelerde mevcut olan kuş, patojen ve vektör insekt çeşitliliği nedeniyle yerel kuşlara kıyasla daha çeşitli kanatlı haemosporidian parazitlerine maruz kaldığı ve böylelikle enfeksiyon risklerinin yerel kuşlara oranla daha yüksek olduğu da belirtilmiştir (Valkiunas, 2005). Nitekim, Paperna vd., (2016) yerli ve göçmen olmak üzere toplam 2488 kuş üzerinde sezonsal olarak yürüttükleri çalışmalarında subtropik veya tropik kışlama alanlarından dönen kuşların (bahar kuşları) henüz kışlama alanlarına gitmeyen kuşlara göre, daha yüksek bir haemosporidian prevalans oranına sahip olduklarını, bunun yanında yine göçmen kuşların yerli kuşlara kıyasla daha yüksek enfeksiyon oranına sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Günümüzde artan bir ivme ile devam eden araştırmalar farklı coğrafyalarda çeşitli kanatlı tür ve gruplarında yeni haemosporidian nesillerinin varlığını ortaya çıkarmakta olup bu parazitlerin ne denli yüksek heterojeniteye sahip olduğunu göstermektedir. Günümüze kadar kanatlı konak üzerinde yürütülen çalışmaların yarısından azında mikroskopik analizlerin moleküler analizlerle birlikte kullanıldığı dikkati çekmektedir (Clark vd., 2014). Bu husus oldukça önem arz etmektedir. Nitekim çoğu zaman PCR pozitiflikleri konağın enfekte olduğunu göstermeyebilir. Abortif enfeksiyonlar bu durum için en önemli nedenlerden birisidir. Yine konak olmayan kanatlılarda vektörler tarafından henüz verilmiş olan sporozoitlerin PCR ile yakalanabilmesi olasılıklardan diğeridir (Valkiunas, 2005; Clark vd., 2014; Walther vd., 2016). Bu açıdan moleküler analizlerin parazitin gelişim dönemlerinin belirleneceği mikroskopik analizlerle birlikte uygulanması konak uygunluğunu belirlemede oldukça önemlidir. Çalışmamızda, moleküler tabanlı tekniklerle pozitif bulunan ve takiben sekanslanan örneklerin giemsa boyalı ince yayma kan frotileri Valkiunas (2005)'de yer alan protokollere göre dikkatlice incelenmiştir ve tespit edilen parazitlerin seksüel gelişim formları, Valkiunas (2005) ve Litvanya-Vilnius'da bulunan, Doğa Araştırma Merkezi, P. B. Šivickis Laboratory of Parasitology veri tabanında (<http://www.gamtostyrimai.lt/en/users/viewGroup/id.56/pageId.15>) yer alan fotoğraflar ve tanımlamalara göre morfolojik olarak tanımlanmıştır. Kanatlı haemosporidian etkenleri konak spesifikliğı düzeyinde geniş varyasyon göstermektedir. Bazı nesiller belirli kuş soy, aile veya takomlarında görülürken diğer bazıları tüm Aves sınıfında yerleşim gösterebilmektedir (Valkiunas, 2005). Bu kapsamda, yapılan araştırmalarda (Waldenström vd., 2002; Krizanauskiene vd., 2006; Dimitrov vd., 2010) *Plasmodium* türlerine ait nesillerin generalist bir konak spesifikliğı gösterdiği ve farklı aile ve dizilerde yer alan kuşlarda

enfeksiyonlara sebebiyet verebildiği rapor edilmiştir. Örneğin, MalAvi kayıtları, Hawaii'de bulunan dominant kanatlı *Plasmodium* nesli GRW4'ün, birçok kanatlı familyasını kapsayan konaklardan ve ABD'den Fransız Polinezyası'na kadar coğrafik alanlar boyunca kaydedildiği görülmektedir (Beadell vd., 2006; Ishtiaq vd., 2006; Marzal vd., 2011). Ancak *Haemoproteus* türlerine ait nesillerin daha sınırlı konaklarda gelişim gösterebildiği ve genellikle soy veya tür spesifik bir konak seçiciliğine sahip oldukları bildirilmiştir (Krizanauskiene vd., 2006; Atkinson vd., 2009). *Leucocytozoon* türlerinde ise nesillerin genellikle dizi, bazı olgularda da aile, alt aile ve tür spesifik bir karakter gösterdiği tespit edilmiştir (Forrester ve Greiner, 2009). Ancak günümüzde moleküler biyolojik tekniklerin kanatlı haemosporidanlarının teşhisinde ve karakterizasyonlarının belirlenmesinde kullanılmaya başlanması ile birlikte bu etkenlerin konak özgün ya da generalist özellikte olmaları revizyon altına alınmıştır. Çalışmamızda Sultan Sazlığı ekosisteminde potansiyel vektör ve kanatlı konaklardan toplam 18 *Plasmodium* nesli identifiye edilmiştir. Bunlar arasında 9 nesil yalnız vektörlerden ve hem vektör hem de kanatlı türlerinden izole edilmiştir. Bunlar arasında *Ae. vexans* nesillerinden izole edilen AEDVEX01 ve *Cx. pipiens* kompleks nesillerinden izole edilen CXPIP22, TURDUS01, CXPIP20, DONANA02, CXPIP21 nesilleri araştırma yöresinde yalnızca ilgili insekt türlerinde belirlenmiştir. Ayrıca literatür bilgi ve MalAvi veri bankası incelendiğinde AEDVEX01 ve CXPIP20, CXPIP21, CXPIP22 nesillerinin aynı sivrisinek türlerinden rapor edildiği görülmektedir. Bunun yanında DONANA02 neslinin *Cx. modestus*, CXPIP23'ün ise *Ochlerotatus caspius* nesillerinden de bildirildiği görülmektedir. Tüm bu nesiller günümüze kadar herhangi bir kanatlı konaktan rapor edilmemiştir. Muhtemelen ilgili nesiller henüz örneklenmemiş farklı takımlarda yer alan kuş türlerinde bulunmaktadırlar. *Cx. pipiens* kompleks nesillerinde bulunan TURDUS1 araştırma yöresinde örneklenen kanatlı türlerinde belirlenmemiş olmasına karşın başta Passerinler olmak üzere diğer bazı kanatlı takımlarından da rapor edildiği görülmektedir (Şekil 4.126). Bununla birlikte Ciloglu vd.'nin (2016) ilgili nesli Kayseri yöresinde örneklenmiş Accipitriformes takımındaki *Buteo buteo*'dan (Bayağı Şahin) izole etmiş olmaları bu neslin ilgili bölgede bulaşma dinamiğine sahip olduğunu desteklemiştir. TURDUS1 nesli için *Cx. pipiens* kompleks türlerinin muhtemel potansiyel vektörlükleri üzerine veriler ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışmada PADOM02 nesli *An. sacharovi* ve passerin kuşlardan Bıyıklı Kamışçında (*Acrocephalus melanopogon*) belirlenmiş ve bu sivrisinek türünün ilgili nesle araştırma yöresinde muhtemelen potansiyel vektörlük yapabildiği düşünülmüştür. Nitekim ilgili enfekte kuşların kan frotilerinin incelenmesinde parazitin gelişim dönemleri de belirlenmiş ve *P. relictum* türüne ait oldukları tespit edilmiştir. Böylece en yaygın Passeriformes takımından olmak üzere çeşitli takımlarda yer alan kuş türlerinden rapor edilmiş olan PADOM02 neslinin (Şekil 4.126) çalışmamızla tür tanımlaması da yapılmıştır. *Cx. pipiens*

kompleks nesillerinde belirlenen CXPIP23 nesli de Dünyada ilk olmak üzere Küçük Balabanda (*Ixobrychus minutus*) karakterize edilmiştir. Ancak CXPIP23 nesli moleküler olarak *Plasmodium* soyunda karakterize edilmiş olmasına karşın bu nesle ait eritrositik gelişim formları daha çok *Haemoproteus* gametositlerine benzer bulunmuştur. Tespit edilen morfolojik özellikler daha önce *I. minutus*'dan tanımlanan *H. herodiadis*'in özelliklerine yakın olsa da pigment granüllerinin belirgin olması nedeniyle bu türden morfolojik olarak farklı olduğu düşünülmüştür. Nitekim Litvanya Doğa Araştırma Merkezi'nde görev yapmakta olan ve proje çalışmalarında iş birliği içinde olduğumuz Prof. Dr. Gediminas VALKIUNAS da bu morfolojik bulguları doğrulamış ve bunun yeni bir tür olabileceği yönünde görüş bildirmiştir. Sonraki dönemde Bulgaristan'da bir araştırma ekibi tarafından da belirlenen bu neslin farklı morfolojisi ve moleküler karakteri ile yeni bir *Plasmodium* türü olabileceği ve daha ileri çalışmalar ile karakterizasyonuna ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır. Çalışmada Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*), Kırdıra Kamışcını (*Acrocephalus schoenobaenus*) ve muhtemel vektörlerden *Cx. pipiens*'te izole edilen *P. ashfordi* GRW02 neslinin şimdiye kadar Passeriformes takımında dört ailede yer alan ve çalışmamızdaki türleri de içeren 14 türde ve Charadriiformes takımında Scolopacidae ailesinde yer alan *Philomachus pugnax* türünden izole edildiği görülmüştür (MalAvi <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>).

Araştırmamızda karakterize edilen 9 *Plasmodium* nesli yalnızca kanatlılardan izole edilmiştir. Bunlar arasında Ağaç Serçesi (*Passer montanus*), Serçe (*Passer domesticus*) ve Florya (*Chloris chloris*) türlerinde belirlenen *P. relictum* SGS1 neslinin farklı takımlardaki yüksek sayıda kanatlı türünü (en yüksek Passeriformes takımı) enfekte edebildiği (Şekil 4.126) dikkati çekmiştir. İlgili neslin araştırma sahasında belirlenen kuş türlerinden, farklı coğrafyalardan daha önce de bildirildiği görülmüştür. Bununla birlikte ilgili nesle ait gelişim dönemleri Florya (*Chloris chloris*) türüne ait perifer kan frotilerinde rastlanmamıştır. Bu durum ile ilgili açıklamalar aşağıda takip eden bölümlerde verilmiştir. Ağaç Serçesi (*Passer montanus*) ve Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) türlerinden tanımladığımız *P. relictum* GRW11 neslinin izole ettiğimiz kuşlar da dahil yine en fazla passerin kuşlar olmak üzere (13 aile 31 tür) Strigiformes ve Charadriiformes takımandaki bazı kuş türlerinden de rapor edildiği görülmüştür (Şekil 4.126). GRW11'e ait gelişim dönemleri Ağaç Serçesine ait kan frotilerinde belirlenmiş olmasına karşın Çayır Taşkuşunda saptanmamıştır. Küçük Balaban'dan (*Ixobrychus minutus*) izole edilen IXOMIN02 ve IXOMIN03 nesilleri dünyada ilk kez karakterize edilmiş ve tanımlanmıştır. Bunlardan IXOMIN02 nesli en yüksek identikliği *P. relictum* SGS1 nesline göstermiş ve bu neslin yer aldığı küme ile birlikte gruplanmıştır. IXOMIN03 ise en yüksek identikliği çalışmada *Cx. pipiens* komplekste tanımladığımız *Plasmodium* sp. DONANA02 nesli ile göstermiş ve bu iki nesil çalışmada yine *Cx. pipiens* kompleks ve Küçük Balaban'da tanımladığımız



CXPIP21 ve CXPIP23 ile filogenetik olarak yakın bulunmuştur (Şekil 4.126). İlgili kuşların perifer kan frotilerinin incelenmesinde IXOMIN03 neslinin gelişim dönemlerinin CXPIP23 nesli ile aynı morfolojik özellikleri sergilediği belirlenmiş, IXOMIN02 nesline ait gelişim dönemleri ise perifer kan frotilerinde bulunamamıştır. Çalışmada Büyük Kamışçın'dan (*Acrocephalus arundinaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. SYBOR10 ve *Plasmodium* sp. GRW10 nesilleri ile Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. RTSR1 neslinin genetik olarak yakın oldukları ve birarada küme oluşturdıkları saptanmıştır (Şekil 4.126). Ayrıca bu üç nesil yine yörede Kindıra Kamışçını (*Acrocephalus schoenobaenus*), Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) ve Mavigerdan'da (*Luscinia svecica*) belirlenen *P. homonucleophilum* SW2 nesli ile de filogenetik olarak yakın oldukları ve birlikte gruplanma gösterdikleri görülmüştür. Çalışmamızda Çayır Taşkuşu (*Saxicola rubetra*) ve Mavigerdan'da (*Luscinia svecica*) karakterize edilen *P. homonucleophilum* SW2 nesli ile Büyük Kamışçın'dan (*Acrocephalus arundinaceus*) izole edilen *Plasmodium* sp. SYBOR10 nesli bu kuş türleri için ilk kayıtları oluşturmuştur. SYBOR10, GRW10, RTSR1 ve SW2 nesillerinin MalAvi veri tabanında en fazla Passeriformes takımındakiler olmak üzere farklı takımlardaki kuşlardan rapor edildiği dikkati çekmiştir (Şekil 4.126). İlgili kuşların perifer kan frotilerinin incelenmesiyle SYBOR10 neslinin *P. lutzi* olarak tür tanımlaması yapılmış ve SW2 neslinin ise *P. homonucleophilum*'a ait olduğu konfirme edilmiştir. GRW10 nesline ait eritrositik gelişim dönemlerinin araştırıldığı giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde ilgili parazite ait sadece trofozoit yapıları gözleendiğinden ve tür tanımlaması için gerekli olan gametositler bulunamadığından morfolojik identifikasyon gerçekleştirilememiştir. RTSR1 nesline ait eritrositik gelişim dönemleri de ilgili kuşun giemsa boyalı ince yayma kan frotilerinde görülememiştir. Kindıra Kamışçınından (*Acrocephalus schoenobaenus*) izole edilmiş *P. elongatum* GRW06 nesli, *P. ashfordi* GRW02 nesli ile küme oluşturarak (%93,1 identiklik oranı) SYBOR10, GRW10, RTSR1 ve SW2 nesillerinin oluşturduğu grup ile birlikte üst kümelenme göstermiştir. MalAvi veri tabanında *P. elongatum* GRW06 neslinin en fazla Passeriformes takımındaki türlerde olmak üzere toplam 12 kuş takımından rapor edildiği görülmüştür (Şekil 4.126). Kindıra Kamışçınından (*Acrocephalus schoenobaenus*) izole edilerek karakterize edilmiş *P. elongatum* GRW06 bu kuş türü için ilk kayıt olmuştur. Çalışmada başta *P. relictum* SGS1 ve GRW11, *Plasmodium* sp. RTSR1, *P. homonucleophilum* SW2 ve *P. elongatum* GRW06 olmak üzere belirlenen *Plasmodium* nesillerinin aynı takımdaki farklı kuş türleri ile ayrı takımlardan kuş türlerinde de enfeksiyona yol açabildiği, konak değiştime adaptasyonlarının yüksek olduğu ve bu temelde de generalist karakterli oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar da çeşitli araştırmacıların (Waldenström vd., 2002; Beadell vd., 2006; Ishtiaq vd., 2006; Krizanauskiene vd., 2006; Dimitrov vd., 2010; Marzal vd., 2011) bulgularını desteklemiştir.

Çalışmada *Culicoides* ve kuş türlerinde toplam 38 *Haemoproteus* nesli belirlenmiş olup Sultan Sazlığı yöresinin bu parazitlerin gelişimi için vektör-konak ve ekolojik bazda ideal bir ortam oluşturduğu düşünülmüştür. Tespit edilen bu nesillerden 7'si yalnız *Culicoides* türlerinde, 26'sı kuş türlerinde ve 5'i de hem kuş hem de *Culicoides* türlerinde karakterize edilmiştir. Filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere (Şekil 4.127), kuşlarda belirlenen ve filogenetik olarak yakın bulunan *Haemoproteus* nesillerinin genelde aynı ailedeki kuş türlerinde bulunduğu dikkati çekmiştir. Örneğin Sylividae ailesindeki türlerde izole edilmiş olan SYAT10, SYAT36, CWT06 ve çalışmamızla ilk kez belirlenen SYNIS04 nesilleri filogenetik olarak da yakın nesiller olarak belirlenmiş ve MalAvi kayıtlarında da ilgili nesillerin aynı ailedeki kuş türlerinden rapor edildiği dikkati çekmiştir. Bununla birlikte ilgili kuş türlerinin perifer kan frotilerinin incelenmesinde parazit nesillerinin gelişim dönemleri saptanmış ve morfolojik tür tanımlaması ile *H. parabelopolskyi* olarak identifiye edilmişlerdir. Sylividae ailesindeki bu nesillerle yakın bulunan ve aynı filogenetik kümede yer alan *H. payevskyi* RW1 nesli de yine aynı ailedeki *Ac. scirpaceus*'tan (Saz Kamışçını) izole edilmiş olup ilgili neslin ayrıca MalAvi kayıtlarında çoğunlukla *Acrocephalus* soyundaki kuş türlerinden identifiye edildiği görülmüştür. İlgili kuş türünün perifer kan frotilerinde RW1 nesline ait gelişim dönemleri tespit edilmiş ve tür konfirmasyonu sağlanmıştır. Yine bu nesil aynı zamanda yörede *C. riethi* örneklerinde de bulunmuş ve bu türün RW1 nesline muhtemelen potansiyel vektörlük yapabildiği düşünülmüştür. Yukarıdaki ilgili nesillerle aynı filogenetik grupta belirlenen *H. hirundis* DELURB1 nesli Hirundinidae ailesinde *Riparia riparia*'dan (Kum Kırlangıcı) ilk kez izole edilmiş olup MalAvi kayıtlarında aynı ailedeki *Delichon urbicum* gibi türlerden izole edildiği görülmektedir.

Araştırmamızda *H. lanii* RB1 ve RBS4, RBS5, RBS6 yakın nesiller olarak belirlenmiş ve Sylividae ailesinde yer alan *Lanius collurio* (Kızıl Sırtlı Örümcekuşu) (RB1, RBS4, RBS5, RBS6, RBS7) ve *Ac. scirpaceus* (Saz Kamışçını) (RBS4) ile *C. geigelensis* ve *C. longipennis*'de (RBS4) belirlenmiştir. İlgili *Culicoides* türlerinin araştırma yöresinde bu nesillere muhtemelen potansiyel vektörlük yaptığı düşünülmüştür. Bu nesillerin ayrıca morfolojik tanımlamaları *H. lanii*'yi konfirme etmiş olup MalAvi kayıtlarında tamamının aynı aileden kuş türlerinde görüldüğü ancak RBS4 neslinin bir kaç Cisticolidae ve Dicruridae kuş türünden de rapor edildiği dikkati çekmiştir. *Chloris chloris*'de (Florya) belirlenen ve Dünyada ilk kez karakterize edilen CARCHL01 nesli morfolojik analizlerle birlikte *H. fringillae* nesli olarak karakterize edilmiş ve *H. lanii* RB1, RBS4-6 nesillerine genetik olarak yakın (ort. %96,05) bulunmuştur. Araştırma yöresinde *C. circumscriptus*'tan bulunan GAGLA05 neslinin MalAvi kayıtlarında Passerin kuşlardan Corvidae ailesinde *Garrulus glandarius*'ta (Bayağı Alakarga)'da bulunduğu görülmektedir. İlgili kuş türü aynı zamanda Sultan Sazlığı

Ekosisteminde görülen kuşlardandır. Bu açıdan *C. circumscriptus* türünün muhtemelen bu nesle potansiyel vektörlük yapabildiği düşünülmüştür. Yine filogenetik ağaç üzerinde görüleceği üzere *H. lanii* RBS7'nin yerleşimi bu türün parafiletik karakterde olduğunu göstermiştir.

*Ac. scirpaceus* (Saz Kamışçını) ve *Ac. schoenobaenus*'da (Kındıra Kamışçını) karakterize edilen ARW1, SW3, MW3, ACDUM2 ve *Iduna pallida*'da (Ak Mukallit) saptanan HIP2 nesilleri birbirlerine yüksek genetik yakınlık göstermiş (ort. %99,1) ve morfolojik identifikasyonlarla tümünün *H. belopolskyi* türüne ait oldukları belirlenmiştir. İlgili nesillere ait MalAvi kayıtları incelendiğinde tamamının başta *Acrocephalus* sp. olmak üzere aynı aileden (Sylviidae) kuş türlerinde rapor edildiği dikkati çekmiştir. Yine morfolojik analizlerle *H. belopolskyi* türüne ait oldukları saptanan ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Çalı Kamışçını (*Acrocephalus palustris*), Kındıra Kamışçını (*Acrocephalus schoenobaenus*), Büyük Kamışçın (*Acrocephalus arundinaceus*), Bıyıklı Kamışçın (*Acrocephalus melanopogon*) ve Bıyıklı Baştankara (*Panurus biarmicus*) türlerine ait örnekler ile *C. circumscriptus*'ta belirlenen SW1, MW1 ve GRW05 nesilleri birbirlerine filogenetik yakınlık (ort. %99,0) göstermiş ve bu tür içinde ikinci kümeyi oluşturmuştur. Bu nesillerden GRW05'in çalışmamızla morfolojik olarak identifikasyonu gerçekleştirilmiş ve tür ismi verilmiştir. Ayrıca GRW05 nesli Çalı Kamışçını (*Acrocephalus palustris*), Bıyıklı Kamışçın (*Acrocephalus melanopogon*) ve Bıyıklı Baştankara'dan (*Panurus biarmicus*) ilk kez izole edilip karakterize edilmiştir. Yine filogenetik analiz sonuçları *H. belopolskyi*'nin monofiletik olduğunu göstermiştir. Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*) ilk kez izole edilip karakterize ettiğimiz *H. nucleocondensus* GRW01 nesli en yüksek identikliği (%99,6) *H. belopolskyi* MW1 nesli ile göstermiş ve *H. belopolskyi* ikinci filogenetik kümesine yakın olduğu görülmüştür. GRW01 nesli Passeriformes takımında çoğunlukla çalışmada belirlenen türleri içeren aile olmak üzere diğer bazı ailelere ait türlerden de izole edildiği görülmektedir. MW1 neslinin ise Passeriformes dışında birer bildirim olmak üzere Charadriiformes ve Upipiformes takımlarındaki türlerden de rapor edildiği dikkati çekmiştir. Benzer durum SW1 nesli için de görülmüştür. Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*) izole edilen *H. paranucleophilus* PAHIS2 nesli filogenetik olarak en yüksek identikliği %96,4 ile RBS7 nesli ile göstermiş ve ayrı bir dalda yerleşmiştir. Bu neslin MalAvi kayıtlarında yalnızca *Passer hispaniolensis*'ten bildirildiği görülmektedir.

Araştırmada Serçe (*Passer domesticus*), Söğüt Serçesi (*Passer hispaniolensis*), Ağaç Serçesi (*Passer montanus*), Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Büyük Kamışçını (*Acrocephalus arundinaceus*) ve *C. newsteadi*, *C. longipennis* ve *C. festivipennis*'ten izole edilip karakterize edilen PADOM03, PAHIS1 ve PADOM05 nesillerinin monofiletik bir grup

oluşturduğu ve filogenetik olarak yakın (ort. %97,8) oldukları belirlenmiştir. PADOM03 Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*), PAHIS1 Büyük Kamışçıdan (*Acrocephalus arundinaceus*), PADOM05 de Ağaç Serçesi (*Passer montanus*) ve Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ile ilgili muhtemel vektör türlerinden ilk kez identifiye edilip karakterize edilmiştir. Tüm ilgili nesillerin morfolojik identifikasyonlarla *H. passeris* türüne ait oldukları belirlenmiş, PADOM03 ve PAHIS1 nesillerinin ilk kez tür tanımlaması yapılmıştır. Bu nesillerin MalAvi kayıtlarında aynı aileden Passer soyundaki kuşlardan rapor edildiği görülmekte olup PADOM05 yine birer bildirim olmak üzere Sylviidae ve Motacillidae ailelerindeki kuşlardan da bildirilmiştir. Benekli Bülbülden (*Luscinia luscinia*) izole edilen ROBIN1 neslinin morfolojik olarak tür konfirmasyonu yapılmış ve *H. attenuatus* türüne ait olduğu konfirme edilmiştir. ROBIN1 neslinin MalAvi kayıtları incelendiğinde daha çok çalışmada izole ettiğimiz *L. luscinia* olmak üzere tamamının aynı ailedeki (Turdidae) kuş türlerinden bildirildiği dikkati çekmiştir. ROBIN1 nesli ayrıca filogenetik olarak *H. passeris* grubuna yakın bulunmuştur.

Çalışmamızda monofiletik yerleşim gösterdiği belirlenen ve Ak Kuyruksallayan (*Motacilla alba*) ile Sarı Kuyruksallayanda (*Motacilla flava*) izole edilen YWT2 ve YWT1 nesillerinin morfolojik analizlerle *H. motacillae* türüne ait oldukları konfirme edilmiştir. Bu iki nesil %99,4 identik bulunmuş olup YWT2 nesli Dünyada ilk kez Ak Kuyruksallayandan (*Motacilla alba*) rapor edilmiştir. İlgili türe ait nesiller ayrıca *H. passeris* PADOM05 nesline genetik olarak yakın bulunmuşlardır.

Çalışmada *Culicoides* türlerinden ilk kez karakterize edilen CIRCUM01, CIRCUM02 ve CIRCUM06 (çalışma ile ilk kez bulunup karakterize edildi) nesilleri monofiletik bir grup oluşturarak (Şekil 4.127) Söğütbülbülünden (*Phylloscopus trochilus*) izole edilen *H. majoris* WW2 nesli ile genetik yakınlık göstermişlerdir. MalAvi kayıtlarında CIRCUM01 neslinin Strigiformes takımında *Asio otus* ile çalışmamızda da izolasyon yaptığımız *C. circumscriptus* izolatlarında rapor edildiği görülmektedir. Nitekim *Asio otus* Sultan Sazlığı ekosisteminde de bulunmaktadır. Neticede Şekil 4.127’de gösterilen *Culicoides* türlerinin Sultan Sazlığı ekosisteminde çeşitli nesillere muhtemelen potansiyel vektörlük yapabildikleri düşünülmüştür. Söğüt Bülbüllerinde karakterize ettiğimiz WW2 nesline ait gelişim dönemleri ilgili kanatlı türünün kan frotilerinde belirlenerek bu neslin *H. majoris* türüne ait olduğu konfirme edilmiştir. WW2 neslinin MalAvi kayıtlarında en çok Söğüt Bülbüllerinin de yer aldığı Sylviidae ailesindeki türlerden izole edildiği ancak bu aile dışında yine Passerinlerin toplam 5 ailesi ile birer izolat olmak üzere Gruiformes ve Piciformes takımlarındaki türlerden de bildirildiği dikkati çekmiştir.

Araştırma yöresinde Sığırcıkta (*Sturnus vulgaris*) belirlenen LAMPUR01 nesline ait gelişim dönemleri ilgili kuşun perifer kan frotilerinde bulunarak *H. pastoris* türüne ait olduğu konfirme edilmiştir. Filogenetik olarak ayrı bir dalda yerleşen bu nesil *C. circumscriptus*'tan izole edilmiş CUKI1 nesline genetik olarak yakınlık göstermiştir. LAMPUR01 neslinin MalAvi kayıtlarında sonuçlarımızla uyumlu olarak Sturnidae ailesindeki kuşlardan rapor edildiği görülmüştür.

Diğer nesillerden filogenetik olarak daha uzak belirlenen ve monofiletik bir grup oluşturan *H. palloris* WW1, *Haemoproteus* sp. RW4, CUKI1 ve CIRCUM03 nesilleri sırasıyla Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*), Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*), Bıyıklı Baştankara (*Panurus biarmicus*) ile *C. newsteadi*, *C. nubeculosus* kompleks ve *C. circumscriptus*'tan izole edilip karakterize edilmiştir (Şekil 4.127). İlgili nesiller ortalama %97,7 genetik identiklik göstermiştir. Belirlenen *Culicoides* türlerinin Sultan Sazlığı yöresinde yukarıdaki ilgili nesillere muhtemelen potansiyel vektörlük yapabildikleri düşünülmüştür. WW1 nesli MalAvi kayıtlarında Passerinlerin 6 farklı ailesinde yer alan kuşlarda bildirilmesine karşın en yüksek Saz Kamışçının da içinde yer aldığı Sylviidae ailesindeki türlerden izole edildiği, bunun yanında yine birer izolat olmak üzere Anseriformes ve Upupiformes takımındaki kuş türlerinden de bildirildiği görülmüştür. Saz Kamışçınından (*Acrocephalus scirpaceus*), ilk kez moleküler olarak karakterize ettiğimiz RW4 neslinin gelişim dönemleri ilgili kuşun kan frotilerinde belirlenememiştir. Bu durumla ilgili açıklama aşağıdaki bölümlerde verilmiştir. *C. circumscriptus*'ta belirlenen CUKI1 neslinin MalAvi kayıtlarında *C. kibunensis* ve *C. segnis* ile Sultan Sazlığı yöresinde de varlığı bilinen Turdidae ailesindeki *Turdus viscivorus*'tan izole edildiği görülmüştür. Yine aynı *Culicoides* türünde belirlenen CIRCUM03 nesli de MalAvi veritabanında *C. circumscriptus* ve Corvidae ailesindeki *Garrulus glandarius*'da (Alakarga) izole edilmiştir. Bu sonuçlar *C. circumscriptus*'un yukarıdaki ilgili *Haemoproteus* nesillerine muhtemelen vektörlük yapabildiğini ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda *Haemoproteus* nesilleri üzerine vektör konak bütününde elde edilen tüm bu veriler, bu parazitin *Plasmodium* nesillerine göre daha konak spesifikliğı gösterdiği görüşünü (Krizanauskiene vd., 2006; Atkinson vd., 2009) desteklemiş olmakla beraber SW1, MW1, WW1 ve WW2 gibi bazı nesillerin çok az olsa da farklı takımlardaki kuşlardan da bildirildiği ve dolayısıyla *Haemoproteus* türlerinde de uygun koşulların varlığında konak değiştirmeye adaptasyon gösterebileceği düşünülmüştür. Ancak bu durumun geçerliliğı için mikroskopik tanımlarla yeni konaklardaki enfektif dönem gelişimlerinin gösterilmesi gerekmektedir.

Hem kanatlı hem de vektör konaklar için *Leucocytozoon* spp.'nin *Plasmodium* veya *Haemoproteus* spp.'ye oranla çok daha az çalışıldığı görülmektedir (Clark vd., 2014). Çalışmada incelenen kuşlarda toplam 10 *Leucocytozoon* neslinin varlığı belirlenmiş,

morfolojik ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Söğüt Serçesi (*Passer hispaniolensis*), Ak Mukallit (*Iduna pallida*) ve Saz Kamışçınında (*Acrocephalus scirpaceus*) belirlenen RECOB03, IDUPAL01 ve REB11 nesilleri birbirine genetik olarak yakın bulunmuş (ort. %99,7) ve filogenetik kümelenme göstermişlerdir. Bu nesillerden IDUPAL01 nesli Dünyada ilk kez karakterize edilmiş olmasına karşın ilgili kuş türünün kan frotilerinde gelişim dönemleri tespit edilememiştir. RECOB03 nesli de ilgili kuş türünden Dünya’da ilk kez bildirilmiş olup morfolojik identifikasyonlarla *L. sakharoffi* türüne ait olduğu saptanmıştır. MalAvi veri tabanına göre bu neslin Passerinlerden 9 ailedeki 29 kuş türünden rapor edildiği görülmüştür. İlgili nesiller ayrıca morfolojik tür tanımlaması yapılmış MalAvi veri tabanında kayıtlı *L. majoris* CB1 nesline yakın bulunmuş (ort. %96,9 identiklik) ve filogenetik gruplanma göstermiştir (Şekil 4.128). Yine bu çalışma ile ilk kez tanımlanan Saz Kamışçını (*Acrocephalus scirpaceus*) ve Saksığandan (*Pica pica*) izole edilmiş sırasıyla ACSCI01 ve PICPIC01 nesilleri birbirlerine %99,9 identiklik göstererek gruplanma göstermiştir (Şekil 4.128). Çalışmamızda PICPIC01 nesli morfolojik identifikasyonlarla *L. berestneffi* türüne ait olduğu ve her iki neslin Kara Başlı Ötleğinde (*Sylvia atricapilla*) belirlenen SYAT22 nesline genetik yakınlık gösterdiği belirlenmiştir.

Araştırmamızda Küçük Balabandan (*Ixobrychus minutus*) izole edilen CIAE02 nesli MalAvi veri tabanında kayıtlı *L. californicus* FASPA02 nesline yüksek identiklik (%99,5) göstererek birlikte gruplanmıştır (Şekil 4.128). CIAE02 nesli ayrıca Ciloglu ve ark. (2016) tarafından Kayseri yöresinde örneklenen Kızıl Şahin (*Buteo rufinus*), Bayağı Şahin (*B. buteo*) ve Kulaklı orman baykuşundan (*A. otus*) izole edilmiş ve gelişim dönemleri Falconiformes takımındaki Bayağı Şahin ve Kızıl Şahinde morfolojik olarak gösterilirken Kulaklı orman baykuşunda herhangi bir gelişim dönemi saptanamamıştır. Araştırmacıların (Çiloğlu ve ark., 2016) bu bulguları da CIAE02 neslinin uygun konaklarının Falconiformes takımındaki kuşlar olduğunu göstermektedir. Nitekim MalAvi kayıtlarında ilgili nesil 6 ayrı kanatlı takımından bildirilmiş olmasına karşın Falconiformes takımındaki kuş türleri en fazla izolasyonun gerçekleştiği kuşlar olmuştur. Yine araştırmamızda Söğüt Serçesinden (*Passer hispaniolensis*) bulunarak ilk kez tanımlanan PAHIS03 nesli CIAE02 nesline genetik olarak yakın bulunmuş ve aynı şekilde ilgili kuşun kan frotilerinde gelişim dönemleri görülememiştir. Bu sonuçlar da filogenetik olarak yakın olan bu iki neslin uygun konaklarının Falconiformes takımındaki kuşlar olabileceğini desteklemektedir. Çalışmada Söğütbülbülü (*Phylloscopus trochilus*) ve Kızıl Sırtlı Örümcekkuşundan (*Lanius collurio*) izole edilen sırasıyla BT2 ve BT5 nesilleri birbirlerine yakın oldukları ve aynı zamanda PAHIS03 ve CIAE02 nesillerine de filogenetik olarak yakın yerleşim gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.128). Çalışmamızla ayrıca BT5 neslinin morfolojik identifikasyonlarla *L. balmoralis* türüne ait olduğu saptanmıştır. Her iki neslin de en fazla Passerin kuşlarda görüldüğü bunun yanında BT2 neslinin ayrıca birer izolat olmak üzere Falconiformes ve Strigiformes

takımlarından da bildirildiği MalAvi kayıtlarında görülmüştür. Çalışmada elde edilen sonuçlar *Leucocytozoon* nesillerinin takım bazında konak özgünlüğüne sahip olabileceği görüşünü (Forrester ve Greiner, 2009; Ciloglu vd., 2016) genel anlamda desteklemiş olmakla beraber farklı takımlarda moleküler olarak belirlenmiş CIAE02 ve BT2 gibi nesillerin konak değiştirme adaptasyonlarının olabileceği de düşünülmüştür. Ancak bu durumun netleştirilmesi için *Haemoproteus* parazitlerinde de bahsedildiği üzere ilgili konaklarda morfolojik gelişim dönemlerinin gösterilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, moleküler ve konvansiyonel yöntemler bir arada kullanılmış ve moleküler teşhis ile mikroskopik teşhis arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Özellikle aynı neslin identifiye edildiği aynı türe ait kuş örneklerinin giemsa boyalı ince yayma kan frotileri incelenmesinde bazı preparatlarda söz konusu nesle ait gelişim formları tespit edilemezken bazı preparatlarda ise enfektif formların (gametositler) çok yoğun bir şekilde bulunduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla PCR analizlerinde pozitif olarak belirlenen ancak preparatlarında herhangi bir gelişim formu bulunamayan örneklerde paraziteminin oldukça düşük olduğu düşünülmüştür. Nitekim benzer sonuçlar moleküler ve konvansiyonel metotların karşılaştırıldığı çalışmalarda (Jarvi vd., 2002; Richard vd., 2002; Valkiunas vd., 2008) da rapor edilmiştir. Öte yandan, bu durum diğer bazı çalışmalarda (Valkiunas, 2005; Valkiunas vd., 2009) PCR analizleri sırasında vektör insektler tarafından konağa verilen ve kan dolaşımında bulunan parazit sporozoitlerinin amplifiye edildiği şeklinde yorumlanmıştır. Nitekim Khan vd. (Khan vd., 1969) yaptıkları çalışmalarında deneysel olarak enfekte ettikleri kanatlı konaklarda *Leucocytozoon* sporozoitlerinin enfektif formlarına ulaşmadan 11 gün boyunca konak kan dolaşımında kalabildiklerini belirlemişlerdir. Bunun yanında, Schultz ve Whittington (2005) ile Valkiunas vd. (2009) de yaptıkları çalışmalarda kanatlı konakların kan dolaşımında *Plasmodium* spp. ve *Haemoproteus* spp. sporozoitlerinin bir süre kalabildiğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda, moleküler analizlerle pozitif bulunan örneklerin mikroskopik analizler sonucunda negatif olarak belirlenmesi, kan örnekleme yapıldığı anda henüz enfektif forma ulaşamamış sporozoitlerin PCR ile amplifiye edilmiş olabileceği ihtimalini düşündürmüştür.

Son yıllarda kanatlı haemosporidian etkenlerinin mikroskopik incelemesi yapılmadan sadece moleküler yöntemler kullanılarak teşhis edilmesi, konak-parazit ilişkisi kapsamında, parazitlerin konak spesifik veya generalist yapıda olarak değerlendirilebilmesi noktasında bir karmaşa yaratmıştır (Valkiunas vd., 2014; Palinauskas vd., 2016). Nitekim MalAvi veri tabanındaki Dünya'nın hemen her yerinden girilen kayıtlar incelendiğinde daha önce sadece sınırlı sayıdaki kuş türünden bildirilen ve konak spesifitesi gösterdiği bilinen türlere ait



nesillerin, kendi konakları haricinde çeşitli konaklardan da rapor edildiği görülmüştür (Bensch vd., 2009; Palinauskas vd., 2016). Ancak araştırmacılar bu noktada PCR ile kolaylıkla teşhis edilebilen abortif enfeksiyonlar veya sporozoitlerin de göz önüne alınması gerektiğini ve konak-parazit ilişkisi çerçevesinde gerçek konakların belirlenebilmesi için mutlaka eritrositik gelişim formlarının araştırılması gerektiğini ifade etmektedirler (Valkiunas vd., 2014; Palinauskas vd., 2016; Chagas vd., 2017). Bu nedenle çalışmamızda kanatlı haemosporidianların konak spesifiteleri hem moleküler hem de konvansiyonel tekniklerin birlikte kullanılmasıyla araştırılmıştır. Bu kapsamda yapılan araştırmalarda aynı *Plasmodium* nesline ait farklı kuş türlerinden hazırlanan preparatların çoğunda enfektif gelişim dönemleri saptanırken bu durum *Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* türlerine ait nesillerde farklılık göstermiştir. Örneğin, *Acrocephalus schoenobaenus*, *Luscinia svecica* ve *Saxicola rubetra*'dan identifiye edilen *P. homonucleophilum* nesillerinden biri olan SW2 bu üç ayrı kuş türüne ait kan frotilerinde ayrı ayrı tespit edilirken daha önce Dünya'da sadece *Acrocephalus arundinaceus*'dan bildirilmesine rağmen (MalAvi veritabanı kayıtlarına göre) çalışmamızda *A. melanopogon*, *A. palustris* ve *P. biarmicus*'dan moleküler olarak identifiye edilen *Haemoproteus* nesillerinden biri olan GRW05'e ait preparatlarda, enfektif gelişim dönemleri sadece *A. arundinaceus*'da bulunmuştur. Benzer olarak, *Haemoproteus nucleococondensus* nesli olarak tanımlanan ve *A. arundinaceus* ile *A. scirpaceus*'dan identifiye edilen GRW01'in enfektif formları yine sadece bu neslin konağı olarak bilinen *A. arundinaceus* preparatlarında tespit edilebilmiştir. Buna ilaveten, *P. trochilus*, *A. scirpaceus* ve *P. biarmicus*'ta moleküler olarak identifiye edilen *Haemoproteus palloris*/NW1 nesli *A. scirpaceus* ve *P. biarmicus*'ta morfolojik olarak tespit edilemezken sadece *P. trochilus*'a ait preparatlarda enfektif formlara rastlanmıştır (Şekil 4.113). Elde edilen bu sonuçlar ile *Haemoproteus* türlerine ait bu nesillerin tür bazında konak spesifitesi gösterdiği ve kendi konağı dışındaki konaklarda abortif olarak gelişim gösterdiğini düşündürmüştür. Nitekim Chagas vd. (2017)'de Brezilya'da bir hayvanat bahçesinde bulunan 16 farklı türden kafes kuşları üzerinde yürüttükleri çalışmalarında kanatlı haemosporidian parazitler yönünden PCR pozitif saptadıkları örneklerin %40'ında tespit ettikleri generalist bir konak karakterine sahip olan *Plasmodium* pNYCNYC01 neslinin, çoğu kuş türünün preparatlarında tespit edilemediğini bildirmişler ve çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara paralel bir şekilde bu kuşlarda abortif enfeksiyonların şekillenebilmiş olabileceğini rapor etmişlerdir.

Bensch vd. (2000) tarafından ilk olarak bildirilen ve sonra Helggren vd. (2004) ile Waldenström vd. (2004) tarafından geliştirilen PCR protokolü günümüzde Haemosporidian parazitlerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda da kullandığımız bu yöntemler mt-cytb geninin 478 bp kısmını biri *Haemoproteus/Plasmodium* (Bensch vd., 2000;

Waldenström vd., 2004) diğeri de ayrı set olarak *Leucocytozoon* (Helggren vd., 2004) için olmak üzere iki nested PCR amplifikasyonu ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Haemosporidian parazitlerin DNA'sını tarama ve amplifiye etme de her ikisinde efektif olmasına karşın nested reaksiyonlarının çalıştırılması için gerekli olan rejanların miktarı ve uzun zaman, geniş sayıda örneklerin incelenmesinde sınırlayıcı olmaktadır. Fallon vd. (2003b) bu konu üzerinde çalışmış, *Haemoproteus* ve *Plasmodium*'un mitochondrial genomunun korunmuş rDNA geninden 154 bp kısmını amplifiye eden öncül standart PCR tarama protokolü geliştirmişler ancak *Leucocytozoon* identifikasyonunu yapmamışlardır. Araştırmacılar (Fallon vd., 2003) geliştirdikleri bu metodolojide tarama sonucu yalnızca pozitif örneklerin sırasıyla yukarıdaki referans protokolle mt-cytb amplifikasyonunu ve sekans analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Böylece geliştirilen bu protokol geniş setlerde örneklerin işlenmesinde hız kazandırmış olmasına karşın yine de yüzlerce veya binlerce PCR ürünün jel elektroforezini gerektirmesi bakımından benzer handikapı göstermiştir. Sonradan ön tarama için Fallon vd.'nin (2003b) protokolünü kullanan çeşitli araştırmacılar (Fecchio vd., 2013; Svensson-Coelho vd., 2013) düşük parazitemili enfeksiyonlarda haemosporidian DNA'sının amplifikasyon şansını artırabilmek için çeşitli nested PCR protokollerine yönelmişlerdir. Çeşitli viral (Lanciotti vd., 2000; Wang vd., 2014; Yuan vd., 2014), bakteriyel (Birdsell vd., 2014; Greiman vd., 2014) ve paraziter (Teal vd., 2012; Albers vd., 2014; Xu vd., 2015) enfeksiyonların örneklerde araştırılmasında real time PCR teknikleri konak popülasyonlarında patojen prevalansının ve kantitasyonunun belirlenmesinde kullanışlı ve yaygın bir yöntem olarak öne çıkmıştır. Kanatlı haemosporidianlarında real time PCR'ın kullanıldığı bazı çalışmalar olmasına karşın, bu çalışmalarda genellikle parazitemi düzeyinin belirlenmesi (Bentz vd., 2006; Zehindjiev vd., 2008; Knowles vd., 2011; van Rooyen vd., 2013) veya spesifik nesillerin saptanması (Cellier-Holzem vd., 2010; Asghar vd., 2011; Larcombe vd., 2013; Biedrzycka vd., 2015) gerçekleştirilmiştir. Friedl ve Groscurth (2012) *Haemoproteus/Plasmodium* rRNA genin 85 bp korunmuş kısmını hedef alan primerler ve proba dizayn ettikleri TaqMan real time PCR tekniği ile Kuzey Kırmızı Çulha (*Euplectes orix*) kuşlarında soy ayrımı olmaksızın parazit yoğunluğunun belirlenmesinde ilgili tekniğin oldukça efektif olduğunu kaydetmişlerdir. İlgili çalışmada yine *Leucocytozoon* identifikasyonunu yapılmamıştır. Son yıllarda yapılan diğeri bir çalışmada (Bell vd., 2015) mitochondrial genomun rRNA geninden korunmuş bir bölgeyi hedef alan primerlerle sybergreen real time PCR protokolü geliştirilmiş ve yine soy ayrımı olmaksızın *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin tek reaksiyonda identifikasyonunun gerçekleştirildiği kaydedilmiştir. Araştırmacılar (Bell vd., 2015) geliştirdikleri real time PCR metodolojisinin yukarıda bahsedilen rutin ve yaygın kullanılan moleküler tarama teknikleri kadar etkin olduğunu belirtmişler ve ayrıca her üç soyun tek reaksiyonda

belirlenebilmesi ile tarama zamanının ve giderlerin azaltılması açısından ilgili tekniğin avantajlı olduğunu kaydetmişlerdir. Yine araştırmacılar kanatlı haemosporidian araştırmalarında geniş ölçekli örneklerin analizinde geliştirdikleri real time PCR tekniğinin değerli bir araç olduğunu vurgulamışlardır. Ancak Bell vd.'nin (2015), geliştirmiş olduğu bu teknikle de *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin ayrımı sağlanamamaktadır. Çalışmamızda araştırmacıların (Bell vd., 2015) primerleri ve protokolü ile yapılan denemelerde referans nested protokolü ile belirlenen çeşitli haemosporidian nesilleri için ilgili genomik DNA'ların kalıp olarak kullanılması ile pozitif reaksiyonların şekillenmediği görülmüştür. Bu durum primer ve ilgili nesillerin kalıp DNA'larındaki uyumsuzluk ile alakalı olabileceği gibi bağlanma derecesinin optimizasyonu gibi protokole bağlı problemlerden de kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda ilk kez *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin ayrı ayrı soy bazlı ayrımı için sybergreen tabanlı real time PCR metodolojisi geliştirilmiştir. Bu amaçla çalışmada her üç soyda sekans karakterizasyonu sağlanan izolatlar ait mt-cytb sekansları in-slico analizlerle dikkatlice analiz edilmiş ve her üç soya ait nesillerin ilgili gen bölgesine bağlanabilen ve soylar arası değişkenlik gösteren soy içi ise korunmuş yapı sergileyen 144 bp gen fragmentini amplifiye eden sybergreen real Time PCR primerleri dizayn edilmiştir. Çalışmada karakterizasyonu sağlanan nesillere ait mt-cytb linearize plazmidleri ile genomik DNA'lar kullanılarak yapılan optimizasyon denemelerinde primerlerin etkin bir şekilde sybergreen real time PCR'da amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda real time PCR analizleri sonucu elde edilen amplikonlar agaroz jel üzerinde yürütülerek hedef büyüklükte (144 bp) amplikonların varlığı da teyit edilmiş, sonrasında bu amplikonlar sekans analizlerine tabii tutularak spesifite kontrolleri sağlanmıştır. Çalışmamızda uygulanan erime eğrisi (Melt curve) analizleriyle *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin spesifik erime sıcaklıkları gösterdiği belirlenmiş ve geliştirilen bu teknikle ilgili soylara ait nesillerin soy bazında identifikasyonlarının yapılabileceği tespit edilmiştir. Nested PCR analizleri ile haemosporidian nesilleri yönünden pozitif belirlenen ve sonrasında sekans karakterizasyonu yapılan çeşitli kuşlardan elde edilmiş izolatlar ait genomik DNA'ların real time PCR ve erime eğrisi analizleri sonucu belirlenen erime sıcaklıklarının sekans analiz sonuçları ile uyum gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu noktada analizlere Sultan Sazlığında belirlenen haemosporidian nesillerinin kullanıldığını dikkate almak gerekmektedir. Farklı coğrafyalardan haemosporidian nesilleri üzerinde de ilgili tekniğin etkinliğin yüksek olabileceği düşünülmüş olsa da bu durum ileri çalışmalarla konfirme edilmesi gerekmektedir. Yine bu araştırma ile geliştirilen sybergreen real time PCR tekniğinin linearize plazmidler kullanılarak oluşturulan standart eğri analizlerinde *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesilleri

için  $1 \times 10^1/\mu\text{l}$  DNA kopya düzeyinde tekniğin etkin olarak amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak Sultan Sazlığı ekosisteminde gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile haemosporidian parazitlerin vektör-konak-parazit bütününde moleküler ekolojisi üzerine özgün veriler sağlanmış ve Türkiye için alanında ilk ve model bir çalışma ortaya konmuştur. Çalışma ile Sultan Sazlığı ekosisteminin başta Passerin kuş popülasyonlarında *Haemoproteus* ve *Plasmodium* nesillerinin bulaşma dinamikleri açısından ideal bir ortam oluşturduğu belirlenmiş ve her iki soya bağlı nesillerin ilgili ekosistemde genetik çeşitliliğinin yüksek olduğu, *Leucocytozoon* nesillerinin ise sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Proje çalışmaları ayrıca bu parazitlere ait nesillerin konak özgü veya generalist karakterleri üzerine de getirdiği katkı ile de önemli veriler ortaya koymuştur. Bununla birlikte araştırmada potansiyel vektör sivrisinek ve *Culicoides* türleri ile kanatlı konaklarda çeşitli yeni nesiller bulunarak karakterize edilmiş ve bu paraziter nesiller klasik ve moleküler taksonomiye kazandırılmıştır. Yine proje çalışmaları ile birçok patojenin bulaşma dinamiklerinde önem arz eden çeşitli sivrisinek ve *Culicoides* türlerinin genetik karakterleri ortaya konmuş ve DNA barkodları sağlanarak Türkiye ve bazıları da Dünya için özgün veriler olarak genetik veri tabanlarında kayıtları sağlanmıştır. Çalışma ile ayrıca bu kanla beslenen insektlerin kan beslenmelerinde konak spektrumları üzerine özgün veriler sağlanmış ve başta *Cx. pipiens* kompleks ve *Culicoides* türleri olmak üzere belirlenen ornitofilik beslenme karakteri ile Passerin kuşlar için patojenlerin naklinde potansiyel risk oluşturdukları ortaya konmuştur. Yine proje çalışmaları ile *Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* nesillerinin ayrı ayrı soy bazlı ayrımı için sybergreen tabanlı real time PCR metodolojisi geliştirilmiş ve bu tekniğin araştırma yöresinde belirlenen haemosporidian enfeksiyonların kanatlı ve vektörlerde identifikasyonunda sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Göçmen kuşlar ve kuş faunası açısından yüksek öneme sahip olan ülkemizde farklı biyocoğrafik karakterler göz önüne alındığında kanatlı haemosporidian enfeksiyonları üzerine moleküler ekolojik ve epidemiyolojik detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004. The black flies (Simuliidae) of North America. Comstock Pub. Associates, New York.
- Akiner, M.M., Caglar, S.S., 2010. "[Identification of *Anopheles maculipennis* group species using polymerase chain reaction (PCR) in the regions of Birecik, Beysehir and Cankiri]". *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 34, 50-4.
- Albers, A., Sartono, E., Wahyuni, S., Yazdanbakhsh, M., Maizels, R.M., Klarmann-Schulz, U., Pfarr, K., Hoerauf, A., 2014. "Real-time PCR detection of the HhaI tandem DNA repeat in pre- and post-patent *Brugia malayi* Infections: a study in Indonesian transmigrants". *Parasit Vectors* 7, 146.
- Alfonso, M., 2012. Recent Advances in Studies on Avian Malaria Parasites. INTECH Open Access Publisher.
- Apperson, C.S., Hassan, H.K., Harrison, B.A., Savage, H.M., Aspen, S.E., Farajollahi, A., Crans, W., Daniels, T.J., Falco, R.C., Benedict, M., Anderson, M., McMillen, L., Unnasch, T.R., 2004. "Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.) 4, 71-82.
- Apperson, C.S., Lanzaro, G.C., 1991. "Comparison of host-feeding patterns between *Anopheles quadrimaculatus* sibling species A and B". *J Am Mosq Control Assoc* 7, 507-8.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Bensch, S., 2011. "Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?". *Journal of Avian Biology* 42, 530-7.
- Atkinson, C.T., 1991. "Vectors, epizootiology, and pathogenicity of avian species of *Haemoproteus* (Haemosporina: Haemoproteidae)". *Bulletin of the Society for Vector Ecology* 16, 109-26.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Lease, J.K., 2001. "Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii amakihi". *Journal of Wildlife Diseases* 37, 20-7.
- Atkinson, C.T., Forrester, D.J., Greiner, E.C., 1988. "Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: seasonal transmission and vector abundance". *Journal of Medical Entomology* 25, 45-51.
- Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B., 2009. "Parasitic Diseases of Wild Birds". Wiley-Blackwell Publishing, US.
- Atkinson, C.T., van Riper Iii, C., 1991. "Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*". 19-48 T2 - Bird-parasite interactions: Ecology, evolution, and behavior.
- Augot, D., Sauvage, F., Jouet, D., Simphal, E., Veuille, M., Couloux, A., Kaltenbach, M.L., Depaquit, J., 2010. "Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis". *Infection, genetics and evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics In Infectious Diseases* 10, 629-37.
- Ayala, S.C., Ramakka, J.M., Ramakka, V.F., Varela, C.E., 1977. "*Haemoproteus*, *Plasmodium* and hippoboscids ectoparasites of Colombian wild doves". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 19, 411-6.

- Bahnck, C.M., Fonseca, D.M., 2006. "Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations". *Am J Trop Med Hyg* 75, 251-5.
- Balkaya, N., Çelikoba, İ., 2005. "Sulakalanlar ve Kızılırmak Deltası". In: II. Mühendislik Bilimleri Genç Araştırmacılar Kongresi, İstanbul, pp. 568-78
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, P.H., Steuber, S., 2009. "Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany". *Parasitology Research* 105, 373-80.
- Beadell, J.S., Fleischer, R.C., 2005. "A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians". *J Parasitol* 91, 683-5.
- Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B.H., Atkinson, C.T., Bensch, S., Graves, G.R., Jhala, Y.V., Peirce, M.A., Rahmani, A.R., Fonseca, D.M., Fleischer, R.C., 2006. "Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 2935-44.
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Lane, J., Kaiser, A., 2003. *Mosquitoes and their control*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, xxi + 498 pp. p.
- Beebe, N.W., van den Hurk, A.F., Chapman, H.F., Frances, S.P., Williams, C.R., Cooper, R.D., 2002. "Development and evaluation of a species diagnostic polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism procedure for cryptic members of the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) subgroup in Australia and the southwest Pacific". *J Med Entomol* 39, 362-9.
- Beier, J.C., 1998. "Malaria parasite development in mosquitoes". *Annual Review of Entomology* 43, 519-43.
- Bell, J.A., Weckstein, J.D., Fecchio, A., Tkach, V.V., 2015. "A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians". *Parasit Vectors* 8, 383.
- Bennett, G.F., 1981. *Bibliography of the avian blood-inhabiting protozoa : supplement 1*. Memorial University of Newfoundland, St. John's, Nfld.
- Bennett, G.F., 1993. "Phylogenetic distribution and possible evolution of the avian species of the Haemoproteidae". *Systematic Parasitology* 26, 39-44.
- Bennett, G.F., Bishop, M.A., Peirce, M.A., 1993a. "Checklist of the avian species of Plasmodium Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones". *Systematic Parasitology* 26, 171.
- Bennett, G.F., Fallis, A.M., 1960. "Blood parasites of birds in algonquin park, Canada, and a discussion of their transmission". *Canadian Journal of Zoology* 38, 261-73.
- Bennett, G.F., Nieman, D.J., Turner, B., Kuyt, E., Whiteway, M., Greiner, E.C., 1982. "Blood Parasites of Prairie Anatids and their Implication in Waterfowl Management in Alberta and Saskatchewan". *Journal of Wildlife Diseases* 18, 287-96.
- Bennett, G.F., Peirce, M.A., 1988. "Morphological form in the avian Haemoproteidae and an annotated checklist of the genus *Haemoproteus* Kruse, 1890". *Journal of Natural History* 22, 1683-96.
- Bennett, G.F., Peirce, M.A., 1990. "The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae)". *Journal of Natural History* 24, 311-25.
- Bennett, G.F., Peirce, M.A., Ashford, R.W., 1993b. "Avian haemoatozoa: Mortality and pathogenicity". *Journal of Natural History* 27, 993–1001.

- Bensch, S., Hellgren, O., Pérez-Tris, J., 2009. "MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages". *Molecular Ecology Resources* 9, 1353-8.
- Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J., Hellgren, O., Poulin, R., 2004. "Linkage between nuclear and mitochondrial dna sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation?". *Evolution* 58, 1617-21.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R.T., 2000. "Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds". *Proceedings. Biological Sciences* 267, 1583-9.
- Bentz, S., Rigaud, T., Barroca, M., Martin-Laurent, F., Bru, D., Moreau, J., Faivre, B., 2006. "Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR". *Parasitology* 133, 685-92.
- Bernotiene, R., Valkiunas, G., 2016. "PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects". *Malar J* 15, 283.
- Biedrzycka, A., Migalska, M., Bielański, W., 2015. "A quantitative PCR protocol for detecting specific *Haemoproteus* lineages: molecular characterization of blood parasites in a Sedge Warbler population from southern Poland". *Journal of Ornithology* 156, 201-8.
- Birdsell, D.N., Vogler, A.J., Buchhagen, J., Clare, A., Kaufman, E., Naumann, A., Driebe, E., Wagner, D.M., Keim, P.S., 2014. "TaqMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify *Francisella tularensis* and its subspecies and subpopulations". *PLoS One* 9, e107964.
- Bishop, M.A., Bennett, G.F., 1992. "Host-parasite catalogue of the avian haematozoa: Supplement 1, and Bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa: Supplement 2". *Mem. Univ. of Nfld. Occ. Pap. Biol* 15, 1-244.
- Bişkin, Z., İnci, A., Yıldırım, A., Düzl ,  ., 2010. "Kayseri'nin Felahiye yöresinde yaygınlık gösteren sivrisinek (Diptera: Culicidae) türleri". *Sağlık Bilimleri Dergisi* 19, 133-9.
- Bobeva, A., Ilieva, M., Dimitrov, D., Zehtindjiev, P., 2014. "Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria". *Parasitology Research* 113, 4505-11.
- Bobeva, A., Zehtindjiev, P., Bensch, S., Radrova, J., 2013. "A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians". *Acta Parasitol* 58, 585-91.
- Bonneaud, C., Pérez-Tris, J., Federici, P., Chastel, O., Sorci, G., 2006. "Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine". *Evolution* 60.
- Borkent, A., 2005. The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera), In: C., M.W. (Ed.) *Biology of disease vectors*. pp. 113-26.
- Braga,  .M., Silveira, P., Belo, N.O., Valkiunas, G., 2011. "Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil". *Mem rias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 3-11.
- Busse, P., 2000. *Bird Station Manual*. Southeast European Bird Migration Network, University of Gdansk, Poland.



- Calvo, J.H., Berzal, B., Calvete, C., Miranda, M.A., Estrada, R., Lucientes, J., 2012. "Host feeding patterns of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) within the Picos de Europa National Park in northern Spain". *Bulletin of Entomological Research* 102, 692-7.
- Carpenter, S., Groschup, M.H., Garros, C., Felipe-Bauer, M.L., Purse, B.V., 2013. "*Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe". *Antiviral Research* 100, 102-13.
- Carpenter, S., Wilson, A., Mellor, P.S., 2009. "*Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe". *Trends in microbiology* 17, 172-8.
- Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M., 1998. "Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies". *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 1, 327-32.
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S., Sorci, G., 2010. "Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries". *Int J Parasitol* 40, 1447-53.
- Cetre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., Albina, E., 2004. "Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe". *Veterinary Research* 35, 325-37.
- Chagas, C.R., Valkiunas, G., de Oliveira Guimaraes, L., Monteiro, E.F., Guida, F.J., Simoes, R.F., Rodrigues, P.T., de Albuquerque Luna, E.J., Kirchgatter, K., 2017. "Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis". *Malar J* 16, 83.
- Chang, C.H., 1975. "Studies on the leucocytozoonosis of chickens, VIII. The relapse in chickens chronically infected with *Leucocytozoon sabraezesi*". *Journal of the Chinese Society of Veterinary Science* 1, 1-6.
- Ciloglu, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Dogan, Z., Inci, A., 2016. "Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterisation and microscopic confirmation". *Folia Parasitologica* 63, 023.
- Clark, N.J., Clegg, S.M., Lima, M.R., 2014. "A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data". *PARA International Journal for Parasitology* 44, 329-38.
- Clements, J.F., 2000. *Birds of the world : a checklist*. Ibis Publishing Company, Vista, Calif.
- Corradetti, A., Garnham, P.C.C., Neri, L., Scanga, M., Cavallini, C., 1970. "A redescription of *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *relictum* (Grassi and Feletti, 1891)". *Ibidem* 12, 1-10.
- Cupp, E.W., Tennessen, K.J., Oldland, W.K., Hassan, H.K., Hill, G.E., Katholi, C.R., Unnasch, T.R., 2004. "Mosquito and arbovirus activity during 1997-2002 in a wetland in northeastern Mississippi". *J Med Entomol* 41, 495-501.
- Cywinska, A., Hunter, F.F., Hebert, P.D., 2006. "Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes". *Med Vet Entomol* 20, 413-24.
- Dallas, J.F., Cruickshank, R.H., Linton, Y.M., Nolan, D.V., Patakakis, M., Braverman, Y., Capela, R., Capela, M., Pena, I., Meiswinkel, R., Ortega, M.D., Baylis, M., Mellor, P.S., Mordue Luntz, A.J., 2003. "Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel". *Med Vet Entomol* 17, 379-87.

- Darsie, R.F., Jr., Samanidou-Voyadjoglou, A., 1997. "Keys for the identification of the mosquitoes of Greece". J Am Mosq Control Assoc 13, 247-54.
- Darsie, R.F., Ward, R.A., Litwak, T., 2016. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University Press of Florida.
- Davidar, P., Morton, E.S., 1993. "Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin". AUK 110, 109.
- Demirhan, O., Kasap, M., 1995. "Bloodfeeding behavior of *Anopheles sacharovi* in Turkey". J Am Mosq Control Assoc 11, 11-4.
- Desser, S.S., Bennett, G.F., 1993. The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*, In: Academic Press Inc., San Diego, pp. 273-307.
- Desser, S.S., Fallis, A.M., Garnham, P.C.C., 1968. "Relapses in ducks chronically infected with *Leucocytozoon simondi* and *Parahaemoproteus nettionis*". Canadian Journal of Zoology 46, 281-5.
- Dik, B., Muz, D., Muz, M.N., Uslu, U., 2014. "The geographical distribution and first molecular analysis of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Southern and Southeastern Turkey during the 2012 outbreak of bovine ephemeral fever". Parasitology Research 113, 4225-32.
- Dimitrov, D., Zehtindjiev, P., Bensch, S., 2010. "Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria". Acta Parasitologica 55, 201-9.
- Dye, C., Hasibeder, G., 1986. "Population dynamics of mosquito-borne disease: effects of flies which bite some people more frequently than others". Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 80, 69-77.
- Ejiri, H., Sato, Y., Kim, K.S., Tsuda, Y., Murata, K., Saito, K., Watanabe, Y., Shimura, Y., Yukawa, M., 2011. "Blood Meal Identification and Prevalence of Avian Malaria Parasite in Mosquitoes Collected at Kushiro Wetland, a Subarctic Zone of Japan". Journal of Medical Entomology 48, 904-8.
- Ejiri, H., Sato, Y., Sasaki, E., Sumiyama, D., Tsuda, Y., Sawabe, K., Matsui, S., Horie, S., Akatani, K., Takagi, M., Omori, S., Murata, K., Yukawa, M., 2008. "Detection of Avian *Plasmodium* spp. DNA Sequences from Mosquitoes Captured in Minami Daito Island of Japan". Journal of Veterinary Medical Science 70, 1205-10.
- Ejiri, H., Sato, Y., Sawai, R., Sasaki, E., Matsumoto, R., Ueda, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Omori, S., Murata, K., Yukawa, M., 2009. "Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan". Parasitology Research 105, 629-33.
- Elbers, A.R., Meiswinkel, R., van Weezep, E., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Kooi, E.A., 2013. "Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011". Emerging Infectious Diseases 19, 106-9.
- Ergunay, K., Gunay, F., Erisoz Kasap, O., Oter, K., Gargari, S., Karaoglu, T., Tezcan, S., Cabalar, M., Yildirim, Y., Emekdas, G., Alten, B., Ozkul, A., 2014. "Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey". PLoS Neglected Tropical Diseases 8, e3028.
- Fallon, S.M., Ricklefs, R.E., Swanson, B.L., Bermingham, E., 2003. "Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic". J Parasitol 89, 1044-7.
- Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., Marm Kilpatrick, A., 2011. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex

- mosquitoes in epidemiology". Infection, genetics and evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 11, 1577-85.
- Fecchio, A., Lima, M.R., Svensson-Coelho, M., Marini, M.A., Ricklefs, R.E., 2013. "Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil". Parasitology 140, 181-92.
- Ferraguti, M., Martinez-de la Puente, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Figuerola, J., 2013. "On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds". Parasit Vectors 6, 208.
- Figuerola, J., Green, A.J., 2000. "Haematozoan Parasites and Migratory Behaviour in Waterfowl". Evolutionary Ecology 14, 143-53.
- Figuerola, J., Soriguer, R., Rojo, G., Gomez Tejedor, C., Jimenez-Clavero, M.A., 2007. "Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain". Emerging Infectious Diseases 13, 1915-7.
- Foley, D.H., Rueda, L.M., Wilkerson, R.C., 2007. "Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Records". Journal of Medical Entomology 44, 554-67.
- Forrester, D.J., Greiner, E.C., 2009. Leucocytozoonosis, In: Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. (Eds.) Parasitic Diseases of Wild Birds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 54-107.
- Forrester, D.J., Spalding, M., Maehr, D.S., 2003. Parasites and diseases of wild birds in Florida. University Press of Florida, Gainesville.
- Friedl, T.W.P., Groscurth, E., 2012. "A real-time PCR protocol for simple and fast quantification of blood parasite infections in evolutionary and ecological studies and some data on intensities of blood parasite infections in a subtropical weaverbird". Journal of Ornithology 153, 239-47.
- Fujisaki, K., Takamatsu, H., Kitaoka, S., Suzuki, K., Kamio, T., 1981. "Direct immunofluorescent staining of *Leucocytozoon caulleryi* of different developmental stages". Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 21, 73-9.
- Fujisaki, K., Takamatsu, H., Kitaoka, S., Suzuki, K., Kuniyasu, C., 1980. "Rapid detection by counterimmunoelectrophoresis of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with *Leucocytozoon caulleryi*". National Institute of Animal Health quarterly 20, 96-100.
- Fyodorova, M.V., Savage, H.M., Lopatina, J.V., Bulgakova, T.A., Ivanitsky, A.V., Platonova, O.V., Platonov, A.E., 2006. "Evaluation of potential West Nile virus vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes". J Med Entomol 43, 552-63.
- Gager, A.B., Del Rosario Loaiza, J., Dearborn, D.C., Bermingham, E., 2008. "Do mosquitoes filter the access of Plasmodium cytochrome b lineages to an avian host?". Molecular Ecology 17, 2552-61.
- Garcia-Rejon, J.E., Blitvich, B.J., Farfan-Ale, J.A., Lorono-Pino, M.A., Chi Chim, W.A., Flores-Flores, L.F., Rosado-Paredes, E., Baak-Baak, C., Perez-Mutul, J., Suarez-Solis, V., Fernandez-Salas, I., Beaty, B.J., 2010. "Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico". Journal of Insect Science (Online) 10, 32.
- Garnham, P.C.C., 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell, Oxford.

- Garros, C., Gardes, L., Allene, X., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T., 2011. "Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses". *Infection, Genetics And Evolution* 11, 1103-10.
- Garvin, M.C., Remsen, J.V., 1997. "An Alternative Hypothesis for Heavier Parasite Loads of Brightly Colored Birds: Exposure at the Nest". *AUK* 114, 179-91.
- Gingrich, J.B., Williams, G.M., 2005. "Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002". *J Am Mosq Control Assoc* 21, 194-200.
- Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., Scott, T.W., 2002. "Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus". *Emerging Infectious Diseases* 8, 1385-91.
- Gomes, B., Alves, J., Sousa, C.A., Santa-Ana, M., Vieira, I., Silva, T.L., Almeida, A.P., Donnelly, M.J., Pinto, J., 2012. "Hybridization and population structure of the *Culex pipiens* complex in the islands of Macaronesia". *Ecology and Evolution* 2, 1889-902.
- Gomes, B., Sousa, C.A., Vicente, J.L., Pinho, L., Calderon, I., Arez, E., Almeida, A.P., Donnelly, M.J., Pinto, J., 2013. "Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization". *Parasit Vectors* 6, 93.
- Gomez-Diaz, E., Figuerola, J., 2010. "New perspectives in tracing vector-borne interaction networks". *Trends Parasitol* 26, 470-6.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delecolle, J.C., Goffredo, M., Gasperi, G., 2006. "Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences". *Med Vet Entomol* 20, 229-38.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Shiff, C.J., 1994a. "Extraction of Haemoproteus columbae (Haemosporina: Haemoproteidae) Antigen from Rock Dove Pigeons (*Columba livia*) and its Use in an Antibody Elisa". *The Journal of parasitology*. 80, 713.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Skjoldager, M.L., Shaw, M.L., 1994b. "An ELISA for detecting anti-*Plasmodium* Spp. antibodies in African Black-footed Penguins (*Spheniscus demersus*)". *Journal of Parasitology* 80, 60.
- Greiman, S.E., Tkach, V.V., Pulis, E., Fayton, T.J., Curran, S.S., 2014. "Large scale screening of digeneans for *Neorickettsia* endosymbionts using real-time PCR reveals new *Neorickettsia* genotypes, host associations and geographic records". *PLoS One* 9, e98453.
- Greiner, E.C., 1991. "Leucocytozoonosis in waterfowl and wild galliform birds". *Bulletin of the Society for Vector Ecology* 16, 84-93.
- Greiner, E.C., Bennett, G.F., White, E.M., Coombs, R.F., 1975. "Distribution of the avian hematozoa of North America". *Can J Zool* 53, 1762-87.
- Grenyer, R., Orme, C.D.L., Jackson, S.F., Thomas, G.H., Davies, R.G., Davies, T.J., Jones, K.E., Olson, V.A., Ridgely, R.S., Rasmussen, P.C., Ding, T.-S., Bennett, P.M., Blackburn, T.M., Gaston, K.J., Gittleman, J.L., Owens, I.P.F., 2006. "Global distribution and conservation of rare and threatened vertebrates". *Nature* 444, 93-6.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood". *Syst Biol* 52, 696-704.
- Gunay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A., Linton, Y.M., 2015. "Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors". *Acta Tropica* 143, 112-20.

- Gündoğdu, E., 2002. "Isparta Çevresindeki Bazı Korunan Alanlarda Orman Kuşları Üzerine Gözlemler". Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 83-100.
- Harrup, L.E., Bellis, G.A., Balenghien, T., Garros, C., 2015. "*Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions". Infection, Genetics and Evolution 30, 249-66.
- Hassan, H.K., Cupp, E.W., Hill, G.E., Katholi, C.R., Klingler, K., Unnasch, T.R., 2003. "Avian host preference by vectors of eastern equine encephalomyelitis virus". Am J Trop Med Hyg 69, 641-7.
- Hasselquist, D., Östman, r., Waldenström, J., Bensch, S., 2007. "Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*". Journal of Ornithology 148, 401-9.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. "Biological identifications through DNA barcodes". Proc Biol Sci 270, 313-21.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R., 2003b. "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species". Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270, S96-S9.
- Heinzel, H., Fitter, R., Parslow, J., Boyla, A., 2002. Türkiye'nin ve Avrupa'nın kuşları : Kuzey Afrika ve Ortadoğu dahil. Dogal Hayati Koruma Dernegi, Istanbul.
- Hellgren, O., Bensch, S., Malmqvist, B., 2008. "Bird hosts, blood parasites and their vectors - associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals". Molecular Ecology 17, 1605-13.
- Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Valkiunas, G., Bensch, S., 2007a. "Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae)". J Parasitol 93, 889-96.
- Hellgren, O., Pérez-Tris, J., Bensch, S., 2009. "A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites". Ecology 90, 2840-9.
- Hellgren, O., Waldenstrom, J., Bensch, S., 2004a. "A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood". J Parasitol 90, 797-802.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Bensch, S., 2004b. "A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood". Journal of Parasitology 90, 797-802.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Perez-Tris, J., Szöll, E., Si, Ö., Hasselquist, D., Krizanauskiene, A., Ottosson, U.L.F., Bensch, S., 2007b. "Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach". Molecular Ecology 16, 1281-90.
- Hemmerter, S., Slapeta, J., Beebe, N.W., 2009. "Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2". Mol Phylogenet Evol 50, 317-25.
- Herman, C.M., Barrow, J.H., Tarshis, I.B., 1975. "Leucocytozoonosis in Canada Geese at the Seney National Wildlife Refuge". Journal of Wildlife Diseases 11, 404-11.
- Herman, C.M., Greiner, E.C., Bennett, G.F., Laird, M., 1976. Bibliography of the avian blood-inhabiting protozoa. International Reference Centre for Avian Haematozoa, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada, A1C 5S7., 123 pp.

- Hubalek, Z., 2008. "Mosquito-borne viruses in Europe". *Parasitology Research* 103 Suppl 1, S29-43.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees". *Bioinformatics* 17, 754-5.
- Huff, C.G., 1965. "Susceptibility of mosquitoes to avian malaria". *Exp. Parasitol* 16, 107–32.
- Inci, A., Yıldırım, A., Njabo, K.Y., Duzlu, O., Biskin, Z., Ciloglu, A., 2012. "Detection and molecular characterization of avian *Plasmodium* from mosquitoes in central Turkey". *Veterinary Parasitology* 188, 179-84.
- Ishtiaq, F., Beadell, J.S., Baker, A.J., Rahmani, A.R., Jhala, Y.V., Fleischer, R.C., 2006. "Prevalence and evolutionary relationships of haematozoan parasites in native versus introduced populations of common myna "*Acridotheres tristis*"". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 587-94.
- Ishtiaq, F., Clegg, S.M., Phillimore, A.B., Black, R.A., Owens, I.P.F., Sheldon, B.C., 2010. "Biogeographical patterns of blood parasite lineage diversity in avian hosts from southern Melanesian islands". *Journal of Biogeography* 37, 120-32.
- Ishtiaq, F., Guillaumot, L., Clegg, S.M., Phillimore, A.B., Black, R.A., Owens, I.P.F., Mundy, N.I., Sheldon, B.C., 2008. "Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands". *Molecular Ecology* 17, 4545-55.
- Isobe, T., Akiba, K., 1982. "Indirect immunofluorescent antibody test in chicken leucocytozoonosis". *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 22, 163-9.
- Isobe, T., Shimizu, S.Y., Yoshihara, S., Suzuki, K., 1998. "Immunoblot Analysis of Humoral Immune Responses to *Leucocytozoon caulleryi* in Chickens". *JOURNAL OF PARASITOLOGY* 84, 62-6.
- Isobe, T., Suzuki, K., 1986. "Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Leucocytozoon caulleryi*". *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A* 15, 199-211.
- Isobe, T., Suzuki, K., 1987. "Detection of serum antibody to *Leucocytozoon caulleryi* in naturally infected chickens by enzyme-linked immunosorbent assay". *The Japanese Journal of Veterinary Science* 49, 165-7.
- Ito, A., Gotanda, T., 2005. "A rapid assay for detecting antibody against leucocytozoonosis in chickens with a latex agglutination test using recombinant R7 antigen". *Avian Pathology* 34, 15-9.
- James, A.A., Rossignol, P.A., 1991. "Mosquito salivary glands: Parasitological and molecular aspects". *Parasitology Today (Personal ed.)* 7, 267-71.
- Jarvi, S.I., Schultz, J.J., Atkinson, C.T., 2002. "PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines". *Journal of Parasitology* 88, 153-8.
- Jones, R.H., Akey, D.H., Loomis, E.C., Barnard, D.R., Mullins, B.A., Beaty, B.J., Murray, M.D., Boorman, J.P., Nevill, E.M., Dyce, A.L., et al., 1985. "WHO/FAO Working Team Report: Entomology". *Progress in Clinical and Biological Research* 178, 661-4.
- Jonsson, L., 2006. *Birds of Europe : with North Africa and the Middle East*. Christopher Helm/A & C Black, London.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". *Nucleic Acids Res* 30, 3059-66.
- Kaya, M., Yurtsever, S., Kurtonur, C., 1999. "Trakya Ornito-Faunası Üzerine Araştırmalar". *Tr. J. Zool.* 781-90.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data". *Bioinformatics* 28, 1647-9.
- Kence, A., Bilgin, C.C. 1996. Türkiye Omurgalıları Tür Listesi (Ankara, DPT ve Tübitak), pp. 27-87.
- Khan, R.A., Desser, S.S., Fallis, A.M., 1969. "Survival of sporozoites of *Leucocytozoon* in birds for 11 days.". *Canadian Journal of Zoology* 47, 347-50.
- Khan, R.A., Fallis, A.M., 1970. "Relapses in birds infected with species of *Leucocytozoon*". *Canadian Journal of Zoology* 48, 451-5.
- Kim, K., Tsuda, Y., Yamada, A., 2009. "Bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan". *Journal of Medical Entomology* 46, 1230-4.
- Kimura, M., 1980. "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-20.
- Klei, T.R., DeGiusti, D.L., 1975. "Seasonal occurrence of *Haemoproteus columbae* Kruse and its vector *Pseudolynchia canariensis* Bequaert". *Journal of Wildlife Diseases* 11, 130-5.
- Knowles, S.C., Wood, M.J., Alves, R., Wilkin, T.A., Bensch, S., Sheldon, B.C., 2011. "Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population". *Mol Ecol* 20, 1062-76.
- Korkmaz, S., Yildirim, A., Duzlu, O., Ciloglu, A., Onder, Z., Inci, A., 2016. "Blood Meal Identification of the Mosquito (Diptera: Culicidae) Specimens Belong to *Culex pipiens* Complex that were Collected from Kayseri Province". *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 40, 199-204.
- Krizanauskiene, A., Hellgren, O., Kosarev, V., Sokolov, L., Bensch, S., Valkiunas, G., 2006. "Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome B gene sequences". *J Parasitol* 92, 1319-24.
- Laird, M., 1960. "Migratory birds and the dispersal of avian malaria parasites in the South Pacific". *Canadian Journal of Zoology* 38, 153-5.
- Lalubin, F., Deledevant, A., Glaizot, O., Christe, P., 2013. "Temporal changes in mosquito abundance (*Culex pipiens*), avian malaria prevalence and lineage composition". *Parasit Vectors* 6, 307.
- Lanciotti, R.S., Kerst, A.J., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Mitchell, C.J., Savage, H.M., Komar, N., Panella, N.A., Allen, B.C., Volpe, K.E., Davis, B.S., Roehrig, J.T., 2000. "Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay". *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4066-71.
- LaPointe, D.A., Goff, M.L., Atkinson, C.T., 2005. "Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*". *Journal of Parasitology* 91, 843-9.
- Larcombe, S., Bichet, C., Cornet, S., Faivre, B., Sorci, G., 2013. "Food availability and competition do not modulate the costs of *Plasmodium* infection in dominant male canaries". *Exp Parasitol* 135, 708-14.



- Lassen, S.B., Nielsen, S.A., Kristensen, M., 2012. "Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark". *Parasit Vectors* 5, 143.
- Lassen, S.B., Nielsen, S.A., Skovgard, H., Kristensen, M., 2011. "Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark". *Parasitology Research* 108, 823-9.
- Lee, J.H., Hassan, H., Hill, G., Cupp, E.W., Higazi, T.B., Mitchell, C.J., Godsey, M.S., Jr., Unnasch, T.R., 2002. "Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis". *Am J Trop Med Hyg* 66, 599-604.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. "DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data". *Bioinformatics* 25, 1451-2.
- Linley, J.R., 1985. "Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens". *J Med Entomol* 22, 589-99.
- Linton, Y.M., Smith, L., Koliopoulos, G., Samanidou-Voyadjoglou, A., Zounos, A.K., Harbach, R.E., 2003. "Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the *Maculipennis* Complex". *Systematic Entomology* 28, 39-55.
- Ludlam, K.W., Jachowski, L.A., Jr., Otto, G.F., 1970. "Potential vectors of *Dirofilaria immitis*". *J Am Vet Med Assoc* 157, 1354-9.
- Martinez-de la Puente, J., Munoz, J., Capelli, G., Montarsi, F., Soriguer, R., Arnoldi, D., Rizzoli, A., Figuerola, J., 2015. "Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy". *Malar J* 14, 32.
- Martinez, J., Martinez-De La Puente, J., Herrero, J., Del Cerro, S., Lobato, E., Rivero-De Aguilar, J., Vasquez, R.A., Merino, S., 2009. "A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections". *Parasitology* 136, 713-22.
- Martinsen, E.S., Paperna, I., Schall, J.J., 2006. "Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts". *Parasitology* 133, 279-88.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J., 2008. "A three-genome phylogeny of malaria parasites ( *Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches". *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 261-73.
- Marzal, A., Ricklefs, R.E., Valkiūnas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., Cziráj, G.A., Ewen, J., Hellgren, O., Hořáková, D., Iezhova, T.A., Jensen, H., Križanuskienė, A., Lima, M.R., de Lope, F., Magnussen, E., Martin, L.B., Møller, A.P., Palinauskas, V., Pap, P.L., Pérez-Tris, J., Sehgal, R.N.M., Soler, M., Szöllősi, E., Westerdahl, H., Zetindjiev, P., Bensch, S., 2011. "Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird". *PLOS One* 6, e21905.
- Mathieu, B., Cetre-Sossah, C., Garros, C., Chavernac, D., Balenghien, T., Carpenter, S., Setier-Rio, M.L., Vignes-Lebbe, R., Ung, V., Candolfi, E., Delecolle, J.C., 2012. "Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region". *Parasit Vectors* 5, 137.
- McCurdy, D.G., Shutler, D., Mullie, A., Forbes, M.R., 1998. "Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system". *Oikos* 82, 303-12.

- Medeiros, M.C.I., Hamer, G.L., Ricklefs, R.E., 2013. "Host compatibility rather than vector-host-encounter rate determines the host range of avian *Plasmodium* parasites". *Proceedings- Royal Society Of London B* 280, 20122947.
- Meiswinkel, R., Venter, G.J., Nevill, E.M., 2004. Vectors: *Culicoides* spp., In: Meiswinkel, R., Venter, G.J., Nevill, E.M. (Eds.) *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town. Oxford University Press, pp. 93-136.
- Mellor, P.S., Boorman, J., Baylis, M., 2000. "Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors". *Annu Rev Entomol* 45, 307-40.
- Mendes, L., Piersma, T., Lecoq, M., Spaans, B., Ricklefs, R.E., 2005. "Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats". *Oikos* 109, 396-404.
- Micieli, M.V., Matakchiero, A.C., Muttis, E., Fonseca, D.M., Aliota, M.T., Kramer, L.D., 2013. "Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus)". *J Med Entomol* 50, 853-62.
- Moller, A.P., Martin-Vivaldi, M., Soler, J.J., 2004. "Parasitism, host immune defence and dispersal". *J Evol Biol* 17, 603-12.
- Morii, T., 1972. "Presence of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with Akiba caulleryi". *National Institute of Animal Health Quarterly* 12, 161-7.
- Mullens, B.A., Cardona, C.J., McClellan, L., Szijj, C.E., Owen, J.P., 2006. "*Culicoides bottimeri* as a vector of *Haemoproteus lophortyx* to quail in California, USA". *Veterinary Parasitology* 140, 35-43.
- Nei, M., Kumar, S., Oxford University, P., 2005. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Nielsen, S.A., Kristensen, M., 2015. "Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia". *Parasit Vectors* 8, 151.
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J.C., Dufour, B., Depaquit, J., 2011. "Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France". *Parasitology research* 108, 657-63.
- Njabo, K.Y., Cornel, A.J., Bonneaud, C., Toffelmier, E., Sehgal, R.N., Valkiunas, G., Russell, A.F., Smith, T.B., 2011. "Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest". *Mol Ecol* 20, 1049-61.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piernney, S.B., 2007. "Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe". *Veterinary Microbiology* 124, 82-94.
- O'Roke, E.C., 1930. *The morphology, transmission, and life-history of Haemoproteus lophortyx* O'Roke, a blood parasite of the California Valley Quail. Univ. of California Press, Berkeley, Calif.
- Ohashi, K., Tsuda, Y., Kasai, S., Kawada, H., Takagi, M., 2014. "Hybridization between sympatric populations of *Culex pipiens pallens* and *Culex pipiens f. molestus* (Diptera: Culicidae) in Nagasaki, Japan". *Medical Entomology and Zoology* 65, 67-72, 9.
- Pages, N., Munoz-Munoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C., Nunez, J.I., 2009. "Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions". *Vet Parasitol* 165, 298-310.

- Palinauskas, V., Kosarev, V., Shapoval, A., Bensch, S., Valkiunas, G., 2007. "Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae)". *Zootaxa*, 39–50.
- Palinauskas, V., Ziegyte, R., Iezhova, T.A., Ilgunas, M., Bernotiene, R., Valkiunas, G., 2016. "Description, molecular characterisation, diagnostics and life cycle of *Plasmodium elongatum* (lineage pERIRUB01), the virulent avian malaria parasite". *Int J Parasitol* 46, 697-707.
- Paperna, I., Rózsa, L., Yosef, R., 2016. "Avian Haemosporidian blood parasite infections at a migration hotspot in Eilat, Israel". *European Journal of Ecology* 2, 47-52.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., Vakalis, N.C., 2007. "Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens". *Med Vet Entomol* 21, 36-43.
- Peirce, M.A., Mead, C.J., 1978. "Haematozoa of British birds". *Journal of Natural History* 12, 337-40.
- Pérez-Tris, J., Bensch, S., 2005. "LETTER: Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites". *Ecology Letters* 8, 838-45.
- Posada, D., 2008. "jModelTest: phylogenetic model averaging". *Mol Biol Evol* 25, 1253-6.
- Postiglione, M., Tabanli, B., Ramsdale, C.D., 1973. "The *Anopheles* of Turkey". *Rivista di Parassitologia* 34, 127-59.
- Poulin, R., 2011. *Evolutionary Ecology of Parasites* (Second Edition). Princeton University Press, Princeton.
- Powers, L.V., Pokras, M., Rio, K., Viverette, C., Goodrich, L., 1994. " Hematology and occurrence of hemoparasites in migrating Sharp-Shinned Hawks (*Accipiter striatus*) during fall migration". *Journal of Raptor Research* 28, 178–85.
- Ramsdale, C., Snow, K., 2000. "Distribution of the genus *Anopheles* in Europe". *European Mosquito Bulletin*, 1-26.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D., 2007. "bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>)". *Molecular ecology notes* 7, 355-64.
- Rawlings, P., 1996. " A key, based on wing patterns of biting midges (Genus *Culicoides* Latreille Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies". *Graellsia* 52, 57-71.
- Reeves, W.C., Herold, R.C., Rosen, L., Brookman, B., Hammon, W.M., 1954. "Studies on avian malaria in vectors and hosts of encephalitis in Kern County, California. II. Infections in mosquito vectors". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 3, 696-703.
- Richard, F.A., Sehgal, R.N., Jones, H.I., Smith, T.B., 2002. "A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria". *J Parasitol* 88, 819-22.
- Ricklefs, R.E., 1992. "Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4722-5.
- Ricklefs, R.E., Fallon, S.M., Bermingham, E., 2004. "Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites". *Systematic Biology* 53, 111-9.
- Robertson, L.C., Prior, S., Apperson, C.S., Irby, W.S., 1993. "Bionomics of *Anopheles quadrimaculatus* and *Culex erraticus* (Diptera: Culicidae) in the Falls Lake basin, North

- Carolina: seasonal changes in abundance and gonotrophic status, and host-feeding patterns". *J Med Entomol* 30, 689-98.
- Romi, R., Sabatinelli, G., Majori, G., 2001. "Could malaria reappear in Italy?". *Emerging Infectious Diseases* 7, 915-9.
- Rossi, L., Pollono, F., Meneguz, P.G., Cancrini, G., 1999. "[Four species of mosquito as possible vectors for *Dirofilaria immitis* piedmont rice-fields]". *Parassitologia* 41, 537-42.
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., McKeon, S.N., Levin, D.M., Quinones, M.L., Pova, M.M., Linton, Y.M., 2012. "DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors". *Parasit Vectors* 5, 44.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Pineda, E., Segelbacher, G., Schaefer, H.M., 2013. "Urban forests as hubs for novel zoonosis: blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians". *Parasitology* 140, 1799-810.
- Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H.M., Segelbacher, G., 2012a. "Bloodmeal analysis reveals avian plasmodium infections and broad host preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors". *PLOS One* 7, e31098.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., Schaefer, H.M., 2012b. "Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy". *Biological Reviews* 87, 928-64.
- Schaffner, F. 2001. *Les moustiques d'Europe = The mosquitoes of Europe* (Paris, IRD Éditions).
- Schultz, A., Whittington, P., 2005. "High prevalence of avian malaria infection to avifauna at Cape Recife, Eastern Cape, South Africa". *Ostrich* 76, 56-60.
- Sehgal, R.N.M., Valkiunas, G., Iezhova, T.A., Smith, T.B., 2006. "Blood parasites of chickens in Uganda and Cameroon with molecular descriptions of *Leucocytozoon schoutedeni* and *Trypanosoma gallinarum*". *Journal of Parasitology* 92, 1336-43.
- Shaikevich, E.V., Vinogradova, E.B., Bouattour, A., Gouveia de Almeida, A.P., 2016. "Genetic diversity of *Culex pipiens* mosquitoes in distinct populations from Europe: contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean populations". *Parasit Vectors* 9, 47.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. "Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers". *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651-701.
- Simsek, F.M., Ulger, C., Akiner, M.M., Tuncay, S.S., Kiremit, F., Bardakci, F., 2011. "Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey". *Biochemical Systematics and Ecology* 39, 258-65.
- Slama, D., Haouas, N., Mezhoud, H., Babba, H., Chaker, E., 2015. "Blood meal analysis of *Culicoides* (Diptera: ceratopogonidae) in central Tunisia". *PLoS One* 10, e0120528.
- Smith, J.L., Fonseca, D.M., 2004. "Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae)". *Am J Trop Med Hyg* 70, 339-45.
- Smith, R.B., Greiner, E.C., Wolf, B.O., 2004. "Migratory Movements of Sharp-Shinned Hawks (*Accipiter striatus*) Captured in New Mexico in Relation to Prevalence, Intensity, and Biogeography of Avian Hematozoa". *The Auk* 121, 837-46.

- Sol, D., Jovani, R., Torres, J., 2000. "Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors". *Ecography* 23, 307-14.
- Sol, D., Jovani, R., Torres, J., 2003. "Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds". *Oecologia* 135, 542-7.
- Solorzano, C.D., Szalanski, A.L., Owens, C.B., Steelman, C.D., 2010. "Genetic diversity of *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae) from New Orleans: pre- and post-Katrina". *Biochemical Genetics* 48, 711-26.
- Svensson-Coelho, M., Blake, J.G., Loiselle, B.A., Penrose, A.S., Parker, P.G., Ricklefs, R.E., 2013. Diversity, Prevalence, and Host specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage, In: *Ornithological Monographs No. 76*. American Ornithologists' Union, pp. 1-47.
- Svensson, L., 2006. Identification guide to European passerines, Stockholm.
- Svensson, L., Grant, P.J., Mullarney, K., Zetterström, D., Christie, D., 2006. Bird guide : [the most complete field guide to the birds of Britain and Europe]. Collins, London.
- Svensson, L.M.E., Ricklefs, R.E., 2009. "Low diversity and high intra-island variation in prevalence of avian *Haemoproteus* parasites on Barbados, Lesser Antilles". *Parasitology* 136, 1121-31.
- Şahingöz Demirpolat, G., 2016. Kayseri Yöresinde *Culex pipiens* Biyotipleri ve *Culex torrentium*'un Real-Time PCR ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans. Kayseri.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0". *Mol Biol Evol* 30, 2725-9.
- Tarshis, I.B., 1955. "Transmission of *Haemoproteus lophortyx* O'Roke of the California valley quail by hippoboscids of the species *Stilbometopa impressa* (Bigot) and *Lynchia hirsuta* Ferris". *Experimental Parasitology* 4, 464-92.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P., 2003. "A plea for DNA taxonomy". *Trends in Ecology & Evolution* 18, 70-4.
- Teal, A.E., Habura, A., Ennis, J., Keithly, J.S., Madison-Antenucci, S., 2012. "A new real-time PCR assay for improved detection of the parasite *Babesia microti*". *Journal of Clinical Microbiology* 50, 903-8.
- Tella, J.L., Blanco, G., Forero, M.G., Gajón, A., Donazar, J.A., Hiraldo, F., 1999. "Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1785-9.
- Turan, L., 2004. "Sultan Sazlığı Fauna Raporu. Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Kaynak Yönetimi Gef-2 Projesi".
- Turell, M.J., O'Guinn, M., Oliver, J., 2000. "Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus". *Am J Trop Med Hyg* 62, 413-4.
- Urbanelli, S., Silvestrini, F., Reisen, W.K., De Vito, E., Bullini, L., 1997. "Californian hybrid zone between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* revisited (Diptera:Culicidae)". *J Med Entomol* 34, 116-27.
- Valkiunas, G., 1993. "The role of seasonal migrations in the distribution of Haemosporidia of birds in North Palaearctic". *Ekologija* 2, 57-66.
- Valkiunas, G., 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Fla.

- Valkiunas, G., Anwar, A.M., Atkinson, C.T., Greiner, E.C., Paperna, I., Peirce, M.A., 2005a. "What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians?". *Trends in Parasitology* 21, 357-8.
- Valkiunas, G., Bensch, S., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Hellgren, O., Bolshakov, C.V., 2006. "Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Underestimate Mixed Infections of Avian Blood Haemosporidian Parasites: Microscopy is Still Essential". *Journal of Parasitology* 92, 418-22.
- Valkiunas, G., Iezhova, T.A., 2001. "A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*". *Journal of Parasitology* 87, 930-4.
- Valkiunas, G., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Palinauskas, V., Sehgal, R.N.M., Bensch, S., 2008. "A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites". *Journal of Parasitology* 94, 1395-401.
- Valkiunas, G., Iezhova, T.A., Loiseau, C., Sehgal, R.N.M., 2009. "Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporean parasites in peripheral blood of naturally infected birds". *Journal of Parasitology* 95, 1512-5.
- Valkiunas, G., Križanauskienė, A., Iezhova, T.A., Hellgren, O., Bensch, S., 2007a. "Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of sylvian birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp. nov". *Journal of Parasitology* 93, 680-7.
- Valkiunas, G., Liutkevičius, G., Iezhova, T.A., 2002. "Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae)". *Journal of Parasitology* 88, 864-8.
- Valkiunas, G., Palinauskas, V., Ilgunas, M., Bukauskaite, D., Dimitrov, D., Bernotiene, R., Zehindjiev, P., Ilieva, M., Iezhova, T.A., 2014. "Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife". *Parasitology Research* 113, 2251-63.
- Valkiunas, G., Sehgal, R.N.M., Iezhova, T.A., Smith, T.B., 2005b. "Further observations on the blood parasites of birds in Uganda". *Journal of Wildlife Diseases* 41, 580-7.
- Valkiunas, G., Zehindjiev, P., Hellgren, O., Ilieva, M., Iezhova, T.A., Bensch, S., 2007b. "Linkage between mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium* (Novyella) *ashfordi* sp. nov". *Parasitology Research* 100, 1311-22.
- Valkiunas, G.A., 1996. "Ecological implications of Hematozoa in birds.". *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology* 6, 103–13.
- van Rooyen, J., Lalubin, F., Glaiot, O., Christe, P., 2013. "Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level". *Malar J* 12, 40.
- Vazquez, A., Sanchez-Seco, M.P., Ruiz, S., Molero, F., Hernandez, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C.G., Tenorio, A., 2010. "Putative new lineage of west nile virus, Spain". *Emerging Infectious Diseases* 16, 549-52.
- Ventim, R., Morais, J., Pardal, S., Mendes, L., Ramos, J.A., Perez-Tris, J., 2012. "Host-parasite associations and host-specificity in haemoparasites of reed bed passerines". *Parasitology* 139, 310-6.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Östman, Ö., 2004. "A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood". *Journal of Parasitology* 90, 191-4.

- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., Ottosson, U., 2002. "Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa". *Molecular Ecology* 11, 1545-54.
- Walther, E.L., Carlson, J.S., Cornel, A., Morris, B.K., Sehgal, R.N.M., 2016. "First molecular study of prevalence and diversity of avian haemosporidia in a Central California songbird community". *Journal of Ornithology* 157, 549-64.
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Liu, M., Zheng, Z., Zhang, H., Zhu, X., Wu, Z., Zhao, T., 2012. "Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding". *PLoS One* 7, e47051.
- Wang, L., Liu, Y., Zhang, S., Wang, Y., Zhao, J., Miao, F., Hu, R., 2014. "A SYBR-green I quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for rabies viruses with different virulence". *Virologica Sinica* 29, 131-2.
- Ward, R.A., 1992. "Third supplement to "a catalog of the mosquitoes of the world" (Diptera: Culicidae)". *Mosquito Systematics* 24, 177-230.
- Werblow, A., Klimpel, S., Bolius, S., Dorresteyn, A.W., Sauer, J., Melaun, C., 2014. "Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito *species Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths". *PLoS One* 9, e102158.
- White, B.J., Andrew, D.R., Mans, N.Z., Ohajuruka, O.A., Garvin, M.C., 2006. "West Nile virus in mosquitoes of northern Ohio, 2003". *Am J Trop Med Hyg* 75, 346-9.
- Wobeser, G.A., 1997. *Diseases of wild waterfowl*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Xu, W., Morris, U., Aydin-Schmidt, B., Msellem, M.I., Shakely, D., Petzold, M., Bjorkman, A., Martensson, A., 2015. "SYBR Green real-time PCR-RFLP assay targeting the plasmodium cytochrome B gene--a highly sensitive molecular tool for malaria parasite detection and species determination". *PLoS One* 10, e0120210.
- Yezerinac, S.M., Weatherhead, P.J., 1995. "Plumage coloration, differential attraction of vectors and haematozoa infections in birds". *Journal of Animal Ecology* 64, 528-37.
- Yıldırım, A., Dik, B., İnci, A., DüzlÜ, Ö., Önder, Z., Çiloğlu, A. 2016. *Culicoides pulicaris* kompleks türlerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi (Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi).
- Yıldırım, A., İnci, A., Duzlu, O., Biskin, Z., İca, A., Sahin, I., 2011. "*Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey". *Vet Parasitol* 178, 143-7.
- Yohannes, E., Križanauskienė, A., Valcu, M., Bensch, S., Kempenaers, B., 2009. "Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebird species with different winter habitat distribution". *Journal of Ornithology* 150, 287-91.
- Yuan, W., Zheng, Y., Sun, M., Zhang, X., Qi, Y., Sun, J., 2014. "Development of a TaqMan-based real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection of encephalomyocarditis virus". *Journal of Virological Methods* 207, 60-5.
- Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiunas, G., Bensch, S., 2008. "Dynamics of parasitemias of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler, *Acrocephalus arundinaceus*". *Exp Parasitol* 119, 99-110.