

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**CULICOIDES PULICARIS KOMPLEKS TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE FİLOGENETİK ANALİZİ**

Proje No: TSA-2015-5762

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Bilal DİK
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Öğr. Gör. Dr. Zuhale ÖNDER
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU
ERÜ Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı

Nisan 2016
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar bu çalışmaya TSA-2015-5762 kodlu proje ile finansman desteği veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

KAPAK	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	1
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3
2.1 <i>Culicoides</i> 'lerin Biyolojisi	4
2.1.1 Beslenme ve Konaklar	4
2.1.2 Hayat Siklusu.....	7
2.2 Sağlık ve Ekonomik Önem	11
2.2.1 Rahatsız Edici Etkisi.....	11
2.2.2 Allerjik Dermatitis	12
2.2.3 Vektörlük Rollerini	13
2.3 <i>Culicoides</i> ile İlgili Olan Fakat Taşınmayan Diğer Organizmalar	14
2.4 <i>Culicoides</i> Türlerinin Yayılımı	14
2.4.1 <i>Culicoides</i> erginlerinin kısa mesafe hareketleri.....	15
2.4.2 <i>Culicoides</i> erginlerinin uzun mesafe hareketleri	15
2.5 Sistematik.....	15
2.5.1 Genetik sinonimler	17
2.5.2 Subgenetik Klasifikasyon.....	17
2.6 <i>Culicoides</i> Türlerinin Klasifikasyonunda Morfolojik Karakterlerin Kullanımı	18

2.7	Moleküler İdentifikasyon	19
2.7.1	<i>Culicoides</i> Türlerinin DNA Analizi	19
2.8	<i>Culicoides pulicaris</i> Kompleks	21
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1	<i>Culicoides</i> Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon	28
3.2	<i>Culicoides</i> Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	29
3.2.1	Mt-COI Geninin Amplifikasyonu	29
3.2.2	Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu	30
3.2.3	Mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizi.....	32
3.2.4	<i>Culicoides pulicaris</i> L. Tür Kompleksi Tür Spesifik Primerlerin Analizi	33
4.	BULGULAR	35
4.1	Morfolojik İdentifikasyon Sonuçları.....	35
4.2	Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	38
4.3	Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları.....	45
4.4	Tür Spesifik Primerlerin Analiz Sonuçları.....	48
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	58
6.	KAYNAKLAR.....	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışma materyalini oluşturan <i>Culicoides</i> örneklerinin tür, cinsiyet, toplama tarihi ve yeri	28
Tablo 3.2 <i>Culicoides pulicaris</i> L. tür kompleksi tür spesifik primerleri	33
Tablo 3.3 <i>Culicoides pulicaris</i> L. tür kompleksi tür spesifik primerleri	34
Tablo 4.1 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları.....	40
Tablo 4.2 Mt-COI sekansları sağlanan <i>Culicoides</i> izolatlarının nükleotid kompozisyonları	41
Tablo 4.3 <i>Culicoides</i> izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları	44

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Ceratopogonidae ailesindeki türlerin filogenisi	4
Şekil 2.2 <i>Culicoides</i> türlerinin hayat siklusu.....	7
Şekil 2.3 <i>Culicoides</i> soyundaki tarif edilmiş yeni türlerin yıllara göre dağılım oranları.....	16
Şekil 2.4 <i>Culicoides pulicaris</i> grup üyelerinin ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları.....	22
Şekil 2.5 <i>Culicoides pulicaris</i> grup üyelerinin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları.....	23
Şekil 2.6 <i>Culicoides pulicaris</i> grup içerisinde yer alan Pulicaris, Fagineus ve Newsteadi kompleks üyeleri ile birlikte diğer türlerin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları.....	24
Şekil 2.7 Avrupada <i>Culicoides</i> soy altına bağlı türlerin filogenetik ilişkileri	26
Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası	31
Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler	31
Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi	32
Şekil 4.1 <i>C. flavipulicaris</i> belirlenen örneklerde kanat morfolojisi	36
Şekil 4.2 <i>C. fagineus</i> ve <i>C. newsteadi</i> belirlenen bazı örneklerde kanat morfolojisi.....	36
Şekil 4.3 <i>C. pulicaris</i> ve <i>C. punctatus</i> belirlenen bazı örneklerde kanat morfolojisi	37
Şekil 4.4 <i>C. lupicaris</i> kanat morfolojisi	37
Şekil 4.5 <i>Culicoides</i> spp. belirlenen örneklere ait kanat morfolojisi.....	38
Şekil 4.6 <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü	39
Şekil 4.7 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle mt-COI gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.	39
Şekil 4.8 Bazı plazmidlerde hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen ampikonlar	39
Şekil 4.9 <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları	43
Şekil 4.10 <i>Culicoides</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri	47
Şekil 4.11 <i>C. pulicaris</i> UOApulF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	48
Şekil 4.12 <i>C. pulicaris</i> UOApulF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları	49
Şekil 4.13 <i>C. punctatus</i> UOApunF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	49

Şekil 4.14 <i>C. punctatus</i> UOA _{pun} F (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	49
Şekil 4.15 <i>C. impunctatus</i> UOA _{imp} F (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	50
Şekil 4.16 <i>C. grisescens</i> UOA _{gri} F (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	50
Şekil 4.17 <i>C. newsteadi</i> UOA _{new} F (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	51
Şekil 4.18 <i>C. newsteadi</i> UOA _{new} F (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.19 <i>C. flavipulicaris</i> forward ve reverse primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği.....	52
Şekil 4.20 <i>C. flavipulicaris</i> FlavNP1F ve FlavNP1R primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.21 <i>C. punctatus</i> forward ve reverse primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	53
Şekil 4.22 <i>C. punctatus</i> PunNP1F ve PunNP2R primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	53
Şekil 4.23 <i>C. fagineus</i> kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği.....	54
Şekil 4.24 <i>C. fagineus</i> kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları	54
Şekil 4.25 <i>C. pulicaris</i> kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği.....	55
Şekil 4.26 <i>C. pulicaris</i> kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.27 <i>C. newsteadi</i> kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği.....	56
Şekil 4.28 <i>C. newsteadi</i> kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları.....	56
Şekil 4.29 Çalışmada yeni haplotip olarak belirlenen <i>Culicoides</i> nesillerine özgü primerlerin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği	57
Şekil 4.30 Çalışmada yeni haplotip olarak belirlenen <i>Culicoides</i> nesillerine özgü primerler ile PCR analiz sonuçları	57

ÖZET

Bu çalışma, Türkiye’de Batı Karadeniz Bölgesi ve Konya yöresinden toplanmış *Culicoides pulicaris* komplekste yer alan tür ve/veya haplotiplerin moleküler karakterizasyonlarını yaparak DNA barkodlarını sağlamak ve filogenetik yapılanmalarını ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür. Morfolojik identifikasyon verilerine göre tür düzeyinde gruplanmış örneklerden bireysel olarak genomik DNA izolasyonları yapılmış ve elde edilen izolatların barkod mt-COI gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Sonraki basamakta amplifikasyon ürünlerinin klonlama, plazmid pürifikasyonu ve sekans analizleri gerçekleştirilerek karakterizasyonları sağlanmıştır. GenBank aksesyonları sağlanan izolatların Dünyadaki homolog izolatlarla filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. 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. newsteadi*, *C. pulicaris*, *C. punctatus* türleri moleküler olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Çalışma ile *C. lupicaris* türünün Türkiye’deki varlığı ilk kez moleküler düzeyde belirlenmiş ayrıca *Culicoides* alt soyunda morfolojik verilerle birlikte muhtemel yeni bir tür karakterize edilmiş ve haplotip bazında özellikleri ortaya konmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’de *Culicoides* alt soyunda yer alan türlerin ilk kez moleküler karakterleri ve yapılanmaları tespit edilmiş olup elde edilen veriler bu alandaki sınırlı moleküler bilgi birikimine katkı sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: *Culicoides pulicaris* kompleks, PCR, moleküler karakterizasyon, filogenetik yapılanma

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSES OF *CULICOIDES PULICARIS* COMPLEX SPECIES

ABSTRACT

This study was conducted to provide DNA barcodes by molecular characterization and establish phylogenetic constructions of the species and/or haplotypes belong to *Culicoides pulicaris* complex that were collected from West Blacksea Region and Konya vicinity. Genomic DNA isolations were individually performed on the specimens which were grouped by means of species according to the morphological identification data and the barcode mt-COI gene region of the obtained isolates were amplified. In the next step characterization of amplification products were provided by utilizing cloning, plasmid purification and sequence analyzes. Phylogenetic constructions of the isolates in which the GenBank accessions were provided were determined along with the homologous isolates from the World. One hundred fifty-one polymorphic sites were distributed among the COI sequences of the obtained isolates from Pulicaris complex leading to the detection of 22 different haplotypes and *C. fagineus*, *C. flavipulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. pulicaris*, *C. punctatus* species were molecularly identified and characterized. The presence of *C. lupicaris* has firstly been identified based on molecular level in Turkey. Furthermore a possible new species under *Culicoides* subgenus along with morphological data was characterized and its characteristics was determined on the basis of a haplotype.

In conclusion, the molecular characters and constructions of the species under *Culicoides* subgenus were firstly revealed in Turkey with this study. The obtained data have also contributed to the restricted molecular knowledge in this area.

Key words: *Culicoides pulicaris* complex, PCR, molecular characterization, phylogenetic construction

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Culicoides cinsindeki sokucu sinekler (biting midges) (Diptera: Ceratopogonidae) evcil ve vahşi hayvanların yanı sıra insanlarda da hastalık oluşturan birçok patojene vektörlük yapmalarından dolayı oldukça önemli bir insekt grubunu oluşturmaktadırlar. 2000’li yıllardan itibaren Avrupa’da ortaya çıkan ve binlerce koyun-keçinin ölümüne neden olan mavidil virusunun vektörünün *Culicoides* soy altında yer alan *Culicoides pulicaris* sensu stricto olduğu belirlenmiştir. Morfolojik teşhis için en önemli kriterlerden biri olan kanat morfolojisinin *Culicoides* soy altındaki tür ve/veya tür komplekslerine (örn. *C. pulicaris* kompleks) ait nesillerde yüksek düzeyde değişkenlik göstermesi, erkeklerde hypopygiumun teşhiste önemli olmasına karşılık, araştırmalarda çoğunlukla dişilerin yakalanması nedeniyle bu soy altındaki türlerin teşhislerinde zorluklar bulunmaktadır. Son yıllarda moleküler biyolojik tekniklerin *Culicoides* türlerinin identifikasyonunda ve genetik farklılıkların araştırılmasında kullanılmaya başlanması ile birlikte birçok tür ve/veya tür kompleksi içerisinde kriptik türlerin varlığı ortaya çıkmaya başlamıştır. Tüm bu gelişmeler *Culicoides* soyundaki türlerinin taksonomik durumunun çözümlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuş olmakla birlikte henüz birçok tür ve/veya tür kompleksine ait nesiller için moleküler düzeyde verilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Bu proje çalışmasında Batı Karadeniz Bölgesi ve Konya yöresinden toplanmış ve morfolojik olarak *Culicoides* soy altında *Pulicaris* tür kompleksinde olduğu belirlenen örneklerin mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgelerinin moleküler karakterlerinin ortaya konarak filogenetik analizlerle identifikasyonlarının yapılması, kriptik türlerin sekans analizleriyle ortaya konması, ilgili komplekse ait bazı türler için bildirilmiş olan tür spesifik primerlerin geçerliliğinin belirlenmesi ve neticede elde edilecek tüm izolatların GenBank kayıtlarının gerçekleştirilerek tescillerinin sağlanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda ilk basamakta morfolojik kriterlere göre tür ve/veya haplotip bazlı olarak kategorize edilen ergin *Culicoides* örneklerinden ön homojenizasyon işlemlerinden sonra bireysel olarak genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA izolatları *Culicoides* mt-COI gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuştur. PCR analizleri sonrası izolatlara ait ampikonlar tür konfirmasyonları ve filogenetik analizler için uygun vektörlere insert edilip komponent *E. coli* hücrelerine transforme edilerek klonlanmıştır. Transforme kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapıldıktan sonra sekans analizleriyle ilgili izolatların gen dizilimleri elde edilmiştir. Belirlenen tüm izolatlar ilgili gen bölgesi sekanslarına göre tür ve/veya haplotip bazında karakterize edilmiş ve GenBank veri tabanına kaydedilerek

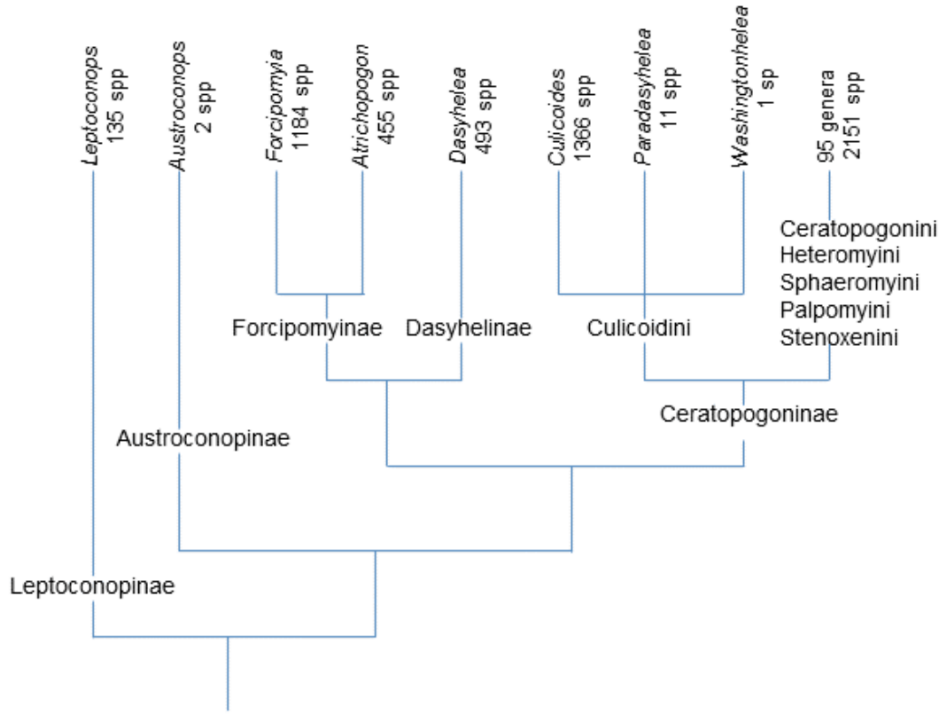
barkodlanmaları sağlanmıştır. Karakterizasyonları sağlanan *Culicoides* soy altındaki nesillere ait izolatların GenBank veri tabanında Dünyanın farklı bölgelerinden kayıtları sağlanmış homolog izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Culicoides türleri 140 milyon önce evrimleştiğine inanılan Ceratopogonidae (Diptera: Culicomorpha:Chironomoidea) ailesinde yer almaktadır (1). Bu ailedeki türler bazı özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (1): ocelli bulunmaz, postnatumda medial uzunlamasına oluk yoktur, kanatlar kenara kadar uzanan 1-3 radial ve 2 median dallara ayrılmıştır. Ön bacaklar diğer bacaklara göre kısa olup her bacağın ilk tarsomeri ikinci tarsomere eşit veya ikinci tarsomerden daha uzundur. Ceratopogonidae ailesindeki sinekler, Chironomidae ve Simuliidae ailesindeki sineklerle kardeş türler olup her üçü Chironomoidea üst ailesinde klasifiye edilmektedir.

Ceratopogonidler geniş bir habitatta bulunurlar ve bu ailedeki sineklerin çoğu insan ve hayvanlara atak yaparken diğer bir kısmı ise kakao ve kauçuk için önemli polenatördürler. Yine bu ailedeki sineklerin büyük çoğunluğu diğer insektler üzerinden beslenir ve bunlardan bazıları bu insekt konaklara muhtemelen patojenleri nakledebilmekte ve bu türlerin popülasyonları üzerine bir kontrol düzeyi oluşturabilmektedir. Ceratopogonidae ailesinde 6000'den fazla tür tarif edilmiş olup Borkent ve Grogan'a (2) göre henüz daha keşfedilmeyi bekleyen birçok yeni tür bulunmaktadır. Bu ailede beş alt aile ve 103 soy yer almaktadır (3) (Şekil 2.1).

Ağız parçalarının özellikleri itibariyle, Borkent (1) bilinen fosil türlerin büyük çoğunluğunun omurgalılarından beslendiği ve bu beslenme şeklinin Ceratopogonidae ailesindeki türler için pleisiomorphic karakterde olduğu sonucuna varmıştır. Buna karşın mevcut türler içinde omurgalı kanıyla beslenme eğilimi yalnızca dört soyda tespit edilmiştir (4). Omurgalı kanıyla beslenme eğilimi gösteren bu dört soy, *Austroconops* Wirth & Lee 1958, *Leptoconops* Skuse 1889, *Forcipomyia* Meigen 1818 ve *Culicoides* Latreille 1809 olup, sonuncusu oldukça büyük ekonomik öneme sahiptir ve bu soydaki türlerin veteriner ve medikal önemleriyle alakalı birçok çalışma yapılmıştır (5). *Culicoides* türlerine Antartika dışındaki tüm iklim şartlarında rastlanabilmektedir. Asya kıtasının güneydoğusundaki büyüklü küçüklü adalardan yalnızca Yeni Zelanda ve Hawaii'de bu türlere rastlanmamıştır. *Culicoides* türleri küçük, kahverengi veya gri renkli olup benekli kanatlara sahiptirler. *Culicoides* türleri, *Paradasyhelea* Macfie 1940 ve *Washingtonhelea* Wirth & Grogan 1988 soylarının da bulunduğu Culicoidini tribe'sinde yer almaktadır. *Culicoides*'ler, tarif edilmiş 1360'ın üzerinde türüyle en zengin soy olma özelliği taşımaktadır (3).



Şekil 2.1 Ceratopogonidae ailesindeki türlerin filogenisi (4)

2.1 *Culicoides*'lerin Biyolojisi

Culicoides soyundaki birçok türün kanla beslenme eğilimleri ve hastalık etkenlerini nakletmeleri, bu türlerin biyolojileri hakkında özellikle de vektörlük kapasiteleri, konak aralığı, beslenme davranışları, beslenme alanları, yumurtlama stratejileri, insanlara saldırımları ve kontrol metotları gibi konularda birçok araştırmaya ilham kaynağı olmuştur. İnsanlar veya hayvanlarla ilgisi olmayan *Culicoides* türlerinin biyolojileri hakkında yapılmış çalışma sayısı çok az olup bu soydaki türlerin birçoğunun biyolojileri hakkında henüz daha bilgi bulunmamaktadır (4).

2.1.1 Beslenme ve Konaklar

Bilindiği kadarıyla, *Culicoides* türlerinin sadece ergin dişileri omurgalı kanıyla beslenmektedir. Buna karşın sadece üç türün dişisinin kanla beslenmediği düşünülmektedir. Bu üç tür (*C. anophelis* Edwards 1922, *C. baisasi* Wirth & Hubert 1959 ve *C. culiciphagus* Wirth & Hubert 1959) *Culicoides trithecoides* Wirth & Hubert 1959 alt soyunda yer almakta olup bu türlerin diğer sineklerle veya doymuş sivrisineklerle beslendikleri rapor edilmiştir. Önceleri bu türlerin doymuş insektlerdeki omurgalı kanıyla beslendikleri düşünülüyordu (6, 7). Ancak bu görüşe Wirth ve Hubert (7) karşı çıkmış ve *C. anophelis* türlerinin sığır veya insanlardaki kanla beslenebilirliğini göstermişlerdir. Bunun yanında, Sen ve Das Gupta (8) ve Das Gupta (9) *C.*

anophelis türlerinin omurgalı kanından ziyade insektlerin hemolenfleriyle beslendiklerine dair kanıtlar elde etmişlerdir. Wirth ve Hubert (7) alt soy *Trithecooides*'i mandibula yapısına göre 3 tür komplekse ayırmıştır. Sivrisinek üzerinden beslenen *C. anophelis*, *C. baisasi* ve *C. culiciphagus* türleri kendi tür kompleksi içine yerleşmiş ve bu özellikleriyle *Trithecooides* soy altındaki diğer türlerden ayrılmıştır. Bu alt soy içerisinde omurgalılarından beslenen en az 10 tür ifade edilmiştir (7). Campbell ve Pelham-Clinton (10), *C. machardy* Campbell & Pelham-Clinton 1960, *C. truncorum* Edwards 1939 ve *C. albicans* (Winnertz 1852) türlerinin mandibular diş yapılarının gelişmediğini dolayısıyla bu türlerin omurgalılarından beslenebilme yeteneklerini kaybettiklerini bildirmişlerdir. Borkent (11), omurgalı kanıyla beslenen türlerin hepsinin mandibular dişlerinin iyi gelişmiş olduğunu, bu durumun da Campbell & Pelham-Clinton'un (10) hipotezini doğruladığını rapor etmiştir.

2.1.1.1 Konak Tercihleri

Culicoides türlerinin bilinen konaklarının birçoğu evcil hayvanlarda enfeksiyonların nakli veya insan pestlerinin rahatsızlık verme düzeyleri hakkında yapılmış çalışmalardan öğrenilmiştir. Bu sebeple, dünyanın birçok yerinde evcil hayvanlardan veya insanlardan beslenmeyen türlerin konakları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Jamnback (12), dişi türlerin antenlerindeki duyu organeli görevi yapan antennal flagellomerlerin [= sensilla coeloconica, SCo, sensu (13)] sayısı ile konak tercihleri arasında ilişki olduğunu rapor etmiştir. Araştırmacı (12) incelediği Neartik türlerde, büyük memelilerden beslendikleri bilinen türlerin antenlerinde 4-6. flagellomerler üzerinde, kuşlardan beslenen türlerin ise 8-13. Flagellomer üzerinde sensilla bulunduğunu saptamıştır. Jamnback (12) yine, büyük memelilerden beslenen türlerin konaklarını bulmaları için fazla sayıda sensillaya ihtiyaçları olmadığını, kuş gibi daha küçük canlılardan kan emen sineklerin ise daha fazla sensillaya ihtiyaç duyduğunu ileri sürmüştür. Benzer şekilde Rowley ve Cornford (14) da dört Neartik türün palpuslarındaki sensilla sayısı ile konak tercihleri arasında benzer bir korrelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Rowley ve Cornford (14) ayrıca erkek bireylerde dişilere oranla çok daha az sensilla olduğunu gözlemlemişler ve bu durumun Jamnback'ın (12) hipotezini doğruladığını rapor etmişlerdir. Braverman ve Hulley (15), bu her iki gözlemi Afrika türlerinin palpal ve antennal sensillaları üzerine yaptıkları çalışmalarla konfirm etmişlerdir. Braverman ve ark. (16), tümünde olmasa da bazı İsrail türlerinde, konak tercihleri ile antennal sensillaların sayıları ile üçüncü ve dördüncü palpal segmentlerin oranları arasında korrelasyonlara dair kanıtlar bulmuşlar fakat buna karşın konak tercihi ile palpal sensillaların, mandibular ve maksillar dişlerin sayıları,

proboscis uzunluğu veya tırnak morfolojisi gibi faktörler arasında benzer bir ilişki tespit edememişlerdir. Meiswinkel ve Linton (17), *C. tuttifrutti* Meiswinkel et al. 2003 ve *C. pseudopallidipennis* Clastrier 1958 türlerinin büyümüş 3. palpal segmentinin ornithophilic yatkınlığı gösterdiğini ve bu durumun Jamnback (12) ve Braverman & Hulley'in (15) önerilerini doğruladığını bildirmişlerdir. Bazı *Culicoides* türlerinin çamur zıpzıplarından (mudskippers) [*C. garciai* Wirth & Hubert 1989, (18)] ve kaplumbağalardan [*C. phlebotomus* Williston 1896, (19)] beslenebildikleri rapor edilmiş olmasına karşın, reptil, amfibian ve balık gibi konaklara spesifik *Culicoides* türleri hakkında hiçbir veri bulunmamaktadır. Lewis (20), tatarcıkların ağız parçalarının morfolojilerindeki değişkenliklerin bu sineklerin konak tercihlerindeki farklılıklarını gösterdiğini ileri sürmüştür. Lewis'in (20) ağız parçalarının morfolojilerine göre yaptığı klasifikasyonlar genellikle bilinen sistematikte paraleldir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, Braverman ve ark. (16) İsrail'deki 39 *Culicoides* türünün ağız parçalarının morfolojileri ile konak tercihleri arasında hiçbir korrelasyon tespit edememişlerdir. Avusturalya türlerinin konakları hakkında pek çok bilgi mevcutken, konak tercihleri ile morfolojileri arasındaki korrelasyon hakkında ise bir o kadar az bilgi bulunmakta olup bu türlerin üzerine yapılmış çalışmalar genellikle evcil hayvan veya insanlarla alakalı türler üzerine yoğunlaşmıştır (4). Konak dağılımları bilinen bu türler için bazı türlerde konak çeşitliliği sınırlıyken [örn. *C. brevitarsis* Kieffer 1917 geniş ölçekte ruminantlar ve atlardan beslenmektedir (21)], bazı türlerde çeşitlilik oldukça fazladır (örn. *C. subimmaculatus* Lee & Reye 1953 ve *C. ornatus* Taylor 1913 türleri kuşlardan ve memelilerden beslenebilmektedir).

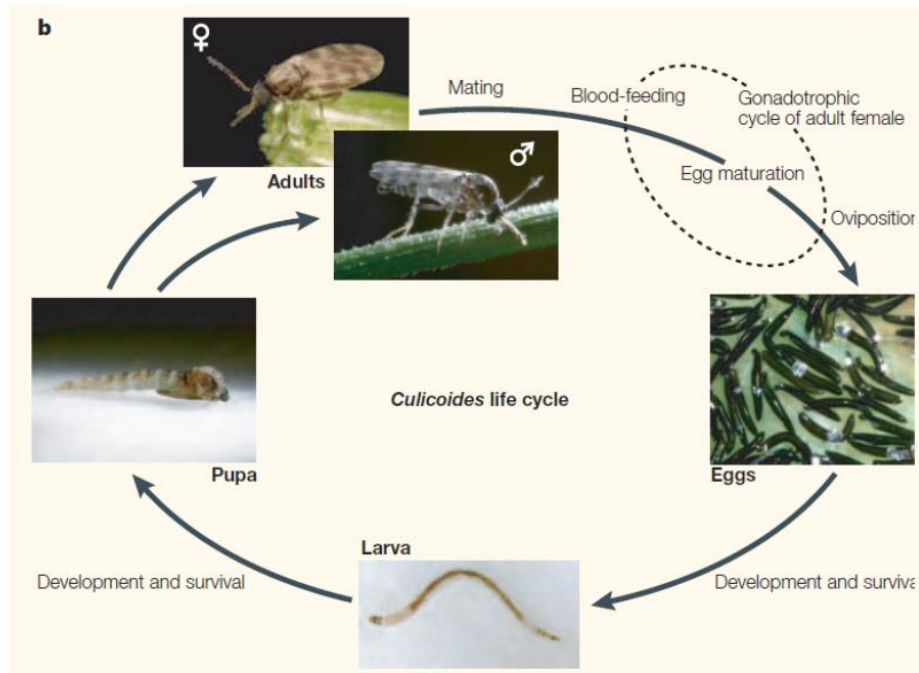
2.1.1.2 Beslenme Davranışı

Culicoides türlerinin dişileri, gündüz aktif türler arasında bildirilmesine karşın genellikle alacakaranlık veya gece aktif olma eğilimindedirler (22). Bazı *Culicoides* türlerinin ekzofilik olduğu ve beslenmek için binalara girme konusunda gönülsüz oldukları gösterilmiştir. Bu beslenme davranışı üzerine yapılan çalışmalar genellikle, viremik veya değerli hayvan stoklarının vektörlere maruz kalmasının önlenmesi üzerine yoğunlaşmış olup bu noktada özellikle şimdiye kadar çalışılmış olan türlerde bu fenomenun değişkenlik göstermesiyle non-vektör türlerin önceden tahmin edilmesi güçlük oluşturmaktadır (23-30). Bu sonuçlar bazı çalışmalarda ışık tuzaklarının kullanılmasıyla daha da komplike hale gelmiş olup, Carpenter ve ark.'nın (31) da belirttiği üzere ekzofilik türlerin binaların içine de saldırabilecekleri gösterilmiştir. Ayrıca bazı *Culicoides* türlerinin bina içindeki konaklarına, ışık tuzağı

yerleştirilmiş binalardaki konaklara nazaran daha farklı reaksiyon gösterdiklerine dair kanıtlar bulunmaktadır (29).

2.1.2 Hayat Siklusu

*Culicoides*ler, yumurta evresi, dört larva dönemi, pupa ve ergin dönemi olmak üzere tipik nematoceran hayat siklusuna sahiptirler (Şekil 2.2). *Culicoides* türlerinin yumurtaları silindirik, yaklaşık 400 µm uzunluğunda ve 50 µm genişliğinde olup genellikle üreme yerlerinin yüzey kısımlarına yumurtalarını bırakırlar (32). Larvalar ortalama 6. günde yumurtadan çıkarlar ve bazı türlerde hemen diapoza girerler (33-37). Larvalar iyi gelişmiş baş kapsülüne sahip kurtçuk şeklindedirler ve 9 abdominal segmentin yanında 3 de torasik segmente sahiptirler. Larvaların vücutları sıralı setalarla kaplıdır. Larvaların gelişimi tamamıyla beslenme ve sıcaklıktan etkilenmekte olup bazı tropikal türlerde larval gelişim 24 günde tamamlanmaktayken (38), bazı Arktik türlerde bu süre yaklaşık 2 yılı bulabilmektedir (39). Larvaların aksine pupa, taksonomik olarak sınıflandırılabilme özelliğine sahip operkulumun yerleşimi, solunum borusu ve abdomen yapısı gibi morfolojik özelliklere sahiptir.



Şekil 2.2 *Culicoides* türlerinin hayat siklusu (4).

2.1.2.1 Larval Habitat

Culicoides larvaları yüksek nemli üreme alanlarına ve organik maddelere ihtiyaç duymaktadır. Larvalar farklı katmanlarda bulunabilmektedirler. Birçok türün larvası sularda serbest olarak

yaşayabilmekten *Avaritia* alt soyundaki bazı türlerin larvaları yüzemez ve hayatta kalabilmek için katı veya yarı katı ortama ihtiyaç duyarlar (34, 40, 41).

Meiswinkel ve ark. (42) Afrika *Culicoides* türlerinin larval habitatlarını dört temel gruba ayırmıştır ki bu grupta bulunan Avusturalasya türleri için de geçerli olabileceği düşünülmektedir.

1. **Su/kara ara yüzü:** Avusturalasya türlerinin hemen hemen yarısı bu habitatta yaşamaktadır. Su akıntılı, durgun, tatlı, hafif tuzlu, tuzlu, temi veya kirli olabilmektedir. Ayrıca doğal şartlarda ya da modifiye [insan yapımı (örn. sondaj drenleri ve barajlar) veya hayvanların oluşturduğu (buffaloların yuvarlandığı çamurlu alanlar)] de olabilmektedir. Katmanlar kumdan toza ve çamura kadar değişebilmektedir.
2. **Hayvan gübresi:** Kettle ve Lawson (43) *Culicoides* türleri ile hayvan gübreleri arasındaki ilişkiyi tespit eden ilk kişiler olup araştırmacılar sığır gübrelerinde *C. chiopterus* (Meigen) 1830 ve *C. dewulfi* Goetghebuer 1936 (*C. pseudochiopterus* (44)) türlerini belirlemişlerdir. Büyük hayvanların özellikle de ruminantların gübrelerinin *Avaritia* alt soyuna ait 12 *Culicoides* türü tarafından kullanıldığı gözlemlenmiştir (45-49). *C. brevitarsis* (38, 45, 50), *C. brevipalpis* ve *C. wadai* (45); *C. kanagai* Khamala ve Kettle 1971 (47) ve *C. bolitinos* Meiswinkel 1989 (48) gibi bazı türler gübre dışında başka hiçbir ortamda yaşayamamaktadırlar. Avusturalasya türlerinden yalnızca üçü hayvan gübrelerini kullanmaktadır (45).
3. **Bitki ve kaya oyukları:** *Culicoides* türleri tarafından kullanılan oyuklar farklılık gösterebilmektedirler. Bazı oyuklar ağaçlarda bazıları küçük su ceplerinde bazıları da *Pandanus* gibi bitkilerin yapraklarının tabanında olabilmektedir. Ağaç oyukları 2-3 litre su ihtiva edebilmekte olup sürekli olarak çürümüş yapraklarla kontamine olup predatörlerin de aralarında olduğu birçok farklı omurgasız türüne de ev sahipliği yapabilmektedir (51).
4. **Çürümüş meyve, bitki ve mantarlar:** Rölatif olarak az sayıda *Culicoides* türünün çürümüş bitki materyali ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup Meiswinkel ve ark. (42) Afrika'da bu tür habitatların geniş ölçekte henüz keşfedilmediğini rapor etmişlerdir. Bu tür habitatları kullanan türlerin yaygın olarak *Avaritia* alt soyundaki türler olduğu kaydedilmiştir (18).

2.1.2.2 Pupal Davranış

Culicoides soyundaki sokucu sinekler yukarıda bahsedildiği üzere çok çeşitli habitatlarda gelişim gösterebilmekte olup bu farklı habitatlara yaşamlarını sürdürebilmek için gelişim dönemlerinde çeşitli fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlar sergileyebilmektedir. Dyce ve Murray (52), Batı Avustralya'daki *Culicoides*ler üzerinde yürüttükleri çalışmalar sonucunda üç farklı tip pupal davranış belirlemişler ve bu farklılıkların bilinmesiyle toplama ve kültür tekniklerinin etkinliğinin arttığına dikkat çekmişlerdir. Söz konusu bu üç pupal davranış tipi aşağıda gösterilmiştir.

Tip A (Substrattan su yüzeyine doğru çıkan ve yüzeyde kalan pupa)

Bu tip davranış şekli en yaygın olandır ve immatür dönemleri durgun veya çok yavaş akan su veya hafif tuzlu suların kenarlarında bulunan *C. austropalpalis*, *C. dycei*, *C. bunroensis*, *C. marksi*, *C. multimaculatas* ve *C. victoriae* türlerinde görüldüğü bildirilmiştir. Bu tip davranış şekli ayrıca gelgitli havuzlardaki yüzen alg yığınları üzerinde üreyen *C. henryi* türünde de gözlemlenmiştir. Yüzme özelliği muhtemelen pupal gelişimin farklı devrelerinde gelişmektedir fakat pupa yüzeye doğru geldiğinde tekrar dibe doğru batamaz ve uzun aksisi boyunca suya paralel olarak yüzer vaziyette kalır. Daha sonra hava ve su hareketleri ile dağılırlar ve sonradan suda şekillenen meniküslerde tekrar yığılım yaparlar (52).

Tip B (Su yüzeyine tekrarlı olarak yükselen, yüzey tabakasından ayrılan ve tabanda dinlenmek için dalan pupa)

Bu davranış şekli yalnızca ağaç oyuklarında gelişim gösteren iki tür *C. angularis* ve *C. mackerrasi*'de gözlemlenmiştir. Bu pupalar tabanda horizontal pozisyonda dinlenme halinde bulunurlar ve abdomenlerinin hafif sallayarak harekete geçirip yavaş bir şekilde yüzeye doğru yükselirler, bunun dışında bariz bir vücut hareketi sergilemezler. Pupa yükselirken ve batarken cephalothorax üstte olmak üzere dik bir şekilde durur. Su yüzeyinde sifonlarını havayla temas edecek şekilde vertikal olarak uzanırlar. Su yüzeyini abdomenlerini hafif sallayarak bırakırlar ve kademeli olarak dibe dalarlar. Su yüzeyinde eğer rahatsız edilirlerse ani bir şekilde yüzeyi bırakıp hemen dalış gösterirler. Bu davranış şekli ritmik olup şüphesiz pupanın respiratör gerekliliği ile kontrol edilmektedir. Pupanın yüzme özelliği çıplak gözlede görülebilir olan cephalothorax içindeki gaz içeriği ile ilişkilidir. Pupa hareketleri atmosferik basıncın suni

etkisiyle kontrol edilebilir ve atmosferik basıncın artışıyla yüzeye çıkışlarının engellendiği durumlarda muhtemel oksijen eksikliği sebebiyle pupalar ölebilir (52).

Tip C (Su altında kalan ve tabanda oyuk oluşturan pupa)

Gelgitli nehir ağzlarındaki kum birikintilerinde gelişim gösteren bir kısım *Culicoides* türlerinin pupaları bu şekilde davranış sergilerler. Bu türler yüzmezler ve bulundukları yerden çıkarıldıklarında abdomenin ilk halkasının uç kısmının lateral hareketleriyle hızlı bir şekilde (genellikle 15 saniyede) kum içerisine gömülürler. Pupanın anal segmentinin posterolateral çıkıntısı ve abdominal bristelları anterior olarak kıvrılır. Bu posterolateral çıkıntılar, deniz kumunda yerleşim gösteren *C. melleus* türünde de benzer şekildedir. Nehir kumlarından da çıkarılan diğer iki Avusturalya türü *C. molestus* ve *C. subimmaculatus* da benzer çıkıntı ve bristallara sahiptir. Bazı *Culicoides* türlerinin pupaları medcezlere bağlı olarak dönüşümlü olarak yüzeyde çıplak halde ve su altındaki kum birikinti alanlarında bulunmaktadır. Bu bölge dalgaların hareketleriyle de oluşturulabilen bir alan olup güneş ışınlarıyla ısıtmakta ve kurutulmaktadır. Bu pupaların aktif hareketlerinin, kum birikintileri içerisindeki lokasyonlarını korumayı garantiye almak amacıyla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca pupalar kum yüzeyin çok kuru ve sıcak olduğu durumlarda kendilerini daha derine gömebilirler (52).

2.1.2.3 Çiftleşme

Diğer birçok Culicomorpha ve geniş çapta diğer Diptera’da olduğu gibi *Culicoides* soyuna bağlı birçok türün erkekleri kümeler halinde birarada bulunurlar. Bu toplu halde bulunmanın esas amacı tartışmalı olsa da çiftleşmenin etkinliğini artırmak olduğu kaydedilmiştir (4). *Culicoides* kümeleri genellikle zemin üzerinde koyu ve açık alanların karışımı tarzında görsel markerlar oluştururlar. Birçok türde bu kümelenme alacakaranlıktan hemen önce şekillenmeye başlar ve her zaman dişilerden çok daha fazla erkekleri içerir (4). Downes (53), bu görsel kümelerin hem erkek ve hem de dişileri cezbediğini ve bu kümelerin erginlerin bir araya gelmesi için ve çiftleşmeyi kolaylaştıran bir mekanizma olduğunu bildirmiştir. Downes (54) sonradan bu kümelenmenin erkeklerde spermatidlerin hızlı transferine imkan sağlayan spermatophore üretimini stimüle edebildiğini ve dolayısıyla kopulasyon için gerekli zamanı düşürdüğünü kaydetmiştir.

Erkekler anlaşıldığı kadar küme içerisindeki dişileri bulmak için işitsel sinyalleri kullanmaktadır (55). Culicomorpha’nın birçok türünde erkeklerin antenleri bazal segmentte

helezon tarzında mekanoreseptiv duyuşal kıllar (sensilla chaeticae) ihtiva eder ve bunlar ses dalgalarını algırlarlar. İşitsel sinyaller bu mekanoreseptiv kıllar tarafından alınır ve antenlerin pediceli üzerindeki Johnston's organında kaydedilir. Buna zıt olarak dişilerin antenleri çok daha az mekanoreseptiv kıl bulundurur ve işitsel sinyallere duyarlı olarak gözükmemektedirler (56). Birçok diğer grupların kümelenmeyi çiftleşme stratejisi olarak kullanmalarına karşın bu anten dimorfizminin Culicomorpha ile sınırlı olması dikkat çekicidir (4).

Küme oluşturmada çiftleşme davranışı bazı *Culicoides* türlerinde görülebilmektedir. Downes (53), *C. nubeculosus* ve *C. sonorensis* için fakültatif kümelenme davranışı bildirmiş olup, bu karakterleri bu türlerin laboratuvar kolonilerinin oluşturulmasını mümkün kılmıştır. Araştırmacı (53) ayrıca *C. utahensis*'in omurgalı konağı üzerinde çiftleşebildiğini ve tanımlanmamış diğer bir türün de yerde çiftleştiğini gözlemlemiştir. Bu son iki türde modifiye çiftleşme davranışı erkek anten morfolojisine de yansımış olup büyük ihtimalle küme oluşturmaya erkeklerin küme içerisinde dişi bulmak için duyuşal işitme aparatlarına ihtiyacı olmamasıyla ilişkilidir. Wirth ve Hubert (18) ve Dyce (57) sonraları *C. kusaiensis* ve *C. agas* erkeklerinde anten tüylerinin bulunmamasının bir kümelenme olmayan çiftleşme stratejisini yansıttığını kabul etmişlerdir.

2.2 Sağlık ve Ekonomik Önem

Ceratopogonidae ailesindeki türler diğer hematofagöz insektlerde olduğu gibi, alerjik reaksiyonlara yol açmaları ve çeşitli bakteriyel, viral ve parazit patojenleri çeşitli konaklara nakletmeleri açısından yüksek medikal ve veteriner öneme sahiptirler.

2.2.1 Rahatsız Edici Etkisi

Tek bir sinek tarafından emilen kan miktarı yaklaşık 0,03µl (58) olup çok sayıda sinekle enfestasyonlar dahi kan kaybına bağlı problemlere yol açmamaktadır. Bununla birlikte ışık tuzaklarıyla çok fazla sayıda sinek toplanabilmekte olup (42) bunların sokucu popülasyonun yalnızca %1'ini temsil ettiği kaydedilmiştir (59). *Culicoides*lere dünya çapında verilmiş olan bazı yaygın isimler bu sineklerin Dünya çapında rahatsız edici etkilerinin önemini yansıtmaktadır. Öyle ki bu sinek türleri bilimsel lakaplarla anılmaktadırlar. Bu kötü şöhretlerine örnek olarak bilimsel lakab taşıyan *molestus*, *damnosus*, *irritans* ve *diabolicus* gibi türler verilebilir (4).

Avusturalya'nın kıyıya yakın çeşitli bölgelerinde, *Culicoides* türleri uzun zamandır insanlar için pest problemi oluşturmaktadır. İnsan pest türleri olarak isimlendirilen ilk Avusturalya türleri *C. molestus* ve *C. marmoratus*'dur. Son yıllardaki nüfus artışı ve turizm bu problemi daha da alevlendirmiştir. Kanal sulama sistemlerinin inşası, ırmak kenarlarının drene edilmesi gibi çevresel etmenlerden dolayı bazı bölgelerde bu sinekler için yeni yaşam habitatları meydana gelmiştir (60).

İnsanlarda enfestasyon önemlerine rağmen sadece birkaç bilimsel makalede bu konuya değinilmiş ve özellikle de bu yayınlarda sivrisineklerin etkileriyle kıyaslamalar yapılmıştır. Hendry (61), İskoçya'nın yüksek kesimlerinde *C. impunctatus*'un sosyo ekonomik etkileri hakkında bazı anekdotlar vermiştir. Yine Linley ve Davies (62), Karayipler'de bu sineklerin turizme etkileri hakkında raporlar sunmuşlardır. Queensland'in Hervey Bay bölgesinde *C. ornatus* türünün 25 milyon dolarlık ekonomik kayba yol açtığı rapor edilmiştir (63). Avusturalasya bölgesi diğer endemik bölgelerde olduğu gibi içerdiği faunasının az bir kısmı (<%3) insanlardan beslenen pestler olarak rapor edilmiş ve bu türler Pasifik'te *C. belkini* ve *C. peliliouensis* (64, 65) ve Avusturalya'da *C. ornatus*, *C. longior*, *C. molestus*, *C. marmoratus* ve *C. subimmaculatus* türleri olarak bildirilmiştir (60).

2.2.2 Allerjik Dermatitis

2.2.2.1 Medikal

Bazı *Culicoides* türlerinin rahatsız edici etkileri şüphe götürmezken, atakları takiben ciddi medikal rahatsızlıklara yol açtıklarına dair çok az rapor bulunmaktadır. Wirth ve Blanton (66) Panama'da bu sineklerin ataklarını takiben sekonder enfeksiyonların şekillendiğini, Wongsathuaythong ve ark. (67) ise Tayland'da sinek sokmalarını takiben insanlarda deri erozyonlarının oluştuğunu bildirmişlerdir.

2.2.2.2 Veteriner

Culicoides sokmalarına bağlı alerjik dermatitis olguları bir kısım konaklardan bildirilmiş olmakla birlikte en yaygın ve ağır reaksiyonlar atlarda bildirilmiştir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde *C. imicola*, *C. pulicaris*, *C. obsoletus*, *C. brevitarsis*, *C. impunctatus* ve *Culicoides* sp. gibi türlerin hayvanlarda güçlü kaşıntı, dermatit, hipersensitivite ve Kasen hastalığı gibi alerjik reaksiyonlara sebep oldukları rapor edilmiştir (68-72).

2.2.3 Vektörlük Roller

Farklı gruplardan birçok organizma artropodlar tarafından nakledilebilirken, *Culicoides*lerin yalnızca nematodlar, protozoonlar ve viruslarla ilişkili olduğu bilinmektedir. *Culicoides* türlerinin vektörlük rolleri üzerine çalışmaların büyük çoğunluğu medikal ve veteriner öneme sahip patojenler üzerine yoğunlaşmıştır. *Culicoides* türlerinin naklettikleri patojenler en ciddi ruminantları etkilemektedir (4).

Genel olarak nativ *Culicoides* türleri bölgeye dışarıdan gelmiş memelilerin patojenlerini nakledemezler (58, 73-76). Buna karşın bu yerli türler özellikle kuş ve keseliler olmak üzere nativ omurgalıların virusları ile ilişkilidirler (58, 77).

2.2.3.1 Nematodlar

Culicoides türlerinin vektörlüklerini yaptıkları nematodlar yalnızca Filarioidea üst ailesinde bulunan nematodlardır. Bu nematodların bazıları gerek insanlarda gerekse hayvanlarda parazitizme yol açmalarının yanında yüksek patojeniteye sahip değillerdir. *Culicoides* türlerinin naklettikleri türler arasında *Onchocerca sweetae*, *O. gibsoni*, *O. gutturosa*, *O. cervicalis*, *O. reticulata*, *Dipotalonema perstans*, *D. ozzardi*, *D. marmosetae*, *D. streptocercum*, *D. cauduspina*, *D. gracile*, *D. llewellyni*, *Splendidofilaria californiensis*, *S. picacardina*, *Chandierella quscali*, *C. striatospicula*, *C. chitwoodae*, *Eufilaria longicaudata*, *E. bartlettiae*, *E. delicata*, *E. kalifai*, *Macacanema formosana*, *Cercopithifilaria johnstoni*, *Durikainema macropi* ve *Ornithofilaria fallisensis* gibi nematodlar bulunmaktadır (78-84).

2.2.3.2 Protozoa

Culicoides türleri yalnızca Haemosporidea takımındaki protozoonların vektörlüğün yapmaktadır. Bu protozoonların çoğu kuş parazitleridir. Protozoonlardan *Hepatocystis kochi*, *H. brayi*, *H. levinei*, *Lecucocytozoon sp.* *L. caulleryi*, *Haemoproteus meleagridis*, *H. danilewski*, *H. fringillae*, *H. nettionis*, *H. meleagridis*, *H. desseri*, *H. canachites*, *H. velans*, *Trypanasoma spp.*, *Try. bakeri*, *Try. chabaudi*, *Try. davidmolyneuxi*, *Try. evertii*, *Try. gentilnii* ve *Try. avium* türler bu sinekler tarafından taşınmaktadırlar (4, 85-89).

2.2.3.3 Viruslar

Culicoides türleri bazı önemli nematod ve protozoon parazitlerini de naklettikleri halde esas itibariyle en önemli vektörlük rolleri naklettikleri viruslardan gelmekte olup bu viral hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Culicoides* türleri başta ruminant ve atlar olmak

üzere birçok hayvan türüne çeşitli virusları nakledebildikleri halde insanlara yalnızca bir virüs türünü (Oropouche) nakletmektedirler. Naklettikleri viruslar arasında Orbiviruslar (African horse sickness, Bluetongue virüs, bunyip creek, CSIRO village, D'Aguilar, Epizootic hemorrhagic disease virüs, Equine encephalosis virüs, Eubenangee, Kasba, Letsitele virüs, Marrakai, Midjinbarry, Nyabira, Wallal, Warrego, Wongorr), Bunyaviruslar (Akabane virus, Aiono virus, Ananindeua, Belmont, Bunyavirus sp., Douglas virüs, Keterah, Schmallerberg), Alphavirus (Barmah forest), Lyssaviruslar (Barur, Bivens arm, Bovine ephemeral fever virüs, Humpty Doo, Kimberley, Ngaingan, Tibrogargan) ve Vesiculovirus (Vesicular stomatitis, New Jersey strain) yer almaktadır (4, 58, 90-96).

2.3 *Culicoides* ile İlgili Olan Fakat Taşınmayan Diğer Organizmalar

Culicoides türleri ile mikroorganizmler arasındaki ilişkiler hakkında birçok araştırma yapılmış olup bu sineklerin viruslar, bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve nematodlar gibi birçok organizmayı taşıdıkları saptanmıştır (97). Bu organizmaların birçoğunun kommensal simbiyont oldukları kanıtlanmış olup *Heleidomermis* soyundaki mermithid nematodların *Culicoides* türleri için oldukça patojen oldukları ve sinek popülasyon dinamiklerini etkiledikleri bildirilmiştir (98).

Ceratopogonidlerin mermithid parazitleri Palearctic, Nearctic, Oriental ve Afrotropical bölgelerden rapor edilmiştir. Debenham (99), Avustralyan *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) türlerinde nematodların varlıklarını rapor etmiş, bunların muhtemelen mermithid olabileceğini bildirmiştir (98).

Genellikle enfeste sinek larvalarının büyük çoğunluğu parazitler tarafından öldürülürler. Mermithidler bazen yetişkin sinekleri de enfeste edebilmekte olup bu sineklerde normal olmayan morfolojik karakterler görülmektedir (100). Enfeste yetişkinlerde en sık görülen semptomlar erkek genital organlarında, antenlerde, palplerde ve ağız parçalarında görülmekte olup erkeklerde dişilere benzer karakteristik özellikler şekillenmektedir (100).

2.4 *Culicoides* Türlerinin Yayılımı

Culicoides türlerinin ve diğer insektlerin yayılımı genellikle kısa mesafeli veya uzun mesafeli olabilmektedir. Vektörlerin yayılım karakterleri üzerine yapılan birçok çalışma bitki viruslarının vektörleri üzerinde odaklanmış olup *Culicoides* türlerinin davranışlarının tahmin edilebilmesi henüz tam anlamıyla uygulanabilir değildir (101).

2.4.1 *Culicoides* erginlerinin kısa mesafe hareketleri

Culicoides erişkinleri genellikle zayıf uçucular olup 10 km'nin üzerindeki uzun mesafelere uçabilmeleri için rüzgara ihtiyaç duyarlar (32). Avusturalya'da yapılan çalışmalarda *Culicoides* erişkinlerinin uçuş mesafeleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda *C. flumineus*, *C. immaculatus*, *C. molestus* ve *C. subimmaculatus* için 400m ve *C. longior* için 800m (60), *C. ornatus* için 1,6-3 km (60, 102), *C. brevitarsis* için 40 m-2 km (103, 104) ve *C. marmoratus* için 16 km'lik (60) uçuş mesafeleri tespit edilmiştir.

2.4.2 *Culicoides* erginlerinin uzun mesafe hareketleri

İnsektlerin uzak mesafelere uçabilmeleri oldukça zordur. İnsektlerin uçuş mesafelerini ve davranışlarını kıyaslamak için karada veya karaya yakın seviyelerde [örn., direk tuzakları (105), vakum tuzakları (106), ışık tuzakları (107)], karaya yakın su kenarlarında (108), düşük rakımlarda (109) ve yüksek rakımlarda (110) gibi değişik birtakım teknikler kullanılmıştır.

Vektörlerin uzak mesafelere uçuşlarının indirekt ve tesadüfi kanıtları, rüzgar yörüngesindeki hastalık salgınları (111, 112) veya egzotik virüs istilalarına dayandırılarak değerlendirilmektedir (113, 114). Bu fenomen *Culicoides* türleri tarafından nakledilen 6 virus üzerinde Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Avusturalya bölgelerinde çalışılmış ve bu fenomenun oldukça yaygın olduğu ve ortak seyrettiği gözlemlenmiştir (115-117).

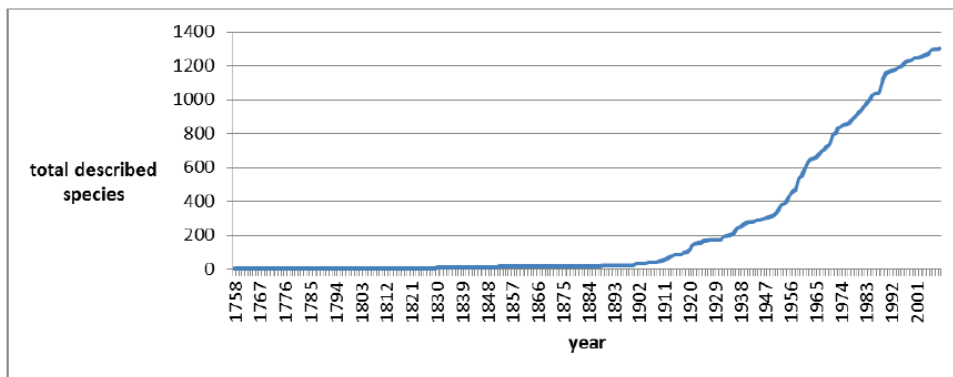
Son yıllarda elde edilen genetik bilgiler ışığında haemotophagous insektlerin uzak mesafe uçuşları hakkında kanıtlar sağlanmıştır. Chapman ve ark. (118), Papua Yeni Gine ile Kuzey Avusturalya'daki sivrisinek popülasyonları arasında gen aktarımı olduğunu göstermişlerdir. Yine Kuzey Akdeniz ve Kuzey Afrika arasında *C. imicola* türlerinin multiple istilalar gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir (119).

2.5 Sistematik

Ekonomik önemlerine rağmen *Culicoides* türlerinin erişkinlerine mutemelen çok küçük ebatlarda olmalarıyla ilişkili olarak önceki taksonomi araştırmacıları tarafından yeterli önem verilmemiştir (4). *Culicoides* türleri ilk kez 1758 yılında Linnaeus tarafından bildirilmiş ve 1900'lü yıllarda 22 tür tanımlanmıştır (4). Bu yıldan sonra tanımlanan tür sayısı Wirth'in (120) yeni sınıflandırmada monografi formatına kadar hızlı bir şekilde artmıştır (Şekil 2.3). Japonya (121), Mikronezya (64); Papua Yeni Gine (64, 122), İngiltere (10), Filipinler (123), Doğu

Afrika (124), Laos (125), Rusya (126), Güneydoğu Asya (18) ve son olarak da Çin'i (127) de kapsayayn monografiler dünyada tanımlanan *Culicoides* türlerine çok büyük katkı yapmıştır. Taksonomik aktivitedeki bu büyük oran ve hareketliliğin 1990'lı yıllardan sonra düşmeye başladığı görünmektedir (Şekil 2.3) (4).

Culicoides soyu barındırdığı türler açısından oldukça zengin bir soydur. Dünyadaki ilk fauna hakkındaki dokümanlar Arnaud (121) tarafından girilmiş olup 671 türün listesini çıkarmıştır. Daha sonra Arnaud ve Wirth (128) bu listeyi güncellemiş ve 671 türün üzerine 244 yeni tür ilave etmişlerdir. Wirth ve Dyce (129) *Culicoides* soyunda bulunan tür sayısını liste vermeksizin 1123 olarak rapor etmişlerdir. Daha sonra Boorman ve Hagen (130) 1537 türlük yeni bir liste yayımlamış, fakat sinonimleri identifiye etmemişlerdir. Bu sebeple araştırmacıların (130)bildirdiği toplam sayı geçerli türlerin gerçek sayısını yansıtmamıştır. Borkent ve Wirth (131) geçerli tür sayısının 1247 olduğunu belirtmiş ve bunlardan 37'sinin fosil tür olduğunu kaydetmişlerdir. Bu liste Borkent (3) tarafından interaktif olarak yayımlanmış ve Şubat 2012'de toplam sayı 1366'ya çıkarılmıştır. Bununla birlikte *Culicoides* soyu içersinde henüz tarif edilmemiş çok sayıda kriptik türlerin mevcut olduğu bilinmektedir. Örneğin, Dyce (132), Avusturalasya faunasında 118 tarif edilmemiş türün olduğunu işaret etmiştir. Aynı şekilde Meiswinkel ve ark. da (42) Güney Afrika'da yaklaşık 40 tarif edilmemiş türün varlığını bildirmişlerdir. Ilango (133) Hindistan'dan 26 türün kaydını yapmıştır. Borkent'e (3) göre Hindistan'da tarif edilmiş olan toplam 48 türün, Laos [62 tür kayıt edilmiştir (125)] gibi küçük ülkelerle kıyaslandığında oldukça düşük kaldığı ve muhtemelen Hindistan'da tarif edilmemiş tür sayısının daha yüksek olduğu hipotez edilmiştir.



Şekil 2.3 *Culicoides* soyundaki tarif edilmiş yeni türlerin yıllara göre dağılım oranları (3).

2.5.1 Generik sinonimler

Culicoides soyu ilk olarak Latreille (1809) tarafından *Ceratopogon punctatus* olarak tarif edilmiş ve yaklaşık 100 yıllık bir periyotta bu sınıflandırma geçerli kabul edilmiş ve bu yıldan sonra türler çoğunlukla *Ceratopogon* olarak sınıflandırılmışlardır. *Culicoides* soyunun sinonimleri olarak *Oecacta* Poey 1853; *Psychophaena* Philippi 1865; *Haematomyidium* Goeldi 1905; *Cotocripus* Brethes 1912; *Oxyhelea* Kieffer 1921; *Diplosella* Kieffer 1921; *Haemophoructus* Macfie 1925; *Synhelea* Kieffer 1925, *Prosapelma* Kieffer 1925 ve *Neoculicoides* Boorman ve Lane 1979 gibi isimlendirmeler yapılmıştır (4). Özellikle *Oxyhelea*, *Prosapelma* ve *Neoculicoides*, Borkent (3) tarafından geçerli alt soylar olarak klasifiye edilmişlerdir.

2.5.2 Subgenerik Klasifikasyon

Culicoides soyundaki gibi çok büyük ve geniş soylarda türlerin tamamının klasifikasyonlarını yapmak oldukça zordur. Soyların evrimleşme süreçlerinin anlaşılması ve ilgili türleri gruplandırılması mavidil virusunun muhtemel kompetent vektörünün *Avaritia* alt soyuna ait türlerin olduğu spekülasyonlarına yol açmıştır (75). Bu spekülasyon, son yıllarda Avrupa’da benzeri görülmemiş salgınlarda bu alt soya ait birçok türün mavidil virusunun orijinal vektörleri olduklarının belirlenmesiyle desteklenmiştir (134).

Root ve Hoffman (135), Nearktik fauna üzerinde çalışarak *Culicoides*’lerin sınıflandırmasında yaptıkları subgenerik kalsfikasyonla ilk teşebbüsü yapmışlar ve takiben de Edwards ve ark. da (136) Palearktik bölgelerdeki fauna üzerinde benzer klasfikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Fox (137) ve Vargas (138) ilaveten 2 alt soy oluşturmuştur. Wirth ve Blanton (66), resmi bir alt soy taksa oluşturma olayından kaçınmış ve daha büyük faunaların incelenmesi için ve “prioriat kuralları ve nomenkulatör sistemi” oluşturulana dek beklemeyi tercih etmiştir. Türleri gayriresmi tür grupları içerisine yerleştiren bu sistem yaygın olarak benimsenmiş ve halen formal alt soylardan (29 soy) daha çok sayıda resmi alt soy içerisine yerleşmemiş grup (39 soy) bulunmaktadır (3).

Tür gruplarının birçoğu tüm *Culicoides* faunasını dikkate alan çalışmalardan daha ziyade bölgesel faunalardaki revizyonları takiben oluşturulmaktadır. Bu nedenle, Campbell ve Pellham-Clinton’un (10) İngiliz faunasında ve Khamala ve Kettle’in (124) da Doğu Afrika faunasında yaptıkları revizyonlara dayalı monografik çalışmalar, türleri coğrafik bölgelerine

spesifik gruplar şeklinde uygun yerlere yerleştirmektedir. Bazı bilinen tür grupları muhtemelen monofiletikken ve alt soy gibi değerlendirilirken, Campbell ve Pellham-Clinton'ın (10) Segnis tür grubu Vargas (139) (*C. subg. Wirthomyia*) tarafından subgenerik durumuna yükseltilmiştir.

Borkent ve Grogan (2009), *Culicoides*'lerin mevcut subgenerik klasifikasyonlarının tatmin edicilikten uzak olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, monofilinin denenmesi veya subgenerik grupların akrabalıklarının saptanması amacıyla hiçbir filogenetik analizin yapılmadığını ve morfolojik özelliklerin öneminin genellikle kesin olmadığını ve morfolojiye göre yapılan çalışmalarda bir grubun içerisinde yer alan dişilerin ilgili gruba yakinken, aynı grup içerisinde bulunan bazı erkeklerin ise farklı bir gruba yakın olduğunu belirtmişlerdir. İsimlendirilmiş alt soyların test edilmemiş olması sıklıkla alt soyların sinonimi içine yada dışına çıkarılmasına ve aynı zamanda türlerin *Oecacta* gibi alt soy durumu zayıf olan alt soylara türlerin yerleştirilmesine yol açmış (129). *Culicoides Wirthomyia* alt soyu sinonimiye alınıp sonra çıkarılan subgeneralara bir örnektir. Bu subgenera Vargas (139) tarafından oluşturulmuş, Wada (140) tarafından ise yok sayılmış ve "Segnis grup" olarak isimlendirilmesi tercih edilmiş, Remm (141) tarafından *C. subgen. Oecacta* olarak değerlendirilmiş, Delécolle ve Kremer (142) tarafından yeniden ortaya sürülmüş ve Wirth ve ark. (143), Glukhova (126) ve Phillips ve ark. (144) tarafından da alt soy statüsü doğrulanmıştır. Bu alt soyun mevcut durumu tam net olmayıp Yu ve ark. (127) tarafından yapılan son düzeltmeye göre *Wirthomyia* alt soyunun tipik türü olan *C. segnis*, *C. subgen. Oecacta* içerisine yerleştirilmiş ve ilgili soy altı tekar yok sayılmıştır. Yu ve ark. (127) bu sinonimi üzerine herhangi bir hareketlilik önermemiş ve Borkent de (3) mevcut sinoniminin doğruluğuna dair görüş bildirmiştir.

2.6 *Culicoides* Türlerinin Klasifikasyonunda Morfolojik Karakterlerin Kullanımı

Culicoides türlerinin sistematikleri üzerinde önceki çalışmalarda kullanılan morfolojik özelliklerin birçoğu ya erkeklere ya da dişilere spesifiktir. Bununla birlikte kanatlardaki desenler her iki cinsiyet için de kullanılmakta olup bu kanatlardaki desenler erkek ve dişi türlerle ilgili en önemli ortak noktadır. Dişilerin morfolojik özelliklerinde sıklıkla kullanılan özellikler arasında; kanat macrotrichiası, mesonatal desenler, gözlerin birleşik ya da ayrı oluşu, 3. palpal segmentindeki duyu organının şekli, mandibular dişlerin sayısı ve şekilleri, cibarial armature, spermatekanın büyüklüğü, sayısı ve şekli, distalden proximale antennal segmentlerin uzunluk oranları, birinci ve ikinci arka tarsal segmentlerin uzunluk oranları, costal damarların ve kanatların uzunluk oranları, proboscis ve başın uzunlukları yer almaktadır. Erkeklerin

morfolojik özellikleri arasında ise; erkek aedeagus ve paramerlerinin şekli, 9. sternit üzerinde spikülün varlığı, 9. tergite üzerindeki postero-lateral çıkıntıların gelişim derecesi, gonocoxit'in dorsal ve ventral kökünün gelişim derecesi gibi özellikler yer almaktadır (3, 4).

2.7 Moleküler İdentifikasyon

İnsektlerin ve diğer canlıların identifikasyonlarının yapılması amacıyla DNA tabanlı moleküler analizler 1980'li yıllardan beri kullanılmaktadır (4, 145). Standard DNA bölgelerinin kullanımı Hebert ve ark. (146) tarafından "DNA barkodlaması" olarak isimlendirilmiştir. Türlerin isimlendirilmesi ve taksaların sistemik yerleşimine yardımcı olmak amacıyla rutin DNA kullanımına olan ilgi sonucu moleküler taksonomi çalışmaları hız kazanmıştır (147). Kullanılan DNA teknikleri, morfolojistler tarafından yapılan sistemik hipotezlerin test edilmesinde çok güvenilir teknikler olsa da bazı çalışmalarda geleneksel taksonomi tabanlı çalışmalara da ihtiyaç duyulabilmektedir (148). Modern çalışmalar, Dayrat'ın (149) "integrative taksonomi" modelini kullanma eğilimindedirler (150).

DNA barkodlama prensibi, tüm türlerin mitokondrial cytochrome oxidase I (COI) gen bölgesi içerisinde ortak bir m-DNA'ya sahip oldukları temeline dayanmaktadır (146). Ancak benzer barkodları paylaşan çeşitli türler de bulunmaktadır (148, 151). Yine çok sayıda farklı haplotiplere sahip tek türler de bulunmaktadır (119). Barkodlamanın esas amacı, tanımlanmış türlerin identifikasyonlarının yapılması olup hayat siklusundaki farklı dönemlerin de ayrımlarının yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Morfolojik özelliklere bakılarak yapılan identifikasyonlar insektlerin hayat sikluslarının farklı dönemlerinin ayırımında yetersiz kalabiliyorken DNA barkodla tekniği sayesinde türlerin farklı dönemlerde ayırımı da çok daha kolay olmaktadır. Örneğin bazı dişi veya olgunlaşmamış dönemdeki örneklerde morfolojik ayırım olanaksızken, COI barkodlaması bu örneklerin ayırımına da imkan vermektedir. Genellikle COI barkodlaması ve morfolojik ayrımlar birlikte kullanılmaktadır. DNA taksonomisinin türlerin belirlenmesinde ve morfolojik olarak ayıramayan kriptik türlerin ayırımında çok kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır (152).

2.7.1 *Culicoides* Türlerinin DNA Analizi

Culicoides türleri üzerine ilk genetik analizler Tabachnick (153) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı (153) starch jel elektroforezi kullanarak *C. variipennis*'in farklı alt türlerinin genetik

farklılıklarını belirlemek amacıyla 7 izo-enzim kullanmıştır. Bu çalışma sonucu 3 alt tür, tür seviyesine yükseltilmiştir (154).

Culicoides türlerinin ayrımında PCR teknolojisinin ilk kullanımı, Nearktik *Culicoides* türlerinin ayrımında polimorfik DNA'yı rastgele çoğaltan tRNA'yı bulan Raich ve ark. (155) tarafından gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda, COI, COII, 16S, ITS-1 ve ITS-2 DNA bölgelerini kullanarak yapılan genetik analizler ve rapid amplified polymorphic DNA markerları morfolojik olarak ayrımları oldukça zor olan *Culicoides* türlerinin ayrımında başarıyla kullanılmaktadır (4).

Bu çalışmaların büyük çoğunluğu Avrupa'da yapılmış olup genellikle veteriner önemi olan *Avaritia* ve *Culicoides* alt soyları üzerine yoğunlaşmıştır (17, 156-162). Subgenerik gruptandırma ITS-1 (163) ve COI ile COII (164) gen bölgeleri bazı gruplar için kullanılmış olup bu genlerin tür ayrımında oldukça etkili oldukları rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları kriptik türlerin varlığını ortaya çıkarmış ve sadece morfolojik bilgilere göre yapılan önceki sinonimlerde düzeltmeler yapılması ihtiyacını doğurmuştur (157, 161).

Subgenerik gruptandırmaların test edilmesi amacıyla moleküler tekniklerin kullanımı daha az dikkate alınmıştır. Bunun muhtemel sebebi morfolojik olarak benzer gruplar içerisindeki vektör türlerinin ayrımındaki ekonomik öncelikler olabileceği düşünülmektedir (örn. Avrupa'da mavidil virusunun naklinden sorumlu *Obsoletus* ve *Pulicaris* grupları). Sebastiani ve ark. (162) ve Linton ve ark. (158) *Avaritia* alt soyunun *Imicola* kompleksindeki Afrotropikal türlerin filogenik araştırmalarında COI gen bölgesini kullanırken, Gomulski ve ark. (165) aynı alt soyda yer alan *Obsoletus* kompleksindeki türlerin araştırılmasında ITS-2 gen bölgesini kullanmışlardır. Perrin ve ark. (163) *Culicoides* soyundaki Fransa türlerinin filogenisinde ITS-1 genini kullanmıştır. Matsumoto ve ark. (164) Japonyada inceledikleri bazı türlerinin morfolojik analiz sonuçlarıyla COI+COII filogenetik analizleri arasında ilişki kuramamışlardır.

Ceratopogonidae soy seviyesinde genelde çalışılmamış olup yalnızca bir çalışmanın varlığı görülmektedir. Bu çalışmada (166) COII gen bölgesi kullanılmış ve Ceratopogonidae'nin soy seviyesinde analizlerinde muğlak sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar (166) çalışmalarında data setlerinde bulunan her ne kadar üç *Culicoides* türünü ayırabilmişler de bu üç türün birlikte gruplanma göstermemiş olması ilgili genin bu aile için sınırlı bir kullanımının olduğunu göstermiştir. CAD gibi nükleer markerların kullanıldığı insektler üzerindeki diğer çalışmalar

(167-169) bu gen bölgesinin kullanışlı olduğunu kanıtlanmış ve *Culicoides* soyundaki çeşitli grupların çözümlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (4).

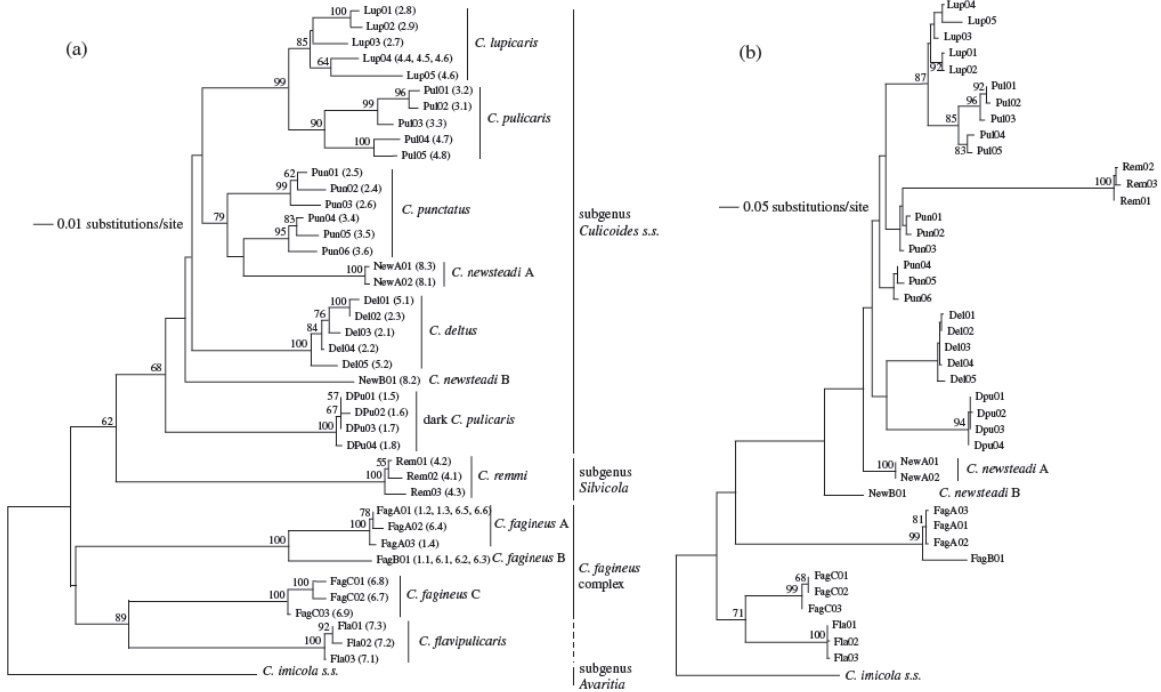
2.8 *Culicoides pulicaris* Kompleks

Culicoides pulicaris kompleks ilk kez Edwards (136) tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra Downes ve Kettle (44) Edwards'ın taksonomisini *C. pulicaris* sensu lato olarak isimlendirmiş ve *Culicoides grisescens* Edwards ve *Culicoides fagineus* Edwards olarak iki gruba ayırmıştır. Takiben Khalaf (170) *Culicoides* subgenusunu 5 gruba bölmüştür (bunlardan biri *pulicaris* grup diğeri de *chiopterus* gruptur). Sonraları yeni *Avaritia* subgenusu Fox (171) tarafından oluşturulmuştur. Zamanla bu alt grup hızla şeklini kaybetmiş ve günümüzde 3 veya daha fazla subgenerayı temsil eden 50 türün artifikal bir derlemesi haline dönüşmüştür (126, 172-174). Günümüzde bu kompleks türleri *Culicoides* soy altında ifade edilmektedir (175).

Tür düzeyinde *Culicoides* alt soyunun taksonomisi sürekli değişmektedir. Avrupa *Culicoides* faunası üzerine yapılmış kapsamlı bir çalışmada Campbell ve Pelham-Clinton (10) *C. pulicaris* grubundaki bireysel taksanın identifikasyonunun saptanmasının güç olduğunu bildirmişler ve “Birçok türün çok değişken olduğunu ve birbirlerine çok yakın oldukları için bireysel olarak ayırmanın yapılabilmesi için çok fazla tecrübenin gerektiğini” kabul etmek zorunda kalmışlardır. Ayrıca araştırmacılar (10) “Maalesef erkek hypopygia'sı yalnızca iki türün ayırımında işe yaramaktadır ve dişilerin morfolojik yapıları bireysel ayırmda erkeklere oranla biraz daha kullanışlıdır” şeklinde rapor bildirmişlerdir. Takip eden yıllarda Lane (176) *C. pulicaris* grubundaki sekiz türün kanat yapılarını analiz etmek için çok amaçlı morfometrik teknik geliştirmişlerdir. Buna karşın Paleartik bölgede *Culicoides* soy altını oluşturan türler geniş morfolojik çeşitlilik göstermeleri ve bu yüzden muhtemel birçok tarif edilmemiş türü gizlediği için kesin olarak bilinmemektedir. Bu sebeple birçok araştırmacı “tür kompleksleri” terimini kullanmıştır (42, 161, 177).

Culicoides pulicaris kompleks üyeleri üzerine ilk moleküler bazlı çalışma Gomulski ve ark. (157) tarafından ribozomal ITS-2 markerı kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada (157)); morfolojik kriterlere göre ayrılmış *Culicoides pulicaris* grupta yer alan *C. pulicaris*, *C. pulicaris* dark, *C. fagineus*, *C. lupicaris*, *C. punctatus*, *C. deltus*, *C. remmi*, *C. flavipulicaris*, *C. newsteadi* A ve *C. newsteadi* B türlerine ait izolatlar ilgili gen bölgesi yönünden filogenetik analizlere tabii tutulmuş ve NJ ve ML filogenisine göre filogenetik yapılanmaları (Şekil 2.4)

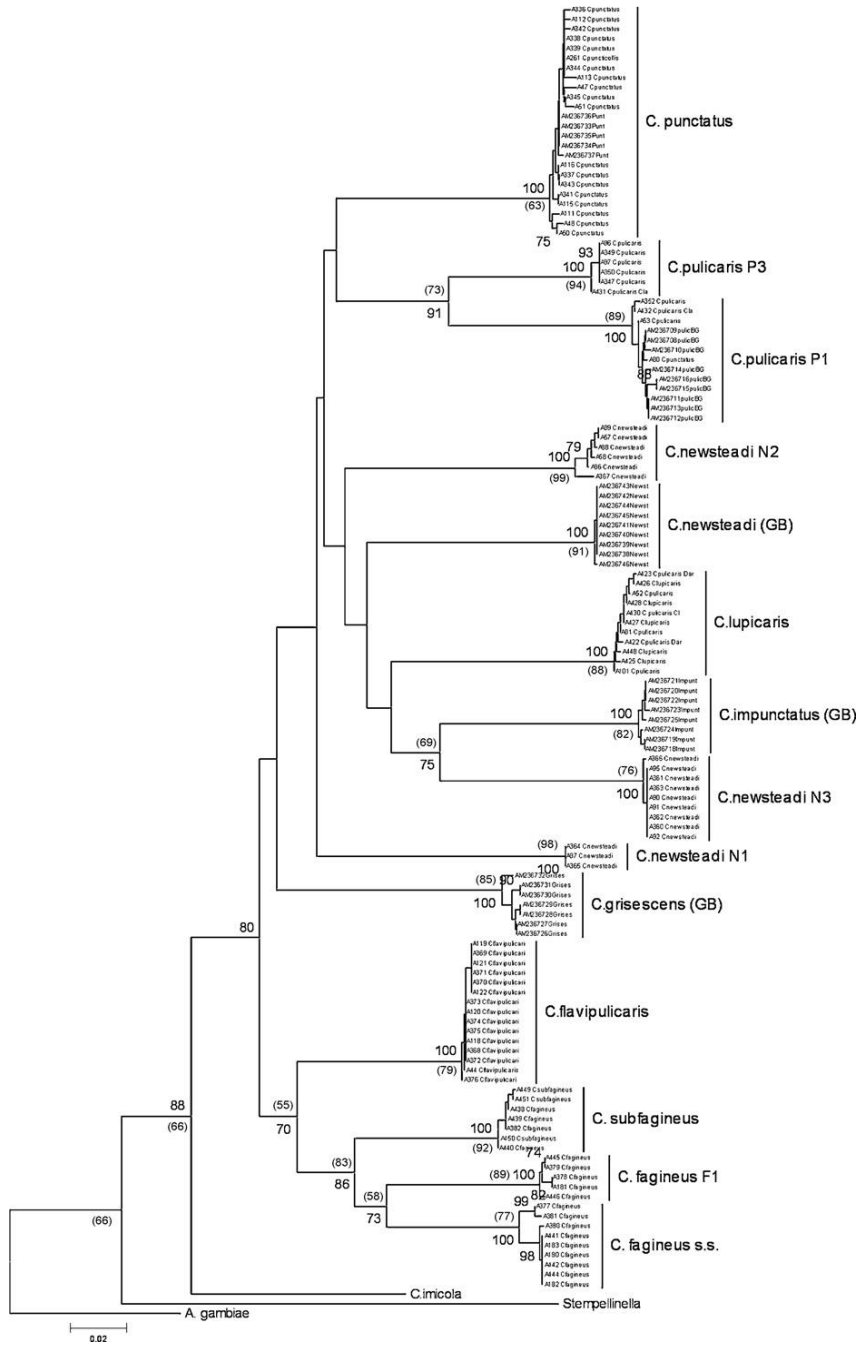
incelenmiştir. Nükleotid farklılıklar en yüksek *C. pulicaris* (0.058), *C. punctatus* (0.055) ve *C. lupicaris* (0.041) türlerinde saptanırken en düşük *C. newsteadi* A (0.000) türünde belirlenmiştir.



Şekil 2.4 *Culicoides pulicaris* grup üyelerinin ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik yapıları. a: Neighbour-joining ağacı; b: Maximum likelihood ağacı (157).

Araştırmacılar (157), *C. punctatus* ve *C. lupicaris*'in sinonimi olarak nitelenen sırasıyla *C. remmi* ve *C. deltus*'un ayrı türler olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

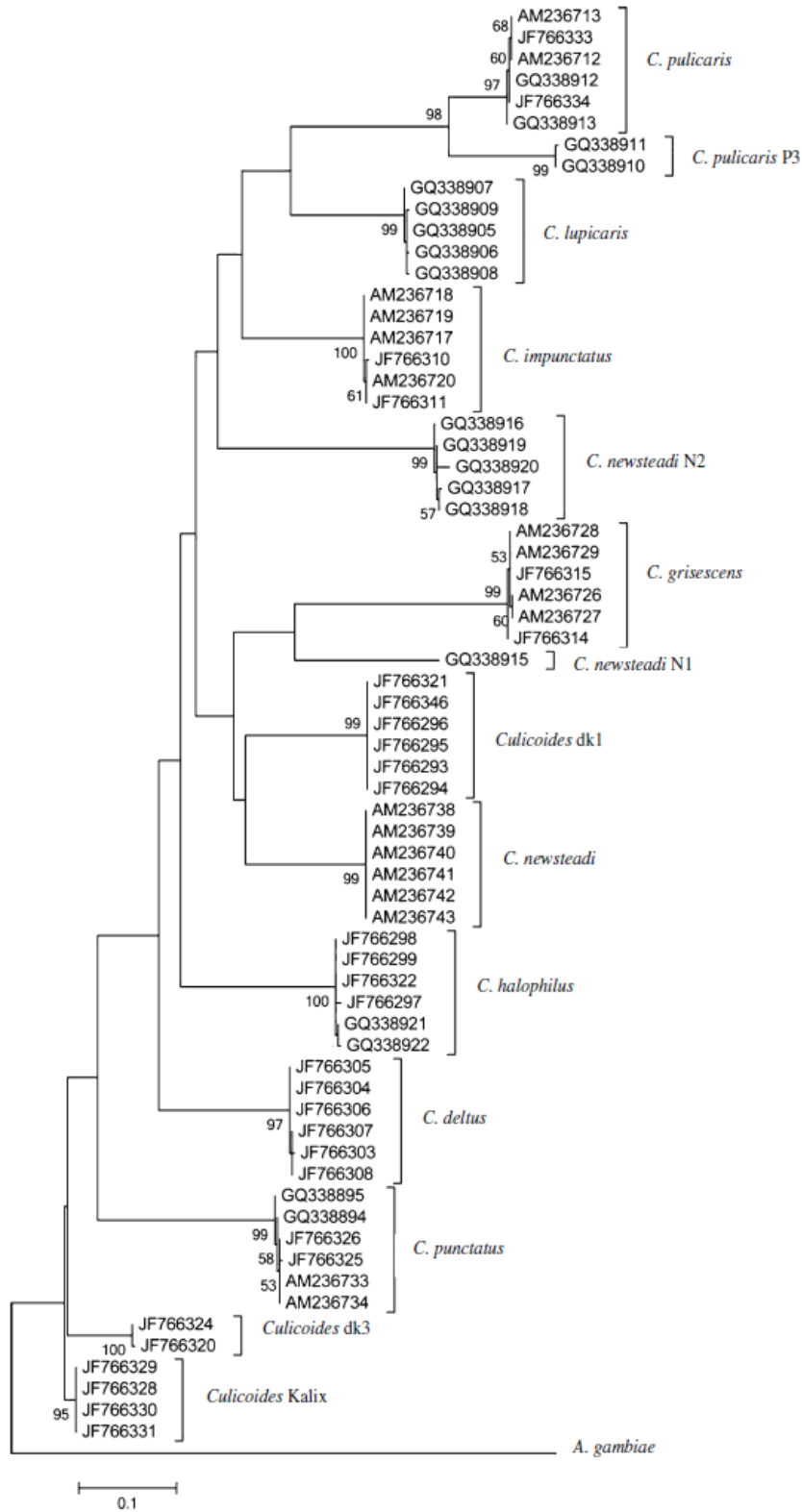
Nolan ve ark. (160), *C. pulicaris* tür kompleksinde yer alan 5 türün ilk kez mt-COI gen barkodlamasını yapmışlar ve filogenetik yapılarını (Şekil 2.5) incelemişler ve Gomulski ve ark. (157) tarafından ITS-2 gen bölgesine göre intraspesifik varyasyon belirlenen *C. newsteadi* de dahil olmak üzere kompleks içindeki türler için homoloji indeksini oldukça yüksek belirlemişlerdir. Araştırmacılar (160) elde ettikleri filogenetik sonuçlar ile *C. pulicaris* tür kompleksinde yer alan ilgili türler için tür spesifik primerler dizayn etmişler ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler düzeyde kullanılabilirliğini vurgulamışlardır.



Şekil 2.6 *Culicoides pulicaris* grup içerisinde yer alan Pulicaris, Fagineus ve Newsteadi kompleks üyeleri ile birlikte diğer türlerin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik yapılanmaları (161).

Lassen ve ark. (178), *Culicoides* soy altında yer alan türlerin identifikasyonu amacıyla mt-COI gen barkod bölgesinin kullanımını değerlendirmişlerdir. Araştırmada (178), *Culicoides* soy altındaki türler için mt-COI barkod sekans diversitesi tür içinde <1 bulunurken türler arası diversitenin %12,5 - %19,8 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada (178) *Culicoides* alt soyundaki türlerin *Monoculicoides* soy altındaki *C. nubeculosus*'a %24,4-%26,1 oranında farklılık gösterdiği kaydedilmiştir. Filogenetik analizlerde örneklerin dört yaygın

Palaearktık tür olan *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. impunctatus* ve *C. griseus*'i içermek üzere 8 yegâne cluster içerisinde ayrıştığı saptanmıştır (Şekil 2.7). Çalışmada (178) bu bulgulara ilaveten *C. halophilus*'un geçerli bir takson olduğu konfirme edilmiş ve ilk kez *C. deltus* barkod sekansı sağlanmıştır. Araştırmacılar (178) ayrıca üç ilave örnek grubu daha tanımlamışlar ve bunları *Culicoides* dk1, *Culicoides* dk3 ve *Culicoides* Kalix olarak isimlendirmişlerdir (Şekil 2.7). *Culicoides* dk1 mt-COI barkod sekans bölgesinin diğer *Culicoides* soy altındaki türlerle %14,3-%17,2 diversite gösterdiği, birbirleri arasında %5,9 sekans farklılığı belirlenen *Culicoides* dk3 ve *Culicoides* Kalix örneklerinin de *Culicoides* soy altındaki türlerle %12,5-%17,6 genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir (178). Nitekim farklı genetik kümeler oluşturan *Culicoides* dk1, *Culicoides* dk3 ve *Culicoides* Kalix'e, Nielsen ve Kristensen (175), tarafından genetik ve morfometrik karakterlerine göre *C. boyi*, *C. selandicus* ve *C. kalix* olarak yeni tür isimleri verilmiştir.



Şekil 2.7 Avrupada *Culicoides* soy altına bağlı türlerin filogenetik ilişkileri (AM: İngiltere, GQ: Katalonya, JF: Danimarka/İsveç) (178).

C. pulicaris L. tür kompleksi üyelerinin başta mavidil (bluetongue virus: BTV) ve Afrika At vebası Virusu (African horse sickness virus: AHSV) olmak üzere çeşitli patojenlere potansiyel vektörlük yaptığı ortaya konmuştur (161). Bu çerçevede yeterli bir risk değerlendirmesi için *C. pulicaris* L. tür kompleksi üyelerinin vektör etkinliklerinin başarılı identifikasyonu ile tür teşhislerinin ve coğrafik dağılımlarının bilinmesi gerekmektedir. Türkiye’de günümüze kadar *C. pulicaris* kompleks üyeleri üzerine moleküler çalışmalar bulunmamasına karşın yapılan morfolojik çalışmalarda *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. flavipulicaris* ve *C. fagineus*’a rastlandığı; *C. halophilus*, *C. deltus*, *C. lupicaris*, *C. impunctatus*, *C. grisescens*, *C. subgrisescens*’a ise henüz tesadüf edilemediği rapor edilmiştir (179).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *Culicoides* Örnekleri ve Morfolojik İdentifikasyon

Çalışma, önceki çalışmalar kapsamında Batı Karadeniz Bölgesi ile Konya yöresinden toplanmış, morfolojik identifikasyonlarla *Culicoides pulicaris* grupta oldukları belirlenmiş ve %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilmiş olan *Culicoides* türlerine ait örnekler üzerinde yürütülmüştür. Örnekler hakkında bilgi Tablo 3.1’de verilmiştir. Tablo 3.1’de görüleceği üzere bazı örnekler kompleks morfolojik yapıları ve diğer türlere benzerlikleriyle “?” olarak nitelenmiş ve olası kriptik türler veya yeni haplotipler olarak kategorize edilmiştir. Moleküler analizler öncesi analizlere dahil edilen örneklerin kanat morfolojileri tekrar incelenmiş ve stereo-mikroskopta görüntüleri kayıt altına alınmıştır.

Tablo 3.1 Çalışma materyalini oluşturan *Culicoides* örneklerinin tür, cinsiyet, toplama tarihi ve yeri

Protokol No	Tür/Tür kompleksi	Örnek sayısı	Toplanma Tarihi	Bölge
13	<i>C.fagineus</i>	10 dişi	15.08.2014	Yağmurca köyü Devrek Zonguldak
21	<i>C.fagineus</i>	10 dişi	10.06.2014	Şahneköyü/BARTIN
12	<i>C.flavipulicaris</i>	10 dişi	15.08.2014	Yağmurca köyü Devrek Zonguldak
15	<i>C.flavipulicaris</i>	10 dişi	13.07.2014	Akdoğan köyü Taşköprü Kastamonu
28	<i>C.lupicaris?</i>	10 dişi	14.08.2014	Kaynaşlı /Düzce
	<i>C.flavipulicaris?</i>			
	<i>C.fagineus?</i>			
	<i>C.newsteadi?</i>			
29	<i>C.lupicaris?</i>	10 dişi	15.08.2014	Yağmurca köyü Devrek Zonguldak
	<i>C.flavipulicaris?</i>			
	<i>C.newsteadi</i>			
10	<i>C.newsteadi</i>	4 dişi	14.07.1997	Konya (Koyunculık)
11	<i>C.newsteadi</i>	7 dişi	16.07.1997	Konya (Sığırcılık)
14	<i>C.newsteadi</i>	10 dişi	08.07.2014	Muratlar - Bolu
16	<i>C.newsteadi</i>	10 dişi	10.06.2014	Şahne köyü/Bartın
23	<i>C.newsteadi</i>	10 dişi	10.07.2014	Şiremir tabaklar/Bartın
24	<i>C.pulicaris</i>	1 erkek	14.08.2014	Sarıçökek köyü /Düzce
3	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	12.06.2014	Çiğil köyü /Kastamonu
4	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	08.07.2014	Bolu
8	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	13.08.2014	Göynükören köyü Gerede/Bolu
5	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	09.06.2014	Balıcak köyü Ulus /Bartın
17	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	09.06.2014	Aşağı Çerçi köyü Ulus /Bartın
18	<i>C.pulicaris</i>	10 dişi	10.06.2014	Şahneköyü /Bartın
1	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	09.06.2014	Balıcak köyü Ulus /Bartın
2	<i>C.punctatus</i>	11 dişi	12.07.2014	Çaycuma /Zonguldak
6	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	12.06.2014	Çiğil köyü /Kastamonu

7	<i>C.punctatus</i>	46 dişi	16.07.1997	Konya Harası (Sığırcılık)/Konya
9	<i>C.punctatus</i>	17 dişi	18.08.1997	Konya Harası (Koyunculuk) /Konya
19	<i>C.punctatus</i>	5 dişi	14.08.2014	Sarıçökek köyü Kaynaşlı / Düzce
20	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	18.08.2014	Yeniçağa/Bolu
22	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	15.08.2014	Devrek /Zonguldak
25	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	10.06.2014	Şahne köyü/Bartın
26	<i>C.punctatus</i>	1 dişi	10.07.2014	Şiremir Tabaklar/Bartın
27	<i>C.punctatus</i>	10 dişi	10.07.2014	Şiremir Tabaklar/Bartın

3.2 *Culicoides* Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

%70 etil alkol içerisinde muhafaza edilen ve morfolojik identifikasyonları sağlanıp görüntülenen bireysel *Culicoides* örnekleri sıvı azot ile ön homojenizasyona tabii tutulduktan sonra genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (Bioneer Exiprep™ 16) ve genomik DNA ekstraksiyon kitleri (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA, Corning; GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Final basamakta elüsyon 30 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. Örnekler ait genomik DNA'lar kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bir kısım örnekler ise Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific) ile DNA izolasyonuna tabii tutulmadan direkt PCR ile analizlerine tabii tutulmuştur.

3.2.1 Mt-COI Geninin Amplifikasyonu

Bireysel 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'-CCCGGTAAAATTAATAAATACTTC-3') (180) primerleri ve aynı bölge için modifiye edilmiş C1-J-1718M (F) (5'-GGAGGATTTGGAAATT GATTAGT-3') ve C1-N-2191M(R) (5'-CAGGTAAAATTAATAAATACTTCDGG-3') (156) 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 MgCl₂, 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. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir

kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak referens DNA izolatları ve çalışma süresince elde edilen 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.

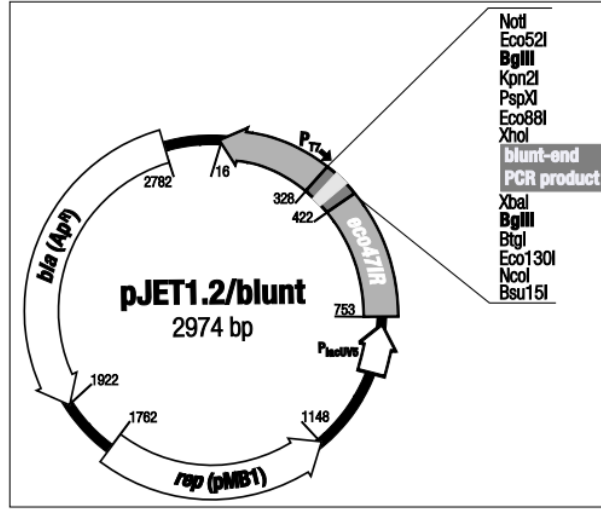
3.2.2 Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması ve Plazmid DNA İzolasyonu

Tür veya haplotip bazlı kategorize edilen örnekler için izolatların PCR analizleri sonucu elde edilen ampliconlar jel pürifikasyon işlemleri sonrası sekans ve filogenetik analizler amacıyla klonlama ve plazmid pürifikasyon işlemlerine tabii tutulmuştur.

Klonlama prosedürlerinin ligasyon basamağında ilgili gen bölgesine ait ampliconlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyonu üreticinin açıklamaları doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

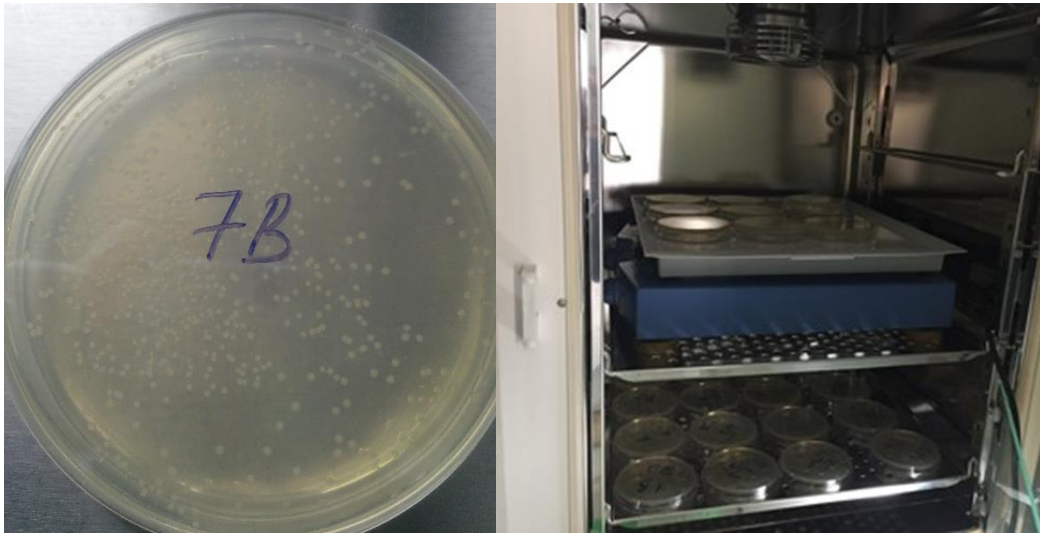
2X Reaction Buffer	10 µl
PCR product	1-5 µl (~10ng/µl)
Nuclease free water	17 µl'ye kadar
DNA Blunting Enzyme	1 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır. Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 25 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt Cloning Vector haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 pJET1.2/blunt cloning vector haritası

Klonlama prosedürünün transformasyon basamağında 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücreleri üzerine eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonra hücreler önce 42°C'de 2 dk daha sonra buz üzerinde 4 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı uygun konsantrasyonda ampisilin ihtiva eden LB (Lurie-Bertani) katı besi yerine ekilerek kolonilerin gelişimi için bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. LB katı besi yerinde üreyen kolonilerden (Şekil 3.2) izolat başına 2 koloni seçilmiş ve steril pipet uçları ile bu koloniler alınarak işaretlenmiş LB katı besi yeri içeren pleytler üzerine (her pleyt dörde bölünerek her bölmeye bir koloni geçilmiştir) tekrar ekilerek 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2 LB katı besi yerinde üreyen koloniler

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için aynı koloniye ait her bir işaretlenmiş bölgeden tek bir koloni seçilerek koloni secreening PCR yapılmıştır. Koloni PCR’da vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri (Thermo Scientific) kullanılmıştır. PCR sonucu oluşan ampikonlar %1.5’luk agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiş ve vektör+insert varlığı yönünden konfirmasyonu sağlanmıştır.

Vektör+insert varlığı yönünden konfirme edilen kolonilerden (İşaretlenmiş pleytlerde aynı bölmede bulunan koloniler) en az iki adedi seçilerek steril özeler ile alınmış ve uygun konsantrasyonda ampicilin ihtiva eden 5 ml hacimde LB sıvı besi yerlerine ekimleri yapılarak 37°C’de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Kolonilerin LB sıvı besi yerinde üretilmesi

Sıvı besi yerinde üretilen hücrelerden 2 ml alınarak 8000 rpm’de 2 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuş ve hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp hücresel pelet GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plazmid pürifikasyonuna alınmış, aynı örneklere ait diğer bir kısım hücresel pelletler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza altına alınmıştır. Elde edilen plazmidler insertlerin varlığı yönünden vektör spesifik pJET1.2 forward ve pJET1.2 reverse primerleri ile prosedürüne uygun olarak PCR’da analize tabi tutulmuştur.

3.2.3 Mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizi

İlgili gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA’lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait

kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 8.1.8 (181) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 8.1.8 (181) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapılanmaların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin belirlenmesinde jModelTest 2 (182) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed inv (GTR+G+I) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.8 (181) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (183) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç “burn in” olarak çıkarılmıştır). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.

3.2.4 *Culicoides pulicaris* L. Tür Kompleksi Tür Spesifik Primerlerin Analizi

C. pulicaris s.s., *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. flavipulicaris*, *C. fagineus* ve *C. lupicaris* türlerinin moleküler identifikasyonu amacıyla mt-COI gen bölgesini hedef alan ve tür spesifik olarak nitelenen çeşitli primer çiftleri (160, 161) spesifite açısından sekans analizleriyle konfirme edilmiş türlere ait plazmidler kullanılarak PCR ve Multiplex PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla PCR analizlerinde kullanılan primerler Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.2 *Culicoides pulicaris* L. tür kompleksi tür spesifik primerleri (160).

Primer	Sequences (5'–3')	T_m (°C)	Annealing temperature ^a (°C)	Product length ^b (bp)
<i>C. pulicaris</i> s.s. UOApulF	CATCCGTAGACTTGGCCATT	60	62	327
<i>C. punctatus</i> UOApunF	CTCTTTCGGCCAATGTATCC	60	62	357
<i>C. impunctatus</i> UOAimpF	GGAGCATCAGTCGATCTAGCA	61	64	331
<i>C. griseus</i> UOAgriF	CCCAGTCTTAGCAGGAGCCATT	61	62	150
<i>C. newsteadi</i> UOAnewF	CCCCCTCTTTCAGCAAATATC	60	64	361
C1-N-2191 ^c	CAGGTAAAATTAAATATAAACTTCTGG			

^a In combination with the reverse primer, C1-N-2191.

^b In combination with the reverse primer, C1-N-2191.

^c Reverse primer C1-N-2191 (Dallas et al., 2003).

Tablo 3.3 *Culicoides pulicaris* L. tür kompleksi tür spesifik primerleri (161).

Specie	Primer	Sense	Sequence	Annealing temperature (°C)	Diagnostic band (bp)
<i>C. flavipulicaris</i>	FlavNP1F	Forward	5'-AACTAATATTTCCCATGCAGGC-3'	^a 58, ^b 59	^a 352, ^b 141
<i>C. flavipulicaris</i>	FlavNP1R	Reverse	5'-ACGATCAAAAGTAATACCATG-3'	^c 59	^c 316
<i>C. punctatus</i>	PunNP1F	Forward	5'-CTCTTCGCGCCAATGWATCC-3'	^a 53	^a 360
<i>C. punctatus</i>	PunNP1R	Reverse	5'-AAATGAAATCCCGTTTGATCGC-3'	^c 54, ^d 54	^c 309, ^d 142
<i>C. punctatus</i>	PunNP2R	Reverse	5'-GAACTGGTAAAGATAAAAGTAG-3'	^c 53, ^d 54	^c 379, ^d 212
<i>C. pulicaris</i> P1	P1F174	Forward	5'-GCATCCGTAGACTTGGCC-3'	^e 63	^e 183
<i>C. pulicaris</i> P1	P1R337	Reverse	5'-ATACGGGAAGAGAGACTAACAG-3'	^c 61	^c 379
<i>C. pulicaris</i> P3	P3R262	Reverse	5'-TGAAATTCGTTAGAACGCATG-3'	^c 56	^c 306
<i>C. lupicaris</i>	PDNP1R	Reverse	5'-CTGCCAAACTGGTAAAGAAAG-3'	^c 58	^c 385
<i>C. fagineus</i> F1	F1R198	Reverse	5'-GAAATCCAGCTAAATGAAGT-3'	^c 52	^c 238
<i>C. fagineus</i> s.s.	F2R337	Reverse	5'-TAATACAGGGAGGGAAGAAGC-3'	^c 52	^c 377
<i>C. subfagineus</i>	F3Full	Forward	5'-ACGCTGGAGCTTCTGTAGATC-3'	^a 59	^a 325
<i>C. newsteadi</i> N1	N1F81	Forward	5'-CCTTACTCTTATTAAGCAGC-3'	^a 59	^a 422
<i>C. newsteadi</i> N2	N2F348	Forward	5'-CCTCCAGTTCCTGCTGGT-3'	^a 63	^a 157
<i>C. newsteadi</i> N3	N3R194	Reverse	5'-TGCCAGGTCTAGGGAGAAG-3'	^c 61	^c 234

^a In combination with C1N2191M.^b In combination with FlavNP1R.^c In combination with C1J1718M.^d In combination with PunNP1F.^e In combination with P1R337.

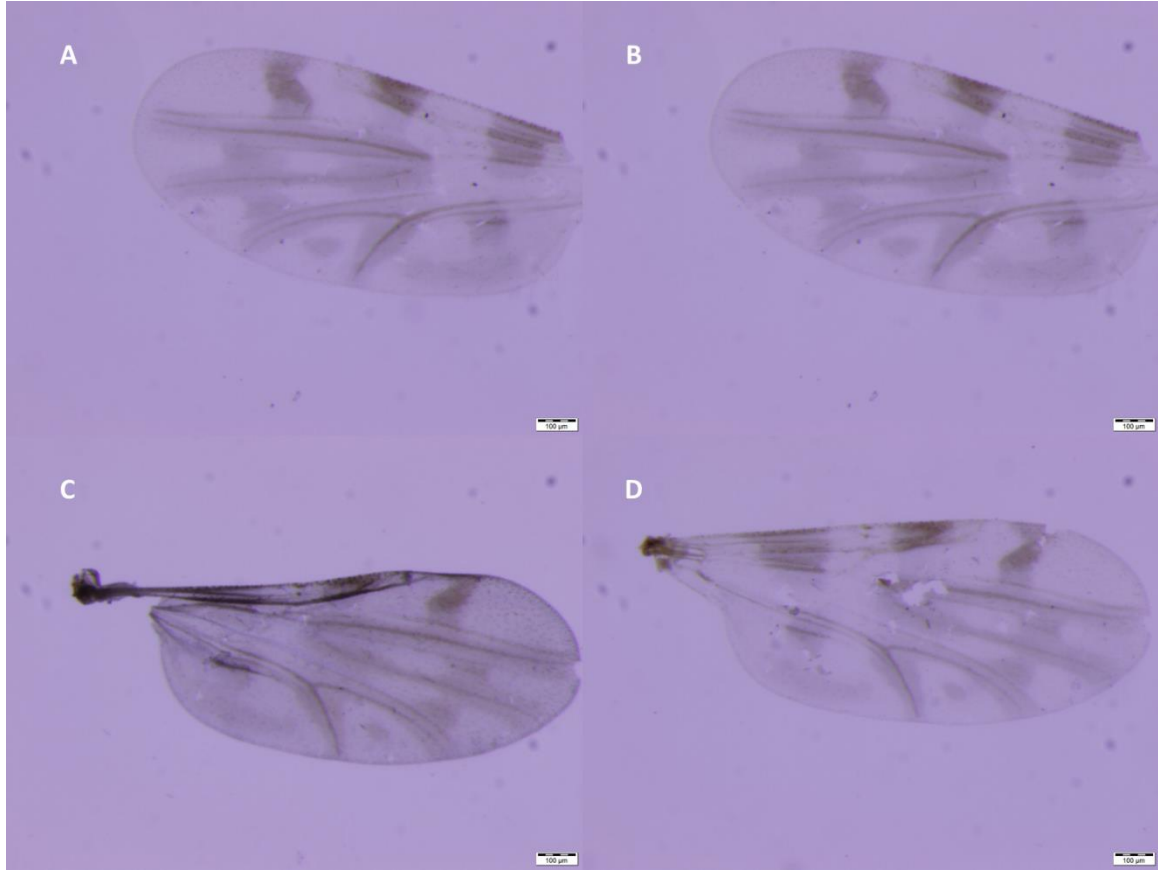
PCR ve Multiplex PCR reaksiyonlarında karışım her primer çifti için 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, [6 mM MgCl₂ 1. PCR; 3mM MgCl₂ 2. PCR], 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 10-20 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerde protokol initial denaturation: initial denaturation: 98 °C'de 3 sn; 35 siklus, denaturation: 98 °C'de 10sn, annealing: Multiplex PCR (Fagineus kompleks 50 °C, Pulicaris kompleks 52 °C, Newsteadi kompleks 50 °C), Tek PCR (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'deki annealing dereceleri) extension: 72 °C'de 20sn; final extension: 72 °C'de 5 dk olacak şekilde programlanmıştır. 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 Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

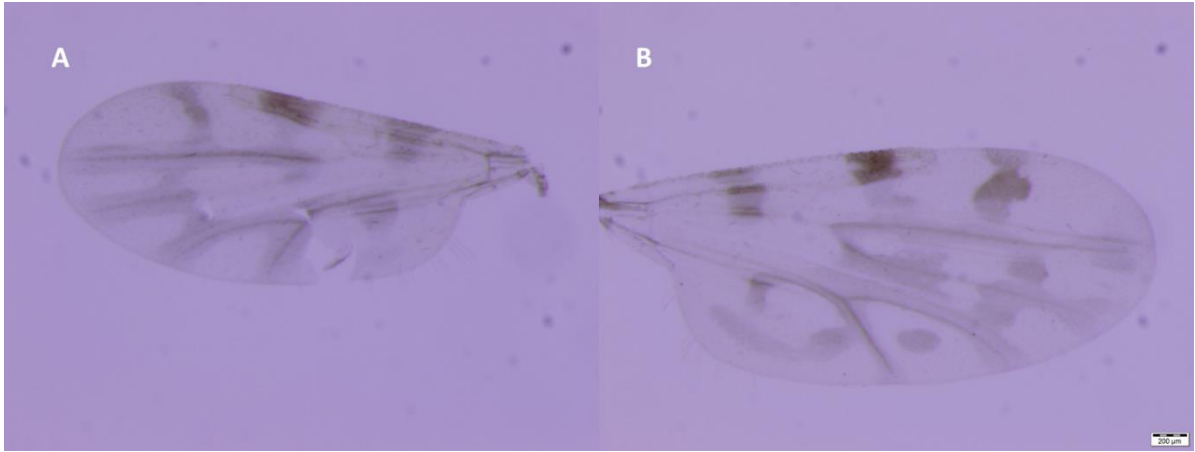
4.1 Morfolojik İdentifikasyon Sonuçları

Batı Karadeniz Bölgesi ile Konya yöresinden toplanmış, morfolojik identifikasyonlarla *Culicoides pulicaris* grupta belirlenmiş ve %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilmiş olan *Culicoides* türlerine ait örneklerin tür ya da haplotip bazında kanat morfolojilerine göre identifikasyonları ilgili teşhis anahtarlarına göre incelenmiş ve görüntülenmeleri sağlanmıştır. İncelenen tür ya da haplotiplere ait kanat morfolojisi görüntüleri Şekil 4.1-Şekil 4.5’de sunulmuştur. Şekil 4.5’de görüleceği üzere *Culicoides* spp. olarak identifiye edilen ve moleküler analizlerle *C. pulicaris* kompleks içinde farklı bir haplotip olduğu belirlenen örneklerde kanat morfolojisinin *Culicoides* soy altı özelliklerinin yanısıra bazı farklılık ve özgün yapılar sergilediği belirlenmiştir. Bu örneklerde kanat morfolojisi aşağıdaki özellikleri sergilemiştir:

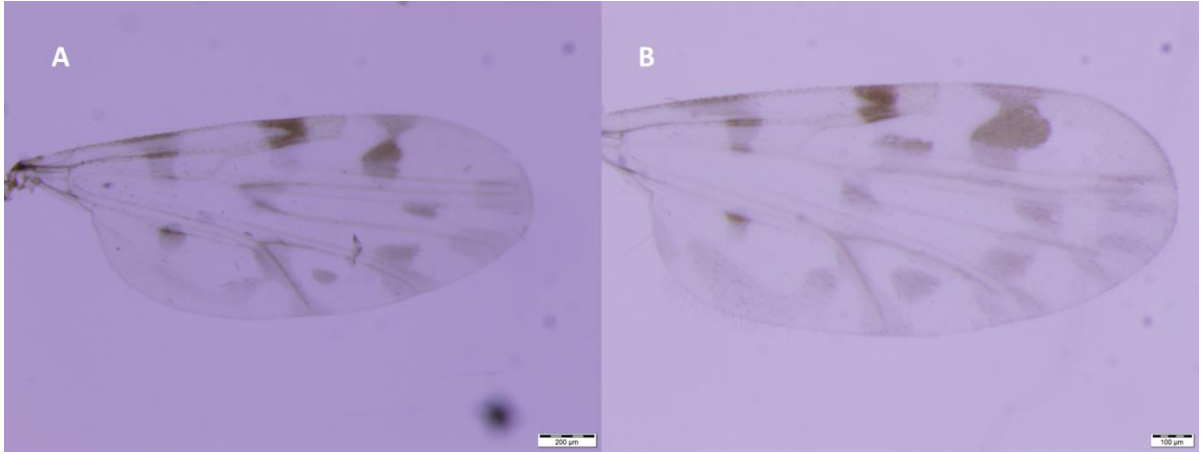
- Kanatlarda birden fazla açık alanların mevcudiyeti
- Açık kostal spotların koyu kostal spotlardan daha büyük olması
- M1’in median kısmı üzerinde bir açık spotun bulunması
- r3’de 3. koyu spotun anterior, median ve posterior kısımlarının yaklaşık eşit kalınlıkta olduğu
- M1, M2 ve CuA1 kanat kenarında, distal kısımda ven apekslerinde açık spot veya alanların bulunmadığı
- Anal cell’de distal kısımda açık iki spotun mevcudiyeti (distaldeki uzamış formda ve ince) ve bunların birleşme göstermesi
- m2 üzerinde proksimalden median kısma kadar iki açık bölgenin bulunduğu ve r-m crossven üzerinde uzanan açık bölgenin m2 üzerinde medialdeki açık spotla birleşme göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.1 *C. flavipulicaris* belirlenen örneklerde kanat morfolojisi, A-D: Teşhis edilen örnekler



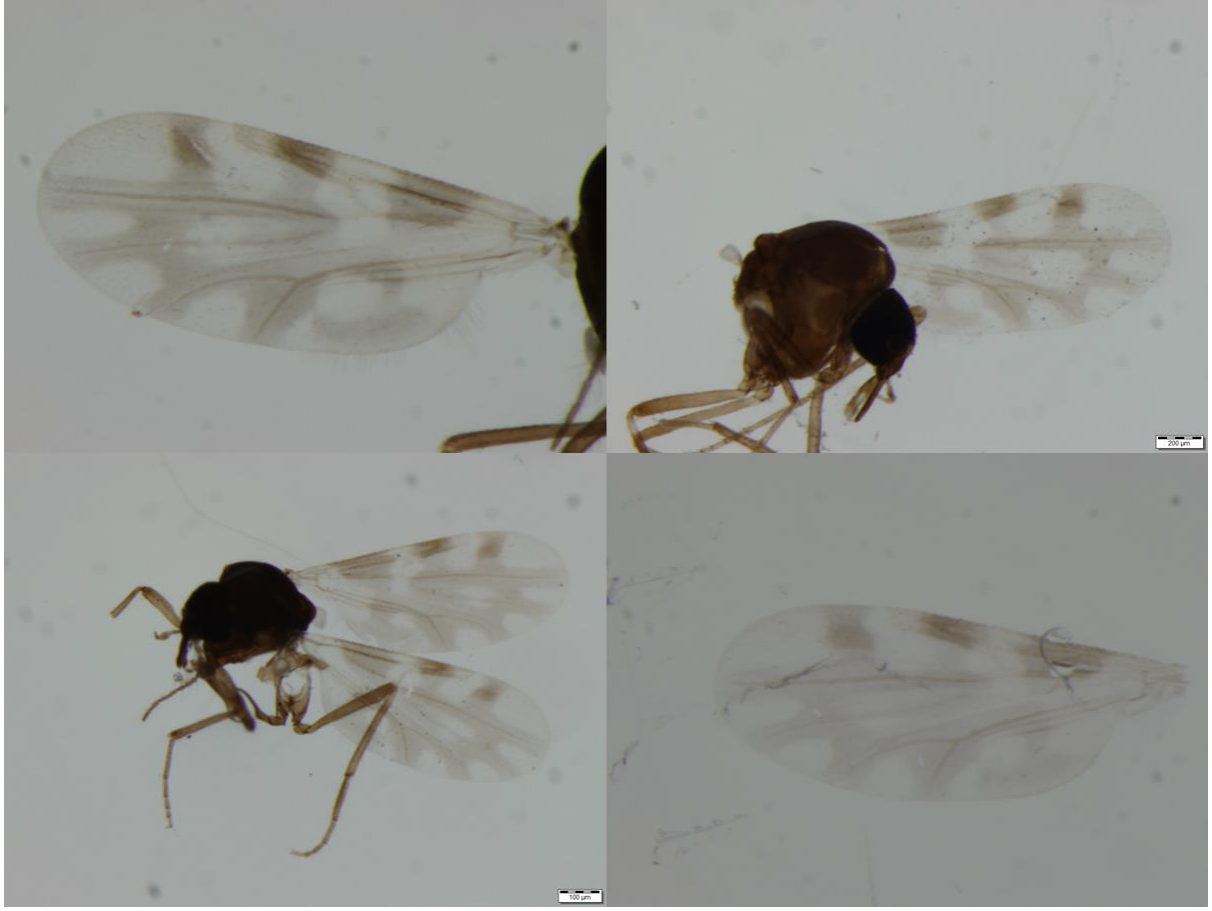
Şekil 4.2 *C. fagineus* ve *C. newsteadi* belirlenen bazı örneklerde kanat morfolojisi, A: *C. fagineus* B: *C. newsteadi*



Şekil 4.3 *C. pulicaris* ve *C. punctatus* belirlenen bazı örneklerde kanat morfolojisi, A: *C. pulicaris* B: *C. punctatus*



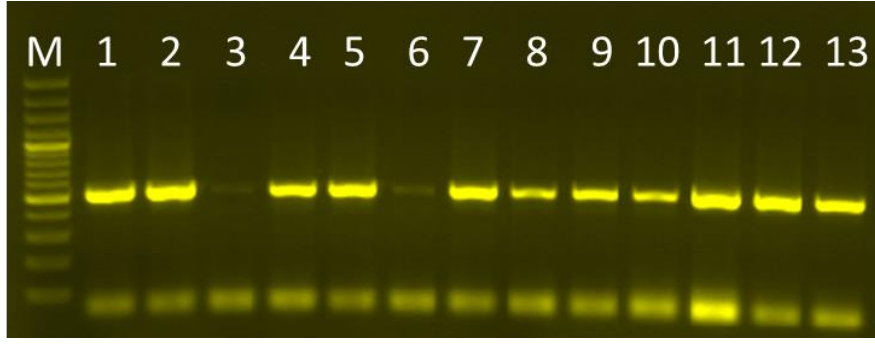
Şekil 4.4 *C. lupicaris* kanat morfolojisi



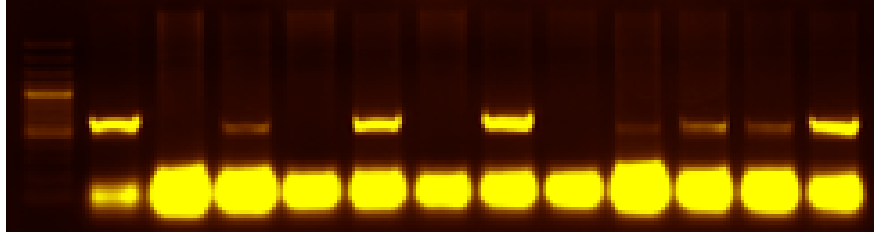
Şekil 4.5 *Culicoides* spp. belirlenen örneklere ait kanat morfolojisi.

4.2 Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

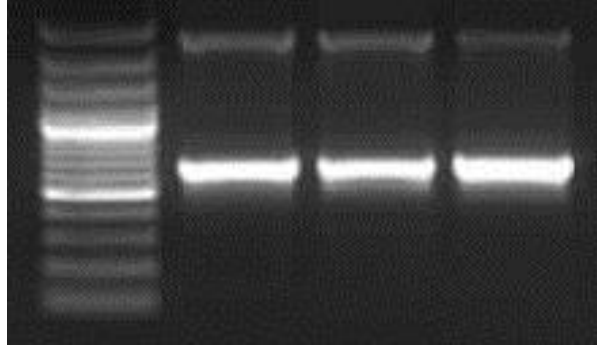
Morfolojik identifikasyonlarla belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatlarının ilgili primerlerle mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte (553 bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.6). Elde edilen bu ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş (Şekil 4.7) ve sonrasında sekans analizleri için kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin konfirmasyonu vektör spesifik primerlerle PCR analizleri (Şekil 4.8) sonucu yapılmıştır.



Şekil 4.6 *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



Şekil 4.7 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle mt-COI gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları.



Şekil 4.8 Bazı plazmidlerde hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconlar

Mt-COI gen bölgesine göre sekans analizlerine dahil edilen izolatlar, morfolojik identifikasyona göre belirlenen türler, DNA izolasyon kaynağı ve toplanma bölgesine göre Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatları

Genomik DNA İzolatı	Morfolojik İdentifikasyon	DNA izolasyon kaynağı	Toplama Bölgesi
ERU Cfag1	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Cfag2	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cfag3	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cfag4	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cfag5	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Konya
ERU Cfag6	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Konya
ERU Cfag7	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Konya
ERU Cfag8	<i>C. fagineus</i>	Ergin dişi	Konya
ERU Cflav1	<i>C. flavipulicaris</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Cflav2	<i>C. flavipulicaris</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Cflav3	<i>C. flavipulicaris</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Cflav4	<i>C. flavipulicaris</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Cflav5	<i>C. flavipulicaris</i>	Ergin dişi	Konya
ERU Clupi1	<i>C. lupicaris</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Clupi2	<i>C. lupicaris</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Clupi3	<i>C. lupicaris</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Clupi4	<i>C. lupicaris</i>	Ergin erkek	Düzce
ERU Cnews1	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Düzce
ERU Cnews2	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Bolu
ERU Cnews3	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Bolu
ERU Cnews4	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cnews5	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Cnews6	<i>C. newsteadi</i>	Ergin dişi	Bolu
ERU Cpuli1	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Düzce
ERU Cpuli2	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Cpuli3	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Bolu
ERU Cpuli4	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cpuli5	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Bolu
ERU Cpuli6	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cpuli7	<i>C. pulicaris</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cpunc1	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Cpunc2	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Cpunc3	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cpunc4	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Bartın
ERU Cpunc5	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Kasatamonu
ERU Cpunc6	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Düzce
ERU Cpunc7	<i>C. punctatus</i>	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Culi_sp1	<i>Culicoides</i> sp.	Ergin dişi	Düzce
ERU Culi_sp2	<i>Culicoides</i> sp.	Ergin dişi	Düzce
ERU Culi_sp3	<i>Culicoides</i> sp.	Ergin dişi	Düzce
ERU Culi_sp4	<i>Culicoides</i> sp.	Ergin dişi	Zonguldak
ERU Culi_sp5	<i>Culicoides</i> sp.	Ergin dişi	Zonguldak

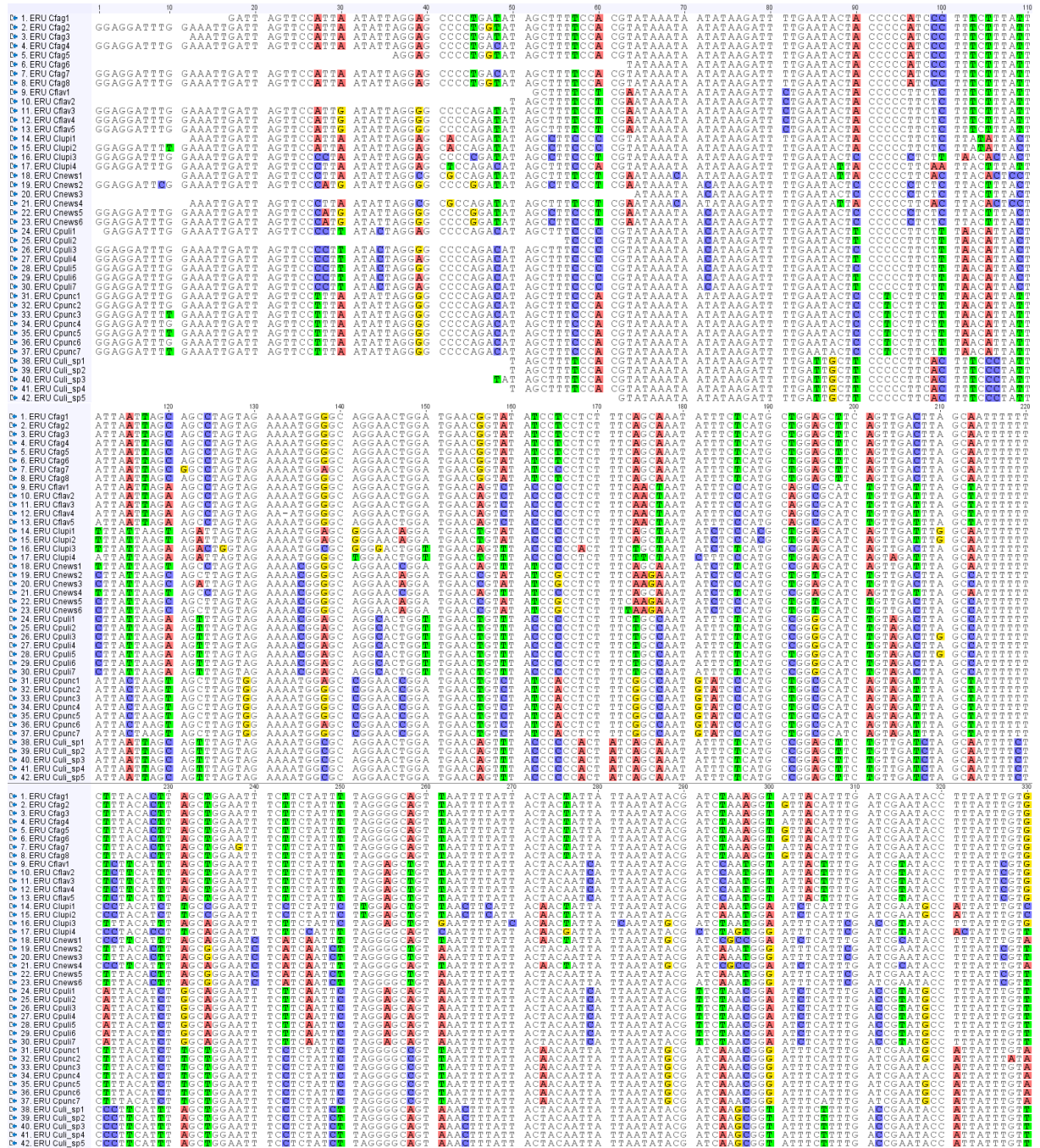
Elde edilen toplam 42 plazmid DNA izolatının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekans analizi sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür ve/veya haplotip bazında konfirmasyonları sağlanmış olup ilgili izolatlar KU754147-88 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Mt-COI barkodlaması yapılan izolatların ilgili gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları Tablo 4.2’de verilmiştir.

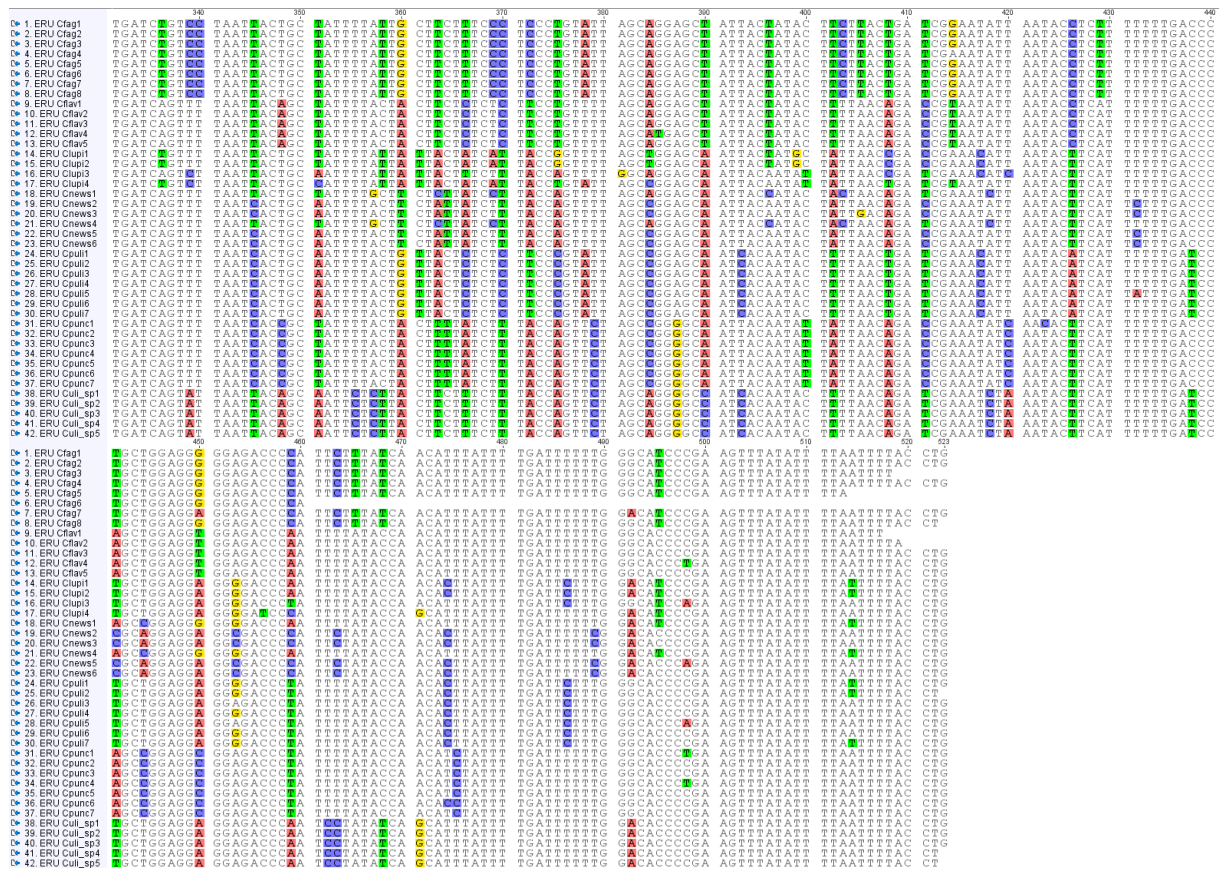
Tablo 4.2 Mt-COI sekansları sağlanan *Culicoides* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat (Plazmid)	Nükleotid kompozisyonu (%)				
	T	C	A	G	Toplam baz sayısı
ERU Cfag1	40,2	18,7	25,8	15,2	507,0
ERU Cfag2	40,0	18,2	25,6	16,3	523,0
ERU Cfag3	40,4	18,3	26,2	15,0	507,0
ERU Cfag4	39,8	18,4	26,2	15,7	523,0
ERU Cfag5	39,7	19,0	25,3	15,9	478,0
ERU Cfag6	38,9	19,1	26,1	15,8	398,0
ERU Cfag7	39,6	18,5	26,2	15,7	523,0
ERU Cfag8	40,0	18,2	25,7	16,1	522,0
ERU Cflav1	40,3	19,5	26,4	13,7	466,0
ERU Cflav2	40,4	19,4	26,6	13,6	470,0
ERU Cflav3	39,4	18,9	26,6	15,1	523,0
ERU Cflav4	39,8	18,8	26,4	14,9	522,0
ERU Cflav5	39,4	18,9	26,6	15,1	523,0
ERU Clupi1	37,3	19,9	28,1	14,6	512,0
ERU Clupi2	37,3	19,5	27,9	15,3	523,0
ERU Clupi3	36,9	19,7	27,3	16,1	523,0
ERU Clupi4	39,0	18,2	27,3	15,5	523,0
ERU Cnews1	36,5	20,7	27,7	15,2	513,0
ERU Cnews2	34,2	21,6	28,3	15,9	523,0
ERU Cnews3	35,0	21,3	29,1	14,6	460,0
ERU Cnews4	36,5	20,7	27,7	15,0	512,0
ERU Cnews5	34,4	21,2	28,5	15,9	523,0
ERU Cnews6	34,6	21,2	28,3	15,9	523,0
ERU Cpuli1	36,6	21,5	26,6	15,3	522,0
ERU Cpuli2	37,5	21,6	26,6	14,3	467,0
ERU Cpuli3	36,1	21,6	26,6	15,7	523,0
ERU Cpuli4	36,3	21,4	26,8	15,5	523,0
ERU Cpuli5	36,1	21,2	27,0	15,7	523,0
ERU Cpuli6	36,3	21,4	26,8	15,5	523,0
ERU Cpuli7	36,5	21,4	26,6	15,5	523,0
ERU Cpunc1	36,5	19,9	27,3	16,3	523,0
ERU Cpunc2	36,5	19,9	27,3	16,3	523,0
ERU Cpunc3	36,7	19,9	27,3	16,1	523,0
ERU Cpunc4	36,7	19,7	27,3	16,3	523,0
ERU Cpunc5	36,7	19,9	27,2	16,3	523,0
ERU Cpunc6	36,3	20,1	27,3	16,3	523,0
ERU Cpunc7	36,7	19,9	27,2	16,3	523,0
ERU Culi_sp1	37,6	20,7	27,4	14,3	474,0
ERU Culi_sp2	37,6	20,7	27,4	14,3	474,0
ERU Culi_sp3	37,6	20,6	27,5	14,3	476,0
ERU Culi_sp4	37,6	20,7	27,5	14,2	473,0
ERU Culi_sp5	37,5	20,4	27,8	14,3	461,0

Çalışmada *Culicoides pulicaris* grupta belirlenen türlere ait mt-COI gen bölgesinin 398-523 bp kısmını içeren toplam 42 sekans başarıyla elde edilmiştir. Sekanslar arasında 344 (%65,8) identik bölge belirlenirken 22 farklı haplotipi ortaya koyan 151 polimorfik bölge saptanmıştır. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Culicoides* izolatlarının

nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Şekil 4.9’da görüldüğü izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan izolatlar arasında ortalama pairwise identiklik oranı %85,8 belirlenmiş olup ikili hizlama analiz sonucu belirlenen farklılıklar ayrıca Tablo 4.3’de verilmiştir.





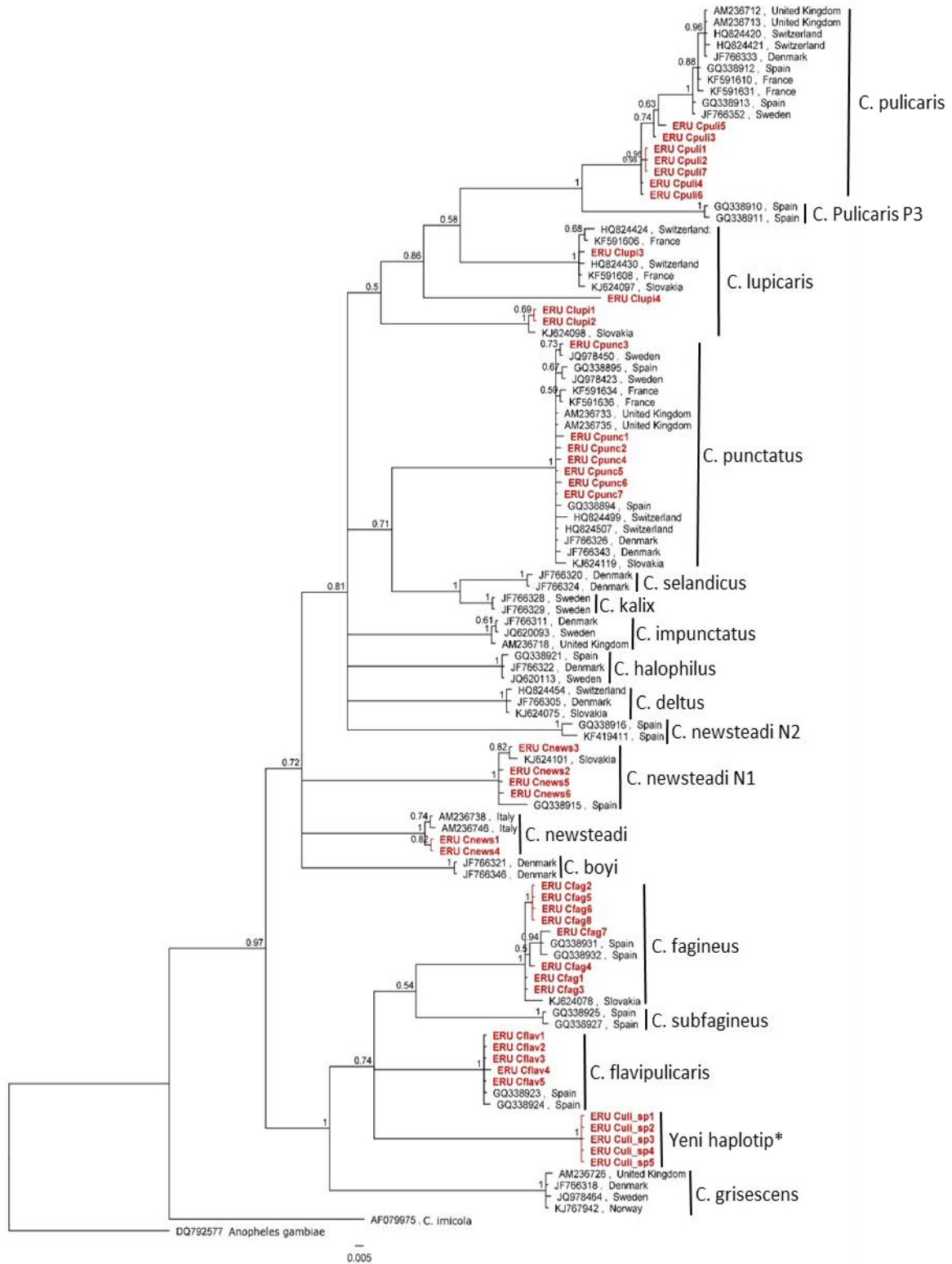
Tablo 4.3 *Culicoides* izolatlarının mt-COI sekanslarının ikili hizalama farklılıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
1. ERU Cflag1		0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.020	0.020	0.020	0.021	0.020	0.030	0.030	0.029	0.026	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.028	0.032	0.032	0.031	0.031	0.032	0.031	0.032	0.032	0.031	0.030	0.031	0.031	0.032	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028
2. ERU Cflag2	0.002		0.002	0.003	0.000	0.000	0.006	0.000	0.021	0.021	0.021	0.022	0.021	0.031	0.031	0.030	0.027	0.028	0.027	0.027	0.027	0.028	0.028	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.033	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.031	0.029	0.029	0.029	0.029	
3. ERU Cflag3	0.000	0.002		0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.020	0.020	0.020	0.021	0.020	0.030	0.030	0.029	0.026	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.028	0.032	0.032	0.031	0.031	0.032	0.031	0.032	0.032	0.032	0.031	0.030	0.031	0.031	0.032	0.031	0.028	0.028	0.028	0.028
4. ERU Cflag4	0.002	0.004	0.002		0.003	0.004	0.006	0.003	0.020	0.020	0.020	0.021	0.020	0.030	0.030	0.029	0.026	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.030	0.030	0.030	0.030	0.031	0.030	0.027	0.027	0.027	0.027	
5. ERU Cflag5	0.002	0.000	0.002	0.004		0.000	0.006	0.000	0.021	0.021	0.021	0.022	0.021	0.031	0.031	0.030	0.027	0.028	0.028	0.027	0.028	0.028	0.028	0.032	0.032	0.032	0.032	0.033	0.032	0.032	0.033	0.032	0.031	0.032	0.032	0.033	0.032	0.029	0.029	0.029	0.029	
6. ERU Cflag6	0.003	0.000	0.003	0.005	0.000		0.006	0.000	0.023	0.023	0.023	0.024	0.023	0.034	0.034	0.035	0.030	0.031	0.031	0.030	0.031	0.031	0.031	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.036	0.036	0.036	0.036	0.037	0.036	0.032	0.032	0.032	0.032	
7. ERU Cflag7	0.014	0.016	0.014	0.016	0.016	0.016		0.006	0.021	0.021	0.021	0.022	0.021	0.029	0.029	0.030	0.026	0.028	0.027	0.027	0.028	0.028	0.028	0.032	0.032	0.031	0.032	0.032	0.032	0.032	0.033	0.033	0.032	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.027	0.027	0.027	0.027
8. ERU Cflag8	0.002	0.000	0.002	0.004	0.000	0.000	0.016		0.021	0.021	0.021	0.022	0.021	0.031	0.031	0.030	0.027	0.028	0.027	0.027	0.028	0.028	0.028	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.033	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.031	0.029	0.029	0.029	0.029	
9. ERU Cflav1	0.138	0.142	0.138	0.138	0.143	0.152	0.148	0.142		0.000	0.000	0.003	0.000	0.028	0.028	0.029	0.028	0.026	0.025	0.026	0.026	0.025	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.028	0.027	0.028	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026
10. ERU Cflav2	0.138	0.142	0.138	0.138	0.143	0.152	0.148	0.142	0.000		0.000	0.003	0.000	0.028	0.028	0.029	0.028	0.026	0.025	0.026	0.026	0.025	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.028	0.027	0.028	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026
11. ERU Cflav3	0.138	0.142	0.138	0.138	0.143	0.152	0.148	0.142	0.000	0.000		0.003	0.000	0.028	0.028	0.029	0.028	0.026	0.025	0.026	0.026	0.025	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.028	0.027	0.028	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026
12. ERU Cflav4	0.145	0.148	0.145	0.145	0.150	0.156	0.155	0.148	0.004	0.004		0.003	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.027	0.025	0.026	0.027	0.025	0.026	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.027	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.027	0.026	0.027	0.027	0.027	0.027	
13. ERU Cflav5	0.138	0.142	0.138	0.138	0.143	0.152	0.148	0.142	0.000	0.000	0.004		0.028	0.028	0.029	0.028	0.026	0.025	0.026	0.026	0.025	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.027	0.028	0.027	0.028	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026
14. ERU Clupi1	0.234	0.238	0.234	0.230	0.238	0.253	0.226	0.238	0.208	0.208	0.208	0.216	0.208		0.000	0.024	0.023	0.025	0.028	0.028	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.027	0.026	0.027	0.034	0.034	0.034	0.034		
15. ERU Clupi2	0.234	0.238	0.234	0.230	0.238	0.253	0.226	0.238	0.208	0.208	0.208	0.216	0.208	0.000		0.024	0.023	0.025	0.028	0.028	0.025	0.028	0.028	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.027	0.026	0.027	0.034	0.034	0.034	0.034		
16. ERU Clupi3	0.221	0.225	0.221	0.217	0.227	0.246	0.225	0.225	0.216	0.216	0.216	0.220	0.216	0.165	0.165		0.024	0.026	0.029	0.029	0.026	0.029	0.030	0.024	0.024	0.024	0.023	0.024	0.023	0.024	0.031	0.030	0.029	0.029	0.030	0.030	0.030	0.031	0.031	0.031	0.031	
17. ERU Clupi4	0.193	0.197	0.193	0.193	0.199	0.213	0.193	0.197	0.208	0.208	0.208	0.215	0.208	0.162	0.162	0.172		0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.027	0.027	0.028	0.027	0.028	0.027	0.027	0.028	0.027	0.026	0.027	0.027	0.028	0.027	0.031	0.031	0.031	0.031	
18. ERU Cnews1	0.205	0.209	0.205	0.202	0.208	0.228	0.213	0.209	0.195	0.195	0.195	0.203	0.195	0.179	0.179	0.197	0.205		0.024	0.025	0.000	0.024	0.025	0.030	0.030	0.032	0.030	0.033	0.030	0.030	0.029	0.028	0.028	0.028	0.029	0.028	0.029	0.029	0.029	0.029		
19. ERU Cnews2	0.211	0.215	0.211	0.208	0.217	0.230	0.215	0.215	0.186	0.186	0.186	0.194	0.186	0.209	0.209	0.223	0.212	0.182		0.004	0.024	0.002	0.002	0.028	0.028	0.028	0.027	0.027	0.027	0.028	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.026	0.032	0.032	0.032	0.032		
20. ERU Cnews3	0.209	0.213	0.209	0.205	0.215	0.227	0.213	0.213	0.194	0.194	0.194	0.202	0.194	0.204	0.204	0.218	0.206	0.186	0.007		0.025	0.004	0.004	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.032	0.032	0.032	0.032		
21. ERU Cnews4	0.205	0.209	0.205	0.202	0.208	0.228	0.213	0.209	0.195	0.195	0.195	0.203	0.195	0.179	0.179	0.197	0.205	0.000	0.182	0.186		0.024	0.025	0.030	0.030	0.032	0.030	0.033	0.030	0.030	0.029	0.028	0.028	0.028	0.029	0.028	0.029	0.029	0.029	0.029		
22. ERU Cnews5	0.215	0.219	0.215	0.211	0.221	0.230	0.219	0.219	0.190	0.190	0.190	0.194	0.190	0.212	0.212	0.220	0.215	0.185	0.002	0.009	0.185		0.003	0.028	0.028	0.028	0.028	0.027	0.028	0.028	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.032	0.032	0.032	0.032		
23. ERU Cnews6	0.215	0.219	0.215	0.211	0.221	0.234	0.219	0.219	0.190	0.190	0.190	0.197	0.190	0.213	0.213	0.228	0.216	0.185	0.002	0.009	0.185	0.004		0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.032	0.032	0.032	0.032		
24. ERU Cpuli1	0.248	0.252	0.248	0.244	0.251	0.269	0.248	0.252	0.212	0.212	0.212	0.220	0.212	0.195	0.195	0.163	0.198	0.237	0.204	0.206	0.237	0.207	0.208		0.000	0.004	0.002	0.006	0.002	0.000	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.028	0.030	0.033	0.033	0.033		
25. ERU Cpuli2	0.248	0.252	0.248	0.244	0.251	0.269	0.248	0.252	0.212	0.212	0.212	0.220	0.212	0.195	0.195	0.163	0.198	0.237	0.204	0.206	0.237	0.207	0.208	0.000		0.004	0.002	0.006	0.002	0.000	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.028	0.030	0.033	0.033	0.033		
26. ERU Cpuli3	0.244	0.248	0.244	0.240	0.251	0.269	0.244	0.248	0.209	0.209	0.209	0.217	0.209	0.198	0.198	0.164	0.202	0.249	0.201	0.202	0.249	0.204	0.205	0.009	0.009		0.004	0.004	0.004	0.004	0.029	0.029	0.029	0.030	0.029	0.028	0.029	0.033	0.033	0.033		
27. ERU Cpuli4	0.244	0.248	0.244	0.240	0.251	0.269	0.244	0.248	0.209	0.209	0.209	0.217	0.209	0.198	0.198	0.160	0.194	0.240	0.201	0.202	0.240	0.204	0.205	0.002	0.002	0.007		0.005	0.000	0.002	0.029	0.030	0.029	0.030	0.029	0.028	0.029	0.033	0.033	0.033		
28. ERU Cpuli5	0.247	0.252	0.247	0.243	0.255	0.269	0.247	0.252	0.216	0.216	0.216	0.220	0.216	0.201	0.201	0.167	0.205	0.261	0.200	0.201	0.261	0.196	0.204	0.016	0.016	0.007	0.013		0.005	0.006	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.028	0.029	0.034	0.034			
29. ERU Cpuli6	0.244	0.248	0.244	0.240	0.251	0.269	0.244	0.248	0.209	0.209	0.209	0.217	0.209	0.198	0.198	0.160	0.194	0.240	0.201	0.202																						

4.3 Mt-COI Gen Bölgesinin Filogenetik Analiz Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan türlere ait izolatların Dünyada çeşitli bölgelerden izole edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir. Çalışmada karakterize edilen tür ve/veya haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $19,4 \pm 1,8$ saptanmıştır. Çalışmada morfolojik analizlerle *C. punctatus* olarak tanımlanan ve moleküler karakterizasyonla ERU Cpunc1-7 olarak isimlendirilen izolatlar, filogenetik ağaç (Şekil 4.10) üzerinde görüleceği üzere farklı ülkelerden rapor edilmiş *C. punctatus* izolatlarıyla birlikte cluster oluşturmuştur. ERU Cpunc1-7 izolatlarının kendi aralarında $0,4 \pm 0,2$ farklılık gösterdiği ve en yüksek identikliği $99,8$ ile İngiltere ve İsviçre izolatlarıyla sergilediği saptanmıştır. ERU Cpuli1-7 izolatları Danimarka, İngiltere, İspanya, Fransa, İsveç ve İsviçre'den bildirilmiş *C. pulicaris* izolatlarıyla birlikte tür bazlı olarak cluster oluşturmuş olup kendi aralarında $0,5 \pm 0,2$ farklılık göstermiştir. İlgili izolatlar en yüksek identikliği ortalama $97,7$ ile İsveç'ten rapor edilmiş Cul276 izolatıyla (GenBank aksesyon: JF766352) göstermiştir. Çalışmada Türkiye için ilk kez *C. lupicaris*'in varlığı moleküler olarak belirlenmiştir. ERU Clupi1-ERU Clupi4 izolatları üç ayrı clusterda yerleşim göstermekle birlikte (Şekil 4.10) aralarındaki genetik heterojenite $14,5 \pm 1,8$ belirlenmiştir. ERU Clupi1-ERU Clupi2 izolatları en yüksek identikliği $99,6$ ile Slovakya'dan bildirilmiş SKBS09 izolatıyla (GenBank aksesyon: KJ624098) göstermiştir. ERU Clupi3 izolatı İsviçre, Fransa ve Slovakya'dan rapor edilen izolatlarla birlikte cluster oluşturmuş ve en yüksek identikliği $99,8$ ile Fransa COR_LUP_04 izolatıyla (GenBank aksesyon: KF591608) vermiştir. ERU Clupi4 izolatı ise diğer *C. lupicaris* izolatlarından daha uzak belirlenmiş ve tek olarak ayrı bir clusterda yerleşim göstermiştir. *C. newsteadi* ERU Cnews1- ERU Cnews6 izolatlarının iki farklı haplogrup içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. ERU Cnews2,3,5,6 izolatlarının İspanya ve Slovakya izolatlarıyla birlikte *C. newsteadi* N1 genotipi içerisinde yer aldığı, ERU Cnews1 ve ERU Cnews4 izolatlarının ise İtalya izolatları ile birlikte *C. newsteadi* genotipinde yerleşim gösterdiği tespit (Şekil 4.10) edilmiştir. Çalışmada iki ayrı genotip içerisinde belirlenen izolatlar arasındaki genetik heterojenite $18,4 \pm 2,5$ saptanmıştır. ERU Cfag1- ERU Cfag8 *C. fagineus* izolatları arasındaki genetik farklılık düşük ($0,6 \pm 0,2$) belirlenmiş olup ERU Cfag2,5,6,8 izolatları identik bulunmuş ve grup içerisinde cluster oluşturmuştur (Şekil 4.10). ERU Cfag1,3,4 izolatları birbirine daha yakın bulunmuş ve Slovakya SKBS10 izolatıyla (GenBank aksesyon: KJ624078) $99,6$ identik belirlenmiştir.

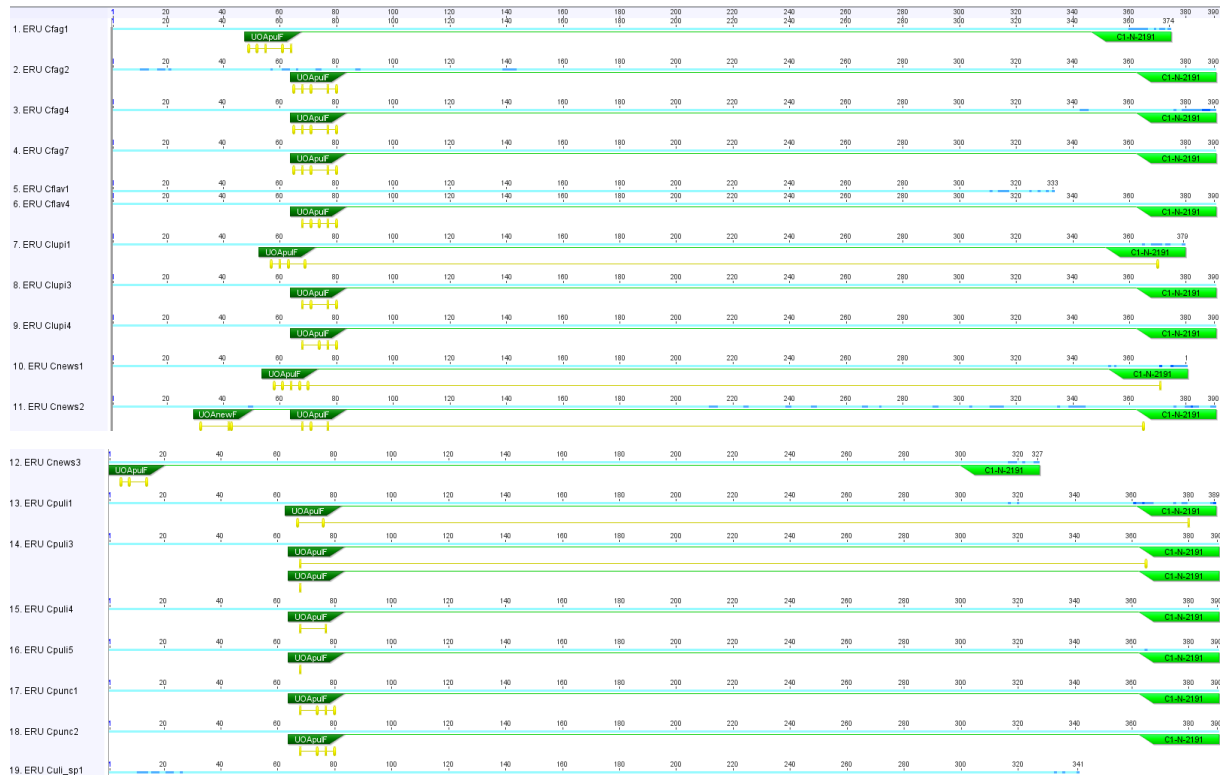
ERU Cfag7 izolatu ise İspanya izolatlarıyla birlikte grup içinde kümelenme göstermiş (Şekil 4.10) ve ilgili izolatlara %99,4 identik bulunmuşlardır. *C. flavipulicaris* ERU Cflav1- ERU Cflav5 izolatları arasında %0,1±0,1 genetik farklılık saptanmış ve ilgili izolatlar İspanya izolatlarına %99,8 identiklik göstererek birlikte cluster oluşturmuştur (Şekil 4.10). Çalışmada yeni bir haplotip olarak belirlenen ERU Culi_sp1- ERU Culi_sp5 izolatları birbirlerine %100 identik bulunmuş ve ayrı bir cluster içerisinde yer almıştır. İlgili izolatlar *Culicoides* soy altı içerisinde *C. fagineus*, *C. subfagineus* ve *C. flavipulicaris* nesillerine ait izolatlarla üst gruplanma göstermiş (Şekil 4.10) ve ilgili türlere sırasıyla %21,8±3,0, %16,4±2,7 ve %20,5±3,0 oranlarında genetik farklı bulunmuşlardır.



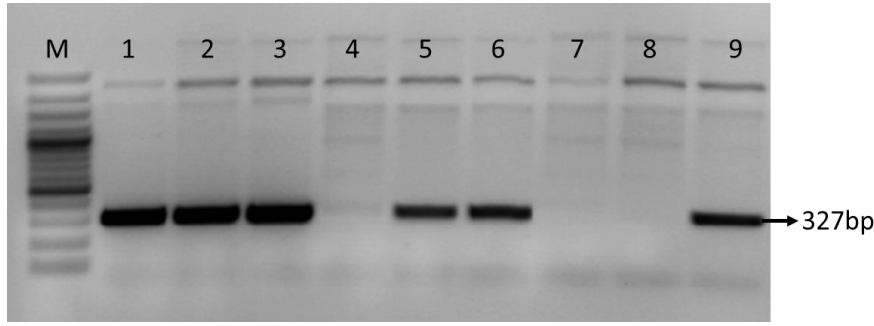
Şekil 4.10 *Culicoides* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri cluster kırmızı renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.4 Tür Spesifik Primerlerin Analiz Sonuçları

Nolan ve ark. (160) tarafından bildirilen tür spesifik primer çiftlerinin çalışmada saptanan izolatların mt-COI nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinlikleri değerlendirilmiştir (Şekillerde maksimum 5 nükleotid uyumsuzluğu gösterilmiş, 5'in üzeri uyumsuzluklarda bağlanma verilmemiştir). Şekil 4.11'de görüleceği üzere *C. pulicaris* forward primerinin ERU-Cpulı izolatlarıyla bir veya iki bazda uyumsuzluk gösterdiği belirlenmiştir. Diğer türlere ait izolatlarda ise 3 ve üzeri nükleotid farklılığı görülmüştür. Söz konusu bazı izolatlara ait genomik DNA'ların ilgili primer çiftleri ile PCR analizleri sonucu belirlenen ampikonların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 4.12'de verilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü üzere ilgili primer çiftleri 4 nükleotid farklılığı olmasına karşın hedef dışı türler ile de uygun annealing ısısında amplifikasyon göstermiştir.

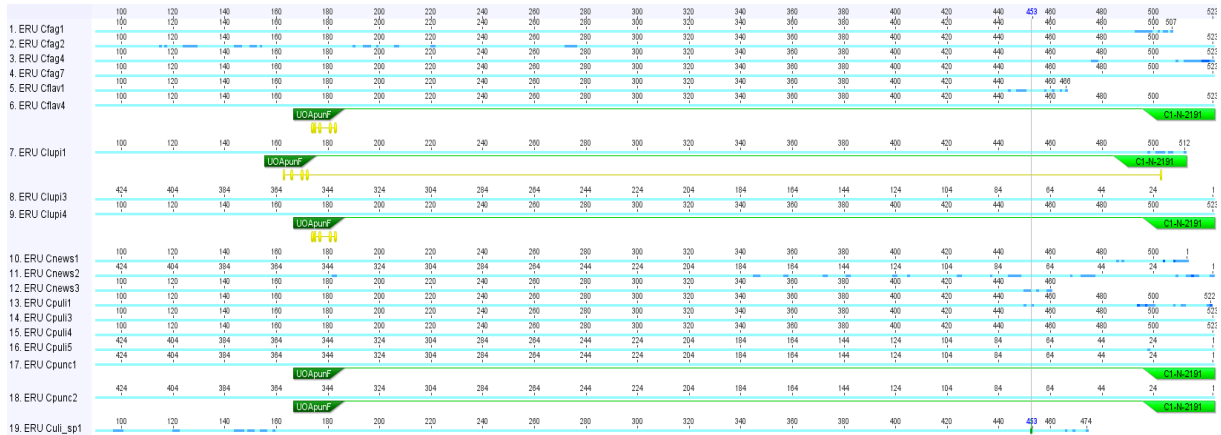


Şekil 4.11 *C. pulicaris* UOApulF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlarla ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

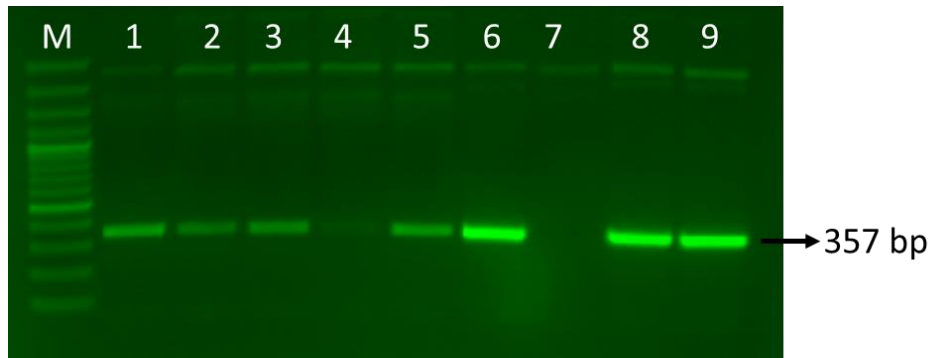


Şekil 4.12 *C. pulicaris* UOApulF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1-3: ERU Cpuli4-6; 4: ERU Clupi3; 5: ERU Clupi4; 6-9: ERU Cpun1,2,4,6

C. punctatus spesifik forward primerin ERU-Cpun izolatlarıyla tam uyuşma gösterdiği belirlenmiş, diğer türlere ait izolatlarla ise 4 veya üstü bazda uyumsuzluk vermiştir (Şekil 4.13). Çalışmada saptanan ve Şekil 4.13’de gösterilmiş olan izolatlara ait genomik DNA’ların ilgili primer çiftleri ile PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 4.14’de verilmiştir. İlgili primer çiftleri farklı 4 nükleotid farklılığı olmasına karşın hedef dışı türler ile de uygun annealing ısısında amplifikasyon göstermiştir.

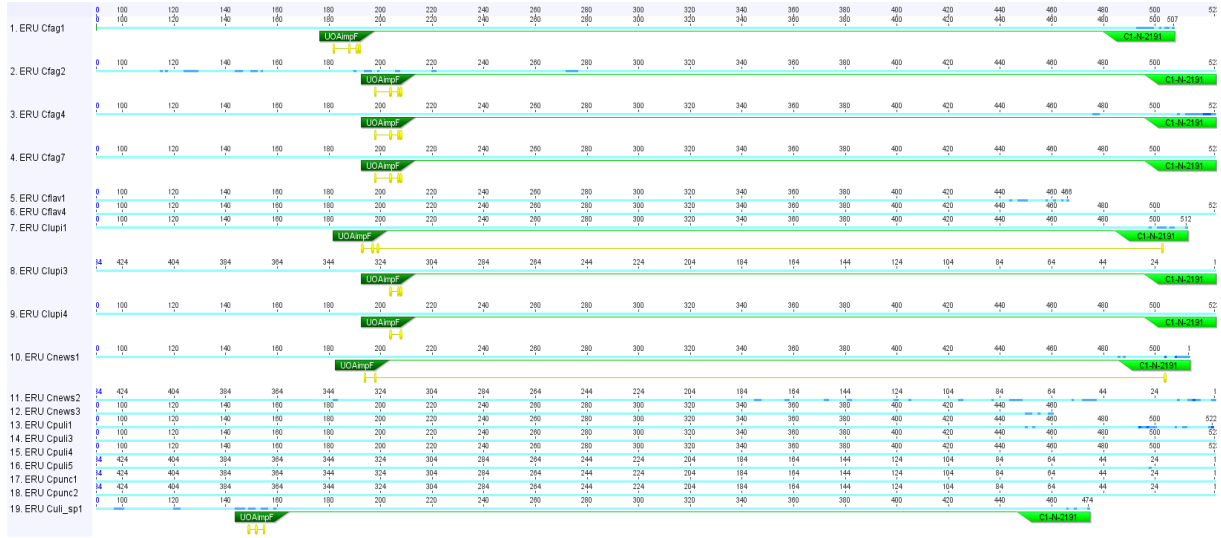


Şekil 4.13 *C. punctatus* UOApunF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği



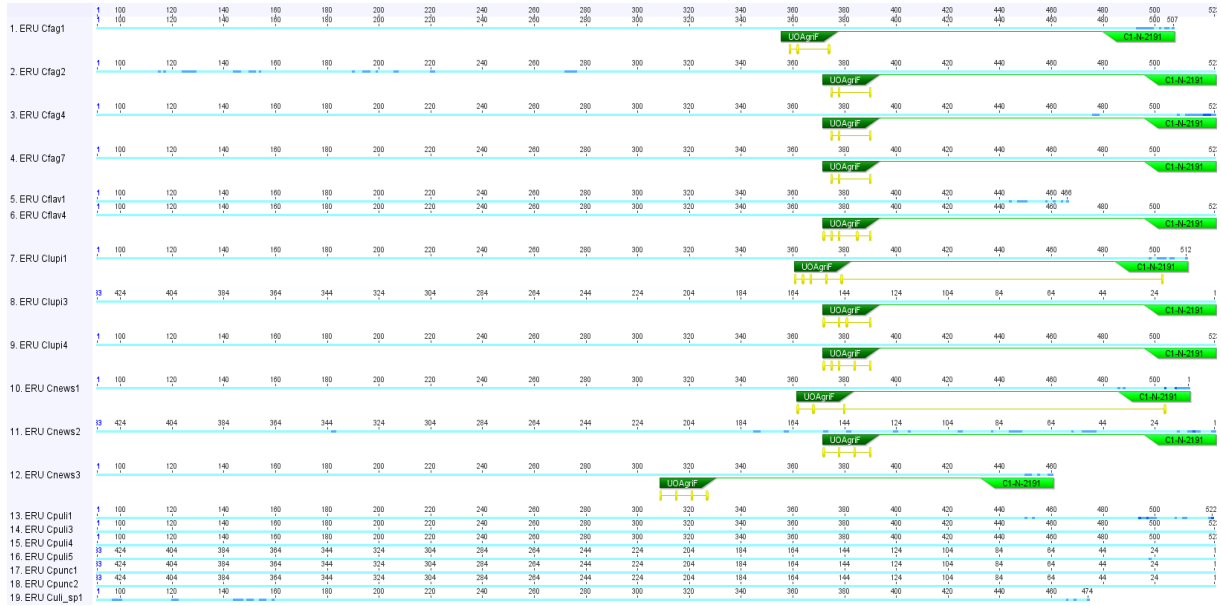
Şekil 4.14 *C. punctatus* UOApunF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1-3: ERU Cpuli4-6; 4,5: ERU Clupi3,4; 6,8,9: ERU Cpun1,4,6; 7: ERU Culi_sp1

C. impunctatus spesifik forward primerin çalışmada belirlenen tür veya haplotiplere ait izolatlarla 2 veya üstü bazda uyumsuzluk göstermiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 *C. impunctatus* UOAimpF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlarla ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

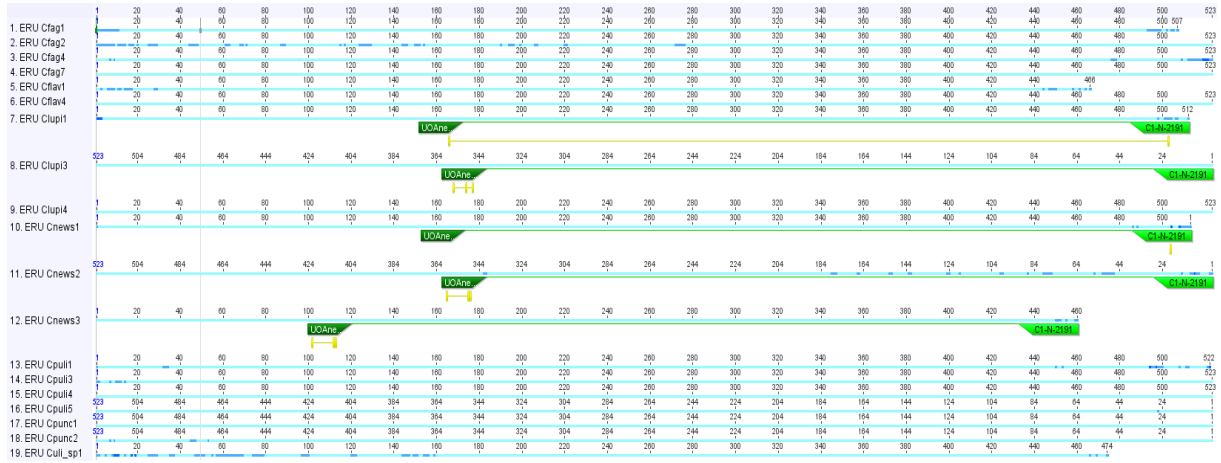
C. grisescens spesifik forward primerin çalışmada belirlenen tür veya haplotiplere ait izolatlarıyla 3 veya üstü bazda uyumsuzluk göstermiştir (Şekil 4.16).



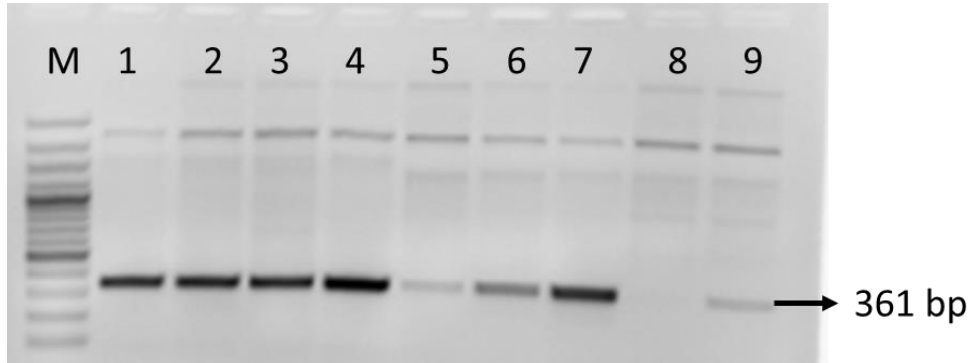
Şekil 4.16 *C. grisescens* UOAgriF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlarla ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

C. newsteadi spesifik forward primerin ERU Cnews1 izolatıyla tam uygunluk göstermesine karşın genetik olarak *C. newsteadi* N1 genotipinde belirlenen izolatlarla ait nükleotid sekanslarıyla 3 nükleotid uyumsuzluğu sergilemiştir. Yine ilgili forward primerin *C. lupicaris*

ERU Clup1 ve 3 izolatlarına ait nükleotid sekanslarıyla sırasıyla 1 ve 3 nükleotid farklılığı gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.17). İlgili izolatlara ait genomik DNA'ların *C. newsteadi* spesifik primer çiftleri ile PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere ilgili primer çiftleri nükleotid farklılıkları olmasına karşın hedef dışı türler ile de uygun annealing ısısında amplifikasyon göstermiştir.



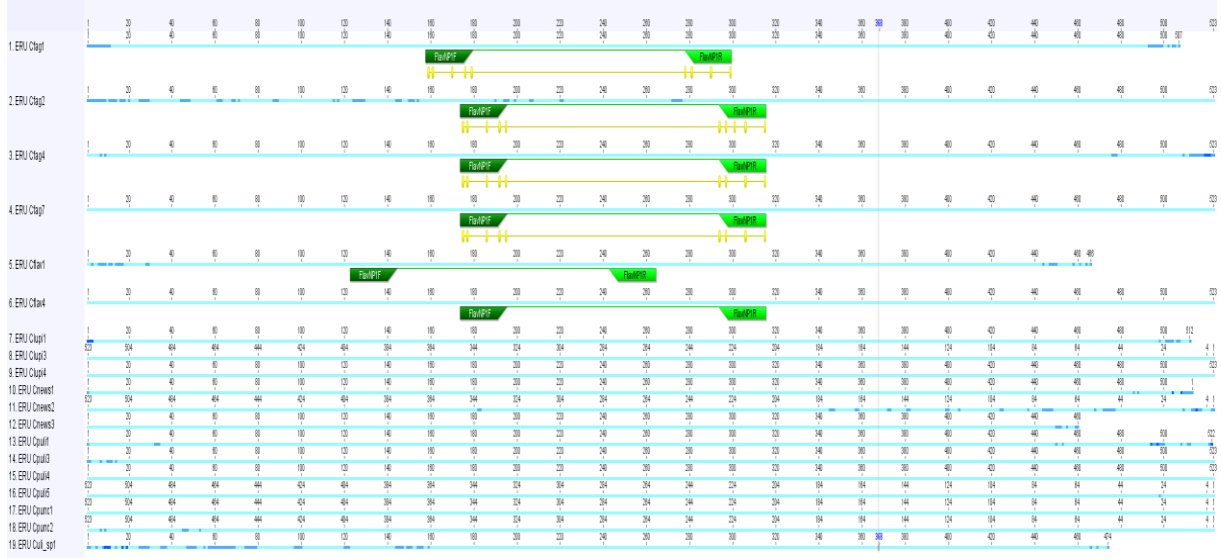
Şekil 4.17 *C. newsteadi* UOAnewF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği



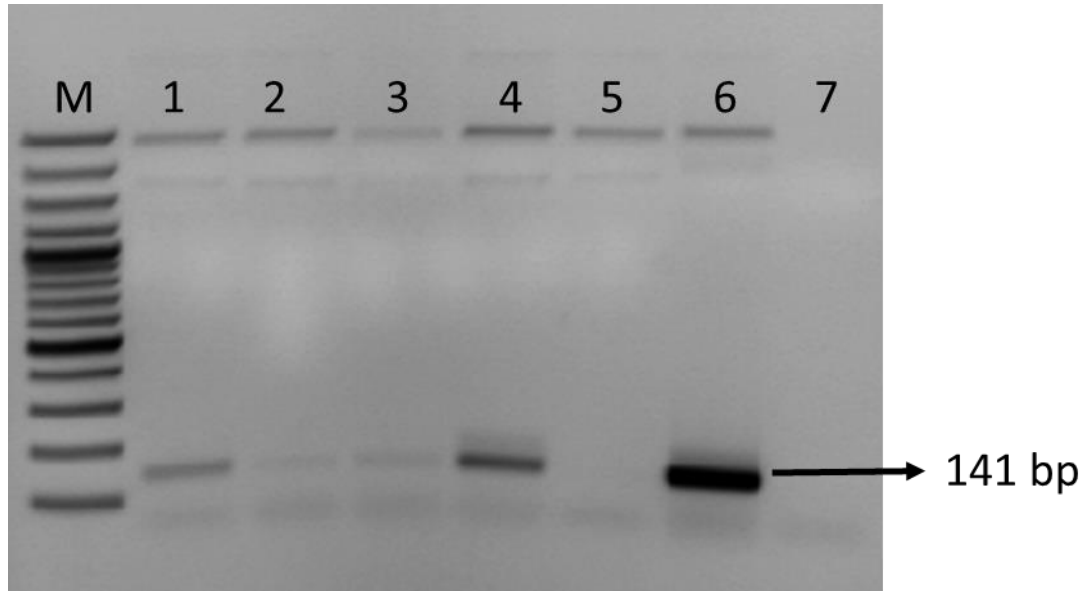
Şekil 4.18 *C. newsteadi* UOAnewF (tür spesifik) ve C1-N-2191 (genel) primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1,2: ERU Cnews2,3; 3,4: ERU Cnews1; 5,6: ERU Clup1 3; 7: ERU Clup1; 8,9: ERU Cpun1,6

Pages ve ark.'nın (161) *Culicoides* alt soyundaki tür ve bazı genotiplerin identifikasyonu amacıyla dizayn ettikleri spesifik primer çiftlerinin çalışmada saptanan izolatların mt-COI nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinlikleri ayrıca analiz edilmiştir (Şekillerde maksimum 5 nükleotid uyumsuzluğu gösterilmiş, 5'in üzeri uyumsuzluklarda bağlanma verilmemiştir). Şekil 4.19'da görüleceği üzere *C. flavipulicaris* forward ve reverse primerlerinin ERU-Cflav izolatlarıyla tam uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. İlgili forward ve reverse primerler ERU-Cflag izolatlarıyla sırasıyla 5 ve 4 nükleotid uyumsuzluğu göstermiş, diğer tür ve haplotipler

için 5'in üzerinde uyumsuzluk saptanmıştır. Çalışmada saptanan ve Şekil 4.19'da gösterilmiş olan bazı izolatlara ait genomik DNA'ların ilgili primer çiftleri ile PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.20'de verilmiştir. İlgili primer çiftlerinin hedef tür ile etkin amplifikasyon göstermesine karşın diğer bazı türler için de düşük yoğunlukta ampliconların şekillendiği belirlenmiştir.



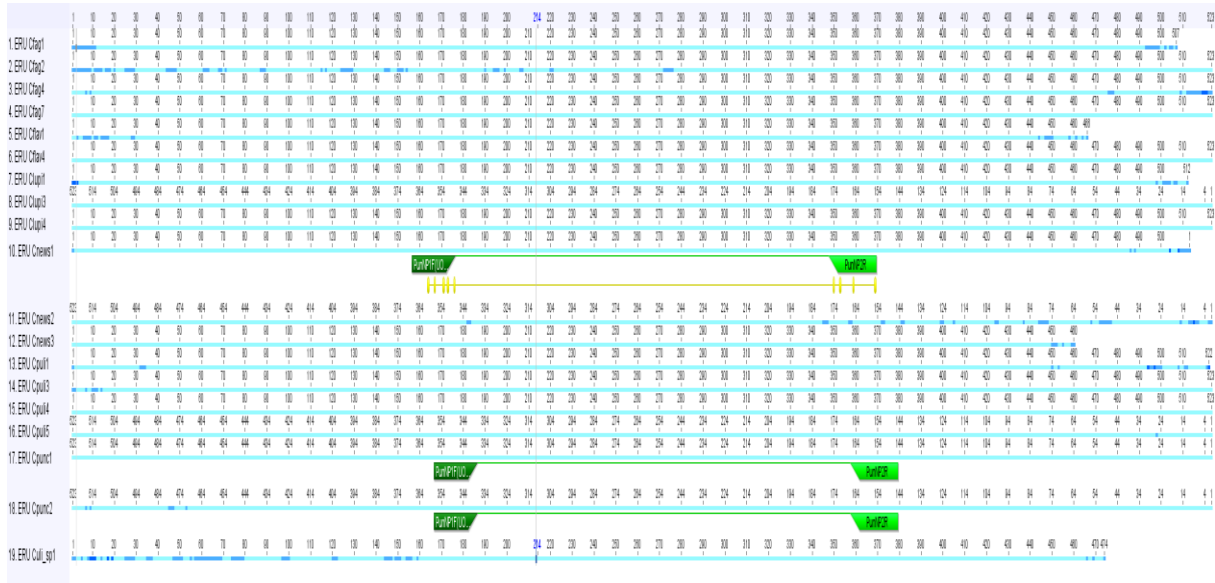
Şekil 4.19 *C. flavipulicaris* forward ve reverse primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği



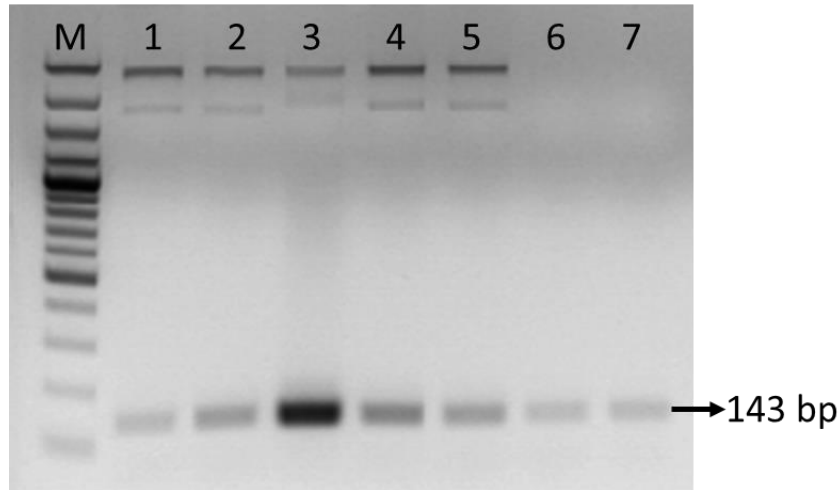
Şekil 4.20 *C. flavipulicaris* FlavNP1F ve FlavNP1R primerleri ile PCR analiz sonuçları 1: ERU Cplu6; 2: ERU Clup3; 3: ERU-Cpun2; 4: ERU Cnew2; 5: ERU Cfag2; 6: ERU Cflav4; 7: ERU Culi_sp1

C. punctatus forward ve reverse primerlerinin ERU-Cpunc izolatlarıyla tam uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. İlgili forward ve reverse primerler ERU-Cnews1 izolatıyla sırasıyla 5

ve 4 nükleotid uyumsuzluğu göstermiş, diğer tür ve haplotipler için 5'in üzerinde uyumsuzluk saptanmıştır (Şekil 4.21). Çalışmada saptanan ve Şekil 4.21'de gösterilmiş olan bazı izolatlara ait genomik DNA'ların ilgili primer çiftleri ile PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconların agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.22'de verilmiştir. İlgili primer çiftlerinin hedef tür ile etkin amplifikasyon göstermesine karşın diğer bazı türler için de düşük yoğunlukta ampliconların şekillendiği belirlenmiştir.



Şekil 4.21 *C. punctatus* forward ve reverse primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

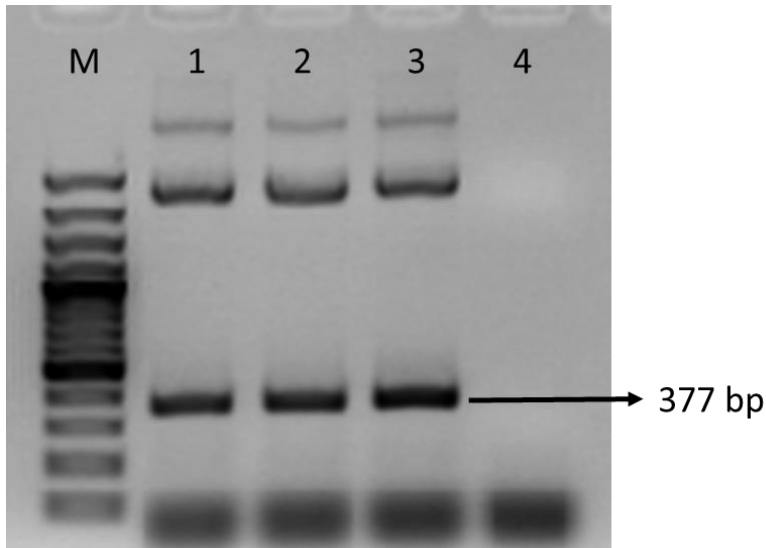


Şekil 4.22 *C. punctatus* PunNP1F ve PunNP2R primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1: ERU Ctag5; 2: ERU Ctag4; 3: ERU Ctag4; 4: ERU Ctag8; 5: ERU Ctag8; 6: ERU Ctag1; 7: ERU Ctag1_sp1

Multiplex PCR analizlerinde kullanılan *Fagineus* kompleks türleri için dizayn edilmiş F2R337 (*C. fagineus* s.s. spesifik), F3Full (*C. subfagineus* spesifik) ile CIJ1718M (genel forward) ve C1N2191M (genel reverse) primerlerinin çalışmada genotip düzeyinde örneklenmiş izolatlara ait nükleotid sekansları ile uyumluluk analiz sonuçları Şekil 4.23’de gösterilmiştir. İlgili primer çiftleri ile multiplex PCR analizleri sonucu *C. fagineus* izolatlarıyla etkin amplifikasyon belirlenmiş hedef dışı bağlanmalar tespit edilmemiştir.



Şekil 4.23 *C. fagineus* kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlarla ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

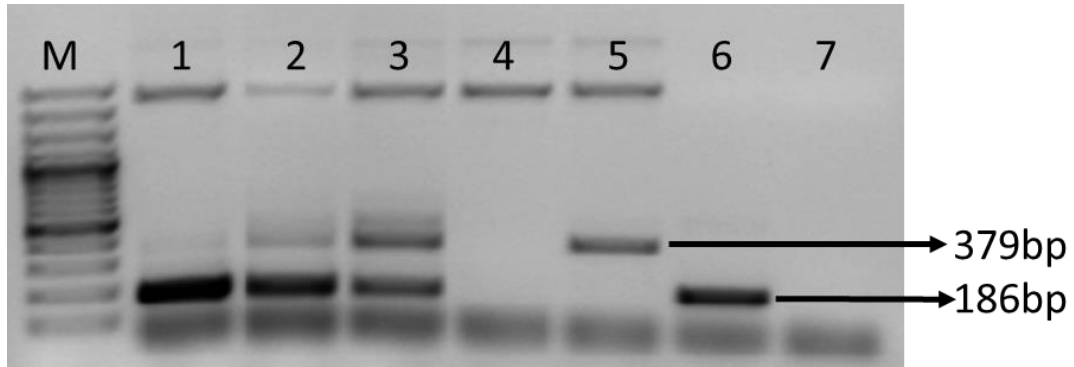


Şekil 4.24 *C. fagineus* kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1-3: ERU Cfg2,7,8; 4: ERU Culi_sp1

Multiplex PCR analizlerinde kullanılan *Pulicaris* kompleks türleri için dizayn edilmiş P1F174 (*C. pulicaris* P1 spesifik), P1R337 (*C. pulicaris* P1 spesifik), PDNP1R (*C. lupicaris* spesifik) ile CIJ1718M (genel forward) primerlerinin çalışmada genotip düzeyinde örneklenmiş izolatlara ait nükleotid sekansları ile uyumluluk analiz sonuçları Şekil 4.25’de gösterilmiştir. İlgili primer çiftleri ile multiplex PCR analizleri sonucu *C. pulicaris* ve bazı *C. lupicaris* izolatlarında her iki tür için de amplifikasyonun şekillendiği dikkati çekmiş genetik olarak farklı belirlenen bazı *C. lupicaris* izolatlarında ise amplifikasyon şekillenmemiştir.



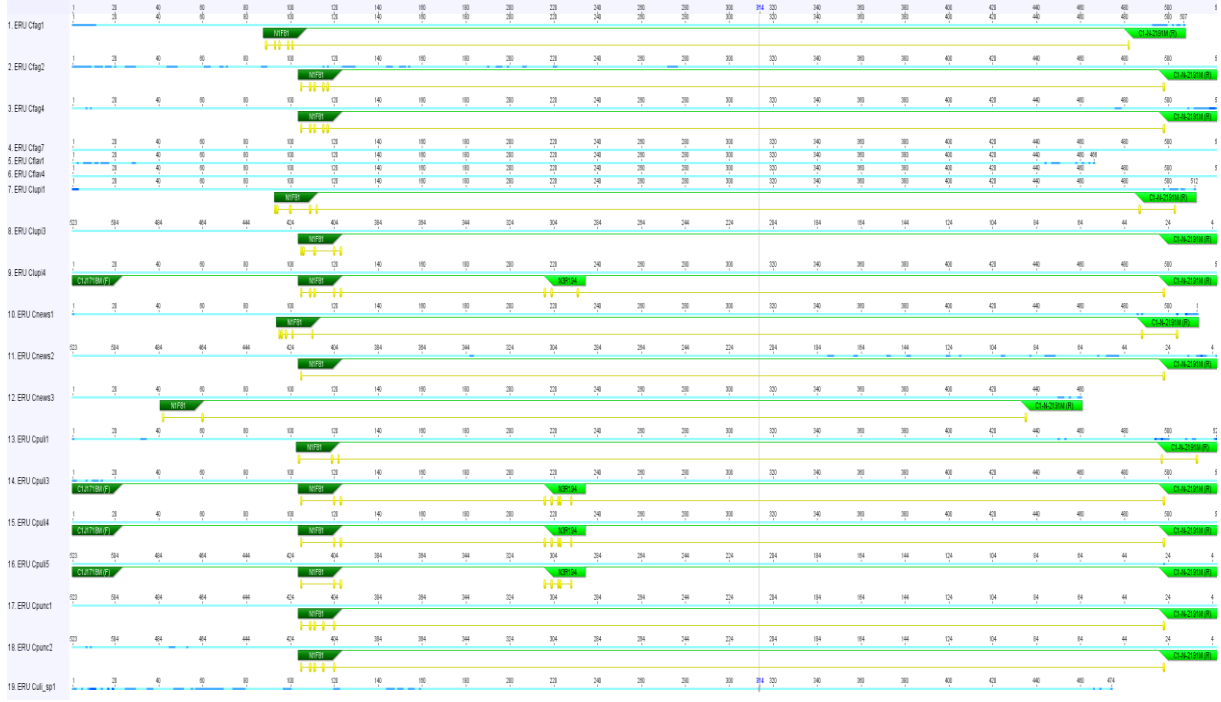
Şekil 4.25 *C. pulicaris* kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği



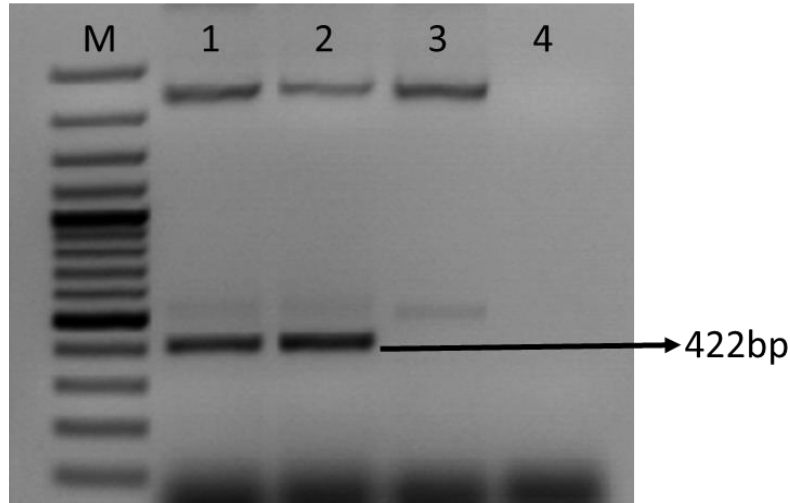
Şekil 4.26 *C. pulicaris* kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1-3: ERU Cpul4-6; 4-6: ERU Clupi4,3,2; 7: ERUCuli_sp1

Multiplex PCR analizlerinde kullanılan *Newsteadi* kompleks türleri için dizayn edilmiş N1F81 (*C. newsteadi* N1), N2F348 (*C. newsteadi* N2), N3R194 (*C. newsteadi* N3) ile CIJ1718M (genel forward) ve C1N2191M (genel reverse) primerlerinin çalışmada genotip düzeyinde

örneklenmiş izolatlara ait nükleotid sekansları ile uyumluluk analiz sonuçları Şekil 4.25’de gösterilmiştir. Agaroz jel görüntüsü üzerinde de görüleceği üzere ilgili *C. newsteadi* genotiplerine ait izolatlar ilgili primer çiftleri ile hedef amplifikasyon göstermiştir. Non spesifik amplifikasyonlar gözlenmemiştir.



Şekil 4.27 *C. newsteadi* kompleks multipleks PCR primerlerinin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlarla ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği



Şekil 4.28 *C. newsteadi* kompleks multipleks PCR primerleri ile PCR analiz sonuçları. 1-2: ERU Cnew2,6; 3: ERU Ctag7; 4: ERUCuli_sp1

Çalışmada araştırma yöresinde yeni bir haplotip olarak belirlenen nesillerin (ERU CulI_sp1-5) mt-COI gen bölgesinin 210bp kısmını amplifiye eden spesifik primer dizaynı yapılmış (CulBilF ve CulBilR) ve diğer izolatlarla birlikte PCR etkinliği araştırılmıştır. Şekil 4.29’da görüleceği üzere ilgili primerlerin hedef haplotipe özgün ve uyumlu olduğu belirlenmiştir. Nitekim PCR analizlerinde yalnızca hedef haplotipe özgü ampliconlar şekillenmiştir (Şekil 4.30). PCR mastermix 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 6 mM MgCl₂, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 10-20 ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: initial denaturation: 95 °C’de 4 dk; 35 siklus, denaturation: 95 °C’de 30sn, annealing: 60 °C’de 30sn extension: 72 °C’de 1dk; final extension: 72 °C’de 5 dk olacak şekilde programlanmıştır

Şekil 4.29 Çalışmada yeni haplotip olarak belirlenen *Culicoides* nesillerine özgü primerlerin haplotip bazında çalışmada belirlenen izolatlara ait ilgili nükleotid sekanslarıyla bağlanma etkinliği

Şekil 4.30 Çalışmada yeni haplotip olarak belirlenen *Culicoides* nesillerine özgü primerler ile PCR analiz sonuçları. 1-2: ERUCuli_sp1,2; ERU Cnew2; 3: ERU Cfag7; 4: Erucpuli1; 5: ERU Clupi1; 6: ERU Cpun1

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) soyundaki sokucu sinekler kan ile beslenen en küçük sinekler olarak bilinmekte olup vücut uzunlukları 1-3mm arasında değişmektedir (5). *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 yanı sıra 50'nin üzerinde arbovirus türü çeşitli *Culicoides* türlerinden izole edilmiş olup bu türlerin veteriner (5, 42) ve insan patojenlerinin (184, 185) naklindeki rolleri üzerine derlemeler yazılmıştır. *Culicoides* türlerinin insanlardan oportunistik beslenmesi de ayrıca turizm, ormancılık ve tarım endüstrisi üzerine etki gösterebilmektedir (5). 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 (186).

Biyolojik olarak nakledilen vektör kaynaklı patojenlerde, vektörlerin fenotipik ve genetik karakterleri bulaşmanın epidemiyolojisinin belirlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Birbirine yakın türlerin biyoloji ve ekolojisindeki göze çarpmayan farklılıklar bulaşma olasılığı üzerine önemli etki gösterebilmekte olup bu hususa en önemli nokta patojenle enfekte olabilme ve patojeni nakledebilme yeteneği (vektör-yeterliliği) ile spesifik konakla ilişki derecesidir (konak tercihi). Dolayısıyla türlerin doğru ve kesin ayrımı hastalık naklinin epidemiyolojisinin anlaşılmasında temel oluşturmaktadır (187). *Culicoides* soyu karışık bir soy olarak tarif edilmesine (188) karşın yaklaşık son otuz yıl içinde *Culicoides* türleri üzerine taksonomik çalışmaların büyük çoğunluğunun morfolojik analizlere dayandığı görülmektedir. Buna karşın “klasik” morfoloji taksonomisi uzmanlığı ve alt yapı mevcudiyetinin önemli derecede düşüş gösterdiği bilinmektedir. Sistematik için “moleküler entomoloji”nin gelişimi klasik taksonomi uzmanlığının gelişimine hızlı bir alternatif oluşturmuş (147), genetik karakterizasyon ve *Culicoides* türlerinin filogenetik tür konsepti yoluyla deliminasyonu artan bir önem kazanmıştır (187). Bu proses özellikle arbovirusların yeni coğrafik bölgelerde ortaya çıkmasıyla hızlanmış olup klasik taksonomik uzamanlığın yokluğunda epidemiyolojik sorulara yanıt oluşturma için lokal faunanın hızlı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır (189).

Culicoides oldukça yüksek diversiteye sahip bir soy olup şimdiye kadar tarif edilmiş 1300'ün üzerinde tür ile tüm dünyada yayılış göstermektedir (187). Bu soy içerisinde Avrupa'da birçok

türü tarif edilen *Culicoides* alt soyu oldukça önemli bir grubu 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 (42, 161, 177). Nitekim çalışmamızda da araştırma yöresinden izole edilen türler *Culicoides* alt soyunda belirlenmiş ve çeşitli araştırmacıların çalışmalarına (157, 160, 161) benzer olarak bu türler *Culicoides pulicaris* kompleks olarak ifade edilmiştir. Bunun yanında farklı türlerin intraspesifik morfolojik ve genetik varyasyonlarının coğrafik dağılımlarını ortaya çıkarmak oldukça önem arz etmektedir (175).

*Culicoides*lerin tür düzeyinde identifikasyonları bazı durumlarda uzman taksonomistler için dahi güçlük oluşturmaktadır. Tür kompleksleri içindeki sibling türlerin morfolojik ayrımlarının oldukça güç olduğu bildirilmiştir (42, 161). 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 (157, 160, 167, 190, 191). Örneklerin tür düzeyinde DNA barkod identifikasyonlarını takiben yeni morfolojik karakterlerin bulunması veya yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılan tür identifikasyonlarının konfirmasyonu mümkün olmuştur. Bu durum özellikle geniş çapta *Culicoides* örneklerinin identifikasyonunun zorunlu olduğu ekolojik çalışmalar kapsamında kullanışlı olmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılacak tipik olmayan örneklerin identifikasyonunu mümkün hale getirmiştir (175). Türkiye’de günümüze kadar *Culicoides* alt soyunda yer alan (*C. pulicaris* L. tür kompleksi) türlerin moleküler identifikasyonu üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bununla birlikte 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 identifikasyonunun yapıldığı yalnızca bir çalışma (192) bulunmaktadır. Yine Dik ve ark. (193) Antalya, Muğla, Aydın, İzmir, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale yörelerinden topladıkları ve morfolojik olarak identifiye ettikleri 13 *Culicoides* türüne ait örneklerde RT-PCR ile Epizootic Haemorrhagic Disease Virus (EHDV) ve Mavdil virus (BTV) araştırmışlar, 9 türe ait örneklerde (*C. imicola*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis*, *C. gejjelensis*, *C. longipennis*, *C. nubeculosus*, *C.*

obsoletus, *C. pulicaris* and *Culicoides* sp.) EHDV saptandığını buna karşın örneklerin hiçbirinde BTV'ye rastlanmadığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışma Türkiye'de *Culicoides* soy altında yer alan tür ve/veya haplotiplerin mt-COI DNA barkodlarının sağlandığı ve filogenetik karakterizasyonlarının yapıldığı ilk çalışma özelliğindedir. Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) bölgesini kodlayan gen, enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu kullanan organizimlerde universal olarak bulunmasıyla birçok organizmin filogenetik analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (146, 175). Mt-COI gen bölgesi aynı zamanda DNA barkodlaması için de ideal bir gen bölgesidir. Yaşam barkodlaması (BOL), PCR sekanslaması ve "DNA barkodları" olarak bilinen ve mt-COI geninin 50 bölgesinden elde edilen kısa standart DNA sekanslarının analizini kullanarak tür identifikasyonlarını ve yeni türlerin keşfini kolaylaştıran global bir girişimdir. Palearktik bölgede çeşitli Avrupa ülkelerinde yayılış gösteren *Culicoides* alt soyundaki türlerin ve/veya haplotiplerin araştırılmasında mt-COI barkodlaması ve filogenetik karakterizasyonun kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma (160, 161, 178) mevcut olup bu çalışmalarda çeşitli türler için inter ve intraspesifik varyasyonlar ortaya konmuştur.

Nolan ve ark. (160), *C. pulicaris* tür kompleksinde yer alan *C. pulicaris* sensu stricto L., *C. impunctatus*, *C. punctatus*, *C. grisescens* ve *C. newsteadi* türlerine ait izolatların ilk kez mt-COI gen barkodlamasını yapmışlar ve filogenetik yapılanmalarını incelemişlerdir. Araştırmacılar (160), Gomulski ve ark. (157) tarafından ITS-2 gen bölgesine göre intraspesifik varyasyon belirlenen *C. newsteadi* de dahil olmak üzere kompleks içindeki türlerde intraspesifik varyasyonu oldukça düşük belirlemişler (<0,005), tür içerisinde pairwise identikliği en yüksek *C. punctatus* ve *C. newsteadi*'de saptarken genetik farklılığı en yüksek *C. pulicaris* ve *C. grisescens* türleri için rapor etmişlerdir. Araştırmacılar (160) farklı coğrafik bölgelerden türler içerisinde gözlemledikleri bu düşük düzey polimorfizmin kısmen devamlı popülasyonların ve geniş aralıkta gen akışının bir göstergesi olabileceğini kaydetmişlerdir.

Pages ve ark. (161), *C. pulicaris* tür kompleksinde yer alan *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. fagineus*, *C. subfagineus*, *C. flavipulicaris*, *C. punctatus*, *C. grisescens* ve *C. impunctatus* türlerine ait nesillerin mt-COI gen bölgesine göre karakterizasyonunu yapmışlar ve filogenetik yapılanmalarını incelemişlerdir. Çalışmada (161) moleküler analizler sonucu morfolojik benzerlik bazında gruplanan üç kompleks içinde; *C. pulicaris*'e benzeyen iki (Pulicaris kompleks, "*C. pulicaris* P1 ve P3"), *C. fagineus*'a benzeyen iki (Fagineus kompleks,

“*C. fagineus* F1 ve s.s) ve *C. newsteadi*’ye benzeyen üç (Newsteadi kompleks, “*C. newsteadi* N1, N2, N3) yeni kriptik tür tarif edilmiş ve kanat morfolojilerine göre özellikleri tarif edilmiştir. İzolatlar arasındaki filogenetik yapılanma, hem *Pulicaris* hem de *Fagineus* kompleks içinde belirlenen türlerin birbirleriyle yakın ilişkili olduğunu, fakat Newsteadi komplekstekilerin ise genetik olarak diğer iki komplekse oranla daha uzak olduklarını ortaya koymuştur. Yine araştırmacılar (161) intraspesifik nükleotid diversitesini tüm türler için düşük olduğunu kaydetmişler, bunlar arasında en yüksek değerlerin *C. punctatus*, *C. newsteadi* N2 ve *C. fagineus* s.s. nesillerinde gözlemlendiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada (161) intra-spesifik polimorfizmin görülmediği tek tür *C. newsteadi* N1 olarak rapor edilmiştir.

Lassen ve ark. (178), *Culicoides* alt soyunda yer alan *C. pulicaris*, *C. newsteadi*, *C. punctatus*, *C. grisescens*, *C. deltus*, *C. halophilus* ve *C. impunctatus* türlerine ait nesillerin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik yapılanmalarını araştırmışlardır. Araştırmada (178), *Culicoides* alt soyundaki incelenen türler için mt-COI barkod sekans diversitesi tür içinde <%1 bulunurken türler arası diversitenin %12,5 - %19,8 arasında değiştiği belirlenmiş, filogenetik analizlerde örneklerin dört yaygın Palaearktik tür olan *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. impunctatus* ve *C. grisescens*’i içermek üzere 8 yegâne cluster içerisinde ayrıştığı saptanmıştır. Çalışmada (178) bu bulgulara ilaveten *C. halophilus*’un geçerli bir takson olduğu konfirme edilmiş ve ilk kez *C. deltus* barkod sekansı sağlanmıştır. Araştırmacılar (178) ayrıca barkod yapısına göre *Culicoides* dk1, *Culicoides* dk3 ve *Culicoides* Kalix olmak üzere üç yeni haplotip tanımlamışlardır. Nitekim farklı genetik kümeler oluşturan *Culicoides* dk1, *Culicoides* dk3 ve *Culicoides* Kalix haplotiplerine, Nielsen ve Kristensen (175), tarafından genetik ve morfometrik karakterlerine göre sırasıyla *C. boyi*, *C. selandicus* ve *C. kalix* olarak yeni tür isimleri verilmiştir.

Çalışmamızda incelemesi yapılan *Culicoides* alt soyundaki türlere ait nesillerin mt-COI sekans ve barkod analizleri izolatlar arasında 151 polimorfik bölgeyi ortaya çıkarmış ve buna bağlı olarak da 22 farklı haplotip belirlenmiştir. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiş olup çalışmada karakterize edilen tür ve/veya haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $19,4 \pm 1,8$ saptanmıştır. Bu polimorfizm oranının çeşitli araştırmacıların (161, 178) bildirdikleri oranlarla paralel olduğu dikkati çekmiş olup ayrıca elde edilen sonuçlar Meiswinkel ve ark. (194) ve Lassen ve ark.’nın (178) da ifade ettiği gibi çeşitli kriptik türlerin varlığıyla *Culicoides* alt soyunun taksonomik durumunun problemlili olması ve henüz çözümlenememiş olmasını da moleküler düzeyde destek

sağlamıştır. Nitekim Pages ve ark. (161) da çeşitli tür kompleksleri içinde multiple kriptik türlerin varlığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda *C. punctatus* ve *C. pulicaris* nesilleri arasında intraspesifik genetik heterojenite sırasıyla ortalama $0,4 \pm 0,2$ ve $0,5 \pm 0,2$ olmak üzere düşük belirlenmiş olup elde edilen bu oranların Pages ve ark., (161) ve Lassen ve ark.'nın (178) bulgularıyla benzer olduğu saptanmıştır. Ancak Pages ve ark., (161) *C. pulicaris*'in iki farklı haplotipini (P1 ve P3) bildirmiş olmalarına karşın çalışmamızda araştırma yöresinde saptanan *C. pulicaris* nesillerinin Danimarka, İngiltere, İspanya, Fransa, İsveç ve İsviçre'den bildirilmiş nesillerle birlikte cluster oluşturarak P1 genotipinde yer aldığı dikkati çekmiştir. Mevcut çalışma ile ayrıca *C. lupicaris*'in Türkiye'deki varlığı ilk kez bildirilmiş ve moleküler olarak konfirme edilmiştir. Pages ve ark., (161) ve Lassen ve ark. (178) izole ettikleri *C. lupicaris* nesillerinin monofiletik olduklarını ve genetik heterojenitenin düşük olduğunu bildirmelerine karşın çalışmamızda saptanan nesillerin üç ayrı cluster'a ayrıldığı ve farklı genotiplerin var olduğu belirlenmiştir. Nitekim bu genotipler arasındaki genetik heterojenite de $14,5 \pm 1,8$ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar da, *C. newsteadi*, *C. pulicaris* ve *C. fagineus* için bildirildiği gibi (161, 178) *C. lupicaris*'in de bir tür kompleksi olduğuna ve farklı haplotipleri içerdiğine dair moleküler kanıtlar ortaya koymuştur. Çalışmada belirlenen *C. newsteadi* nesillerinin İspanya ve Slovakya'dan rapor edilmiş *C. newsteadi* N1 ve İtalya'dan bildirilmiş *C. newsteadi* genotipleriyle yakın ilişkili bulunmuş olup iki genotip arasında genetik heterojenite yüksek ($18,4 \pm 2,5$) saptanmıştır. Nolan ve ark. (160) *C. newsteadi* için genetik heterojeniteyi oldukça düşük belirlemişler ve bu durumu sabit popülasyonlardaki gen akışıyla izah etmişlerdir. Ancak sonraki çalışmalar (161, 178) *C. newsteadi*'nin bir tür kompleksi olduğunu ve genetik olarak farklı haplotipleri barındırdığını ortaya koymuştur. Nitekim *C. newsteadi* içerisindeki bu farklı haplotiplerin (N1, N2, N3) yeni birer tür olabilecekleri ve yakın zamanda statülerinin ortaya konulacağı kaydedilmiştir (175). Pages ve ark. (161) *C. fagineus*'un iki ayrı genotipinin (F1 ve s.s.) varlığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda belirlenen *C. fagineus* nesilleri arasındaki genetik farklılık düşük ($0,6 \pm 0,2$) belirlenmiş olup ilgili nesiller Slovakya ve İspanya'dan bildirilmiş nesillere genetik yakınlık göstermiş ve *C. fagineus* s.s. genotipinde yer almışlardır. Çalışmada en düşük intra spesifik genetik heterojenite $0,1 \pm 0,1$ ile *C. flavipulicaris* nesilleri arasında saptanmış olup elde edilen bu sonuç Pages ve ark.'nın (161) bulgularına benzer bulunmuştur. İlgili nesillerin İspanya izolatlarına %99,8 identiklik göstererek birlikte cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca *Culicoides* alt soyunda morfolojik ve genetik olarak farklı yeni bir haplotipin varlığı belirlenmiş

olup bu haplotipe bağılı izolatların Zonguldak ve Düzce olmak üzere farklı odaklardan izole edilmiş olmalarına karşın %100 identik oldukları ve ayrı bir küme oluşturdıkları görülmüştür. Bu yeni haplotipe bağılı nesillerin, *Culicoides* soy altı içerisinde diğerk tarif edilmiş türlere oranla *C. fagineus*, *C. subfagineus* ve *C. flavipulicaris* nesillerine %21,8±3,0, %16,4±2,7 ve %20,5±3,0 oranlarında genetik farklılık göstermekle birlikte daha yakın oldukları ve üst gruplanma gösterdikleri dikkati çekmiştir. Bu basamakta haplotip olarak ifade edilmiş olan bu yeni nesillerin tür statüsü üzerine çalışmalar devam etmekte olup yakın zamanda yeni bir tür olarak klasifiye edilmesi muhtemeldir. Yine elde edilen bu sonuç Nielsen ve Kristensen, (175) tarafından son zamanda tarif edilen yeni türler de göz önüne alındığında *Culicoides* soy altında kriptik tür çeşitliliğinin yüksek olduğu görüşüne (194) moleküler bazda destek sağlamıştır.

Çalışmamızda ayrıca Nolan ve ark. (160) ve Pages ve ark. (161) tarafından *Culicoides* alt soyundaki bazı türlerin identifikasyonu için dizayn edilmiş primer çiftleri araştırma sahasından izole edilerek karakterize edilmiş izolatlarla ait plazmid DNA'lar da etkinlik açısından değerlendirilmiş olup bazı tür spesifik primer çiftlerinin çeşitli sayıda nükleotid farklılığı olmasına karşın hedef dışı türler ile de uygun annealing ısısında amplifikasyon gösterdiği görülmüştür. Nitekim çeşitli araştırmacılar (161, 178) tarafından da bildirildiği üzere *Culicoides* alt soyundaki türlerde polimorfizmin yüksek olması ve kriptik türlerin mevcudiyeti çoğu tür için tür spesifik PCR geliştirilmesini sınırlamaktadır. Bunun yaynında çalışmamızda yeni bir haplotip olarak identifiye edilmiş olan nesillere ait izolatların mt-COI gen bölgelerinden mevcut tüm *Culicoides* alt soyundaki tür ve haplotiplerin de sekans analizleriyle bu haplotipe özgü primer dizaynı yapılmıştır. İlgili primer çiftlerinin hedef haplotip dışında analizlere dâhil edilen hiçbir türe bağlanma göstermediği belirlenmiş ve özgünlüğünün yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma ile Batı Karadeniz Bölgesinde ve Konya yöresinde yaygınlık gösteren *Culicoides* alt soyundaki türlerin mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonları yapılmış ve barkodlamaları sağlanarak Türkiye için ilk moleküler veriler olarak GenBank veri tabanına kayıtları sağlanmıştır. Karakterize edilen tüm izolatların dünyada GenBank'a kayıt edilmiş mevcut homolog izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. Çalışma ile ayrıca bu alt soy içerisinde muhtemel yeni bir tür karakterize edilmiş ve haplotip bazında özellikleri ortaya konmuştur. Türkiye'de yayılış gösteren *Culicoides* türleri üzerine morfolojik ve moleküler bazda çalışmaların birlikte

yürütölerek geniş çaplı araştırma projelerinin hayata geçirilmesi, özellikle *Culicoides* kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisi ile kontrol ve mücadele yöntemlerinin şekillendirilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Borkent A. Biting midges (Ceratopogonidae:Diptera) from Lower Cretaceous Lebanese amber with a discussion of the diversity and patterns found in other ambers. In: Grimaldi D, editor. Studies on fossils in amber, with particular reference to the Cretaceous of New Jersey: Leiden: Backhuys; 2000. p. 355-452.
2. Borkent A, Grogan WL. Catalog of the New World Biting Midges North of Mexico (Diptera, Ceratopogonidae). Zootaxa. 2009;2273:1-48.
3. Borkent A. World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) 2012 [cited 2016]. Available from: <http://www.inhs.illinois.edu/research/FLYTREE/Borkent.html>.
4. Bellis GA. Studies on the taxonomy of Australasian species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae): University of Queensland, Australia; 2013.
5. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu Rev Entomol. 2000;45:307-340.
6. Laird M. A ceratopogine midge (*Culicoides anophelis* Edwards, 1922) sucking engorged blood from a mosquito (*Armigeres lacuum* Edwards, 1922) at Palmalmal, New Britain. Transactions of the Royal Society of New Zealand. 1946;76:158-161.
7. Wirth WW, Hubert AA. *Trithecoides*, a new subgenus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Pacific Insects. 1959;1:1-38.
8. Sen P, Das Gupta SK. Feeding habits of *Culicoides anophelis* (Diptera: Ceratopogonidae). Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine. 1959a;7:108-109.
9. Das Gupta SK. *Culicoides (Trithecoides) anophelis* Edwards (Insecta:Diptera: Ceratopogonidae) as an ectoparasite of insect vectors. Proceedings of the Zoological Society of Calcutta. 1964;17:1-20.
10. Campbell JA, Pelham-Clinton EC. A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 1960;67:181-302.
11. Borkent A. Biting midges from Upper Cretaceous New Jersey amber (Diptera: Ceratopogonidae). American Museum Novitates. 1996;3159:1-29.
12. Jamnback H. Structure of the antennae and mouthparts as related to feeding habits of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Proceedings of the 12th International Congress of Entomology; London 1965. p. 817.
13. Wirth WW, Navai S. Terminology of some antennal sensory organs of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Journal of Medical Entomology. 1978;15(1):43-49.
14. Rowley WA, Cornford M. Scanning electron microscopy of the pit of the maxillary palp of selected species of *Culicoides*. Canadian Journal of Zoology. 1972;50:1207-1210.
15. Braverman YH, P.E. The relationship between the numbers of some antennal and palpal sense organs and host preference in some *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from southern Africa. Journal of Medical Entomology. 1979;15:419-424.

16. Braverman Y, Rubina M, Frish K. Pathogens of veterinary importance isolated from mosquitoes and biting midges in Israel. *Insect Science and its Application*. 1981;2:157-161.
17. Meiswinkel R, Linton YM. Afrotropical *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae): morphological and molecular description of a novel fruit inhabiting member of the Imicola Complex, with a re-description of its sister species *C. (Avaritia) pseudopallidipennis* Clastrier. *Cimbebasia*. 2003;19:37-79.
18. Wirth WW, Hubert AA. *Culicoides* of Southeast Asia. *Memoirs of the American Entomological Institute*. 1989;44.
19. Borkent A. Biting midges (Ceratopogonidae: Diptera) feeding on a leatherback turtle in Costa Rica. *Brenesia*. 1995b;43-44:25-30.
20. Lewis DJ. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*. 1975;126:497-532.
21. Muller MJ, Murray MD, Edwards JA. Blood-sucking midges and mosquitoes feeding on mammals at Beatrice Hill. N.T. *Australian Journal of Zoology*. 1981;29:573-588.
22. Bellis GA, Melville LF, Hunt NT, et al. Temporal activity of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle near Darwin, Northern Territory, Australia. *Veterinaria Italiana*. 2004;40(3):324-328.
23. Barnard BJ. Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort J Vet Res*. 1997;64(3):227-233.
24. Buckley JJC. On *Culicoides* as a vector of *Onchocerca gibsoni* (Cleland & Johnston, 1910). *Journal of Helminthology*. 1938;16:121-158.
25. Cheah TS, Rajamanickam C. Occurrence of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in sheep sheds and their relevance to bluetongue in Peninsular Malaysia. *Trop Anim Health Prod*. 1991;23(1):63-65.
26. Doherty WM, Bishop AL, Melville LF, et al. Protection of cattle from *Culicoides* spp. in Australia by shelter and chemical treatments. *Veterinaria Italiana*. 2004;40(3):320-323.
27. Hoshino C. Note on biting midges collected by light traps at a cowshed in Ishigaki-jima, Ryukyu Islands. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*. 1985 36:55-58.
28. Meiswinkel R, Baylis M, Labuschagne K. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bull Entomol Res*. 2000;90(6):509-515.
29. Melville L, Hunt N, Bellis G, et al. Protection of cattle from NT vectors of bluetongue and BEF viruses by covered pens and chemicals. *Arbovirus Research in Australia*. 2005;9:224-229.
30. Standfast HA, Dyce AL. Arthropods biting cattle during an epizootic of ephemeral fever in 1968. *Aust Vet J*. 1972;48(3):77-80.
31. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*. 2008;22(3):175-187.

32. Linley JR. Biting midges of mangrove swamps and saltmarshes (Diptera: Ceratopogonidae). In: Cheng L, editor. Marine Insects. Amsterdam: North-Holland Pub. Co.; 1976.
33. Becker P. Observations on the life cycle and immature stages of *Culicoides circumscriptus* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. 1961;67:363-386.
34. Glukhova VM. Lichinki mokretsov posemeistv Palpomyiinae i Ceratopogoninae fauny SSSR (Diptera: Ceratopogonidae = Heleidae) [Larvae of the biting midge subfamilies Palpomyiinae and Ceratopogoninae of the fauna of the USSR]. Opredelitchi po Faune SSSR, izdavaemye Zoologicheskim Institutom AN SSSR. 1979;121:1-231
35. Jobling B. On the bloodsucking midge *Culicoides vexans* Staeger, including the description of its eggs, and the first-stage larva. Parasitology. 1953;43:148-159.
36. Megahed MM. A culture method for *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory, with notes on the biology. Bulletin of Entomological Research. 1956;47:107-114.
37. Parker AH. Studies on the eggs of certain biting midges (*Culicoides* Latreille) occurring in Scotland. Proceedings of the Royal Entomological Society of London (A). 1950 25:43-52.
38. Campbell MM, Kettle DS. Number of adult *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) emerging from bovine dung exposed under different conditions in the field. Australian Journal of Zoology. 1976;24:75-85.
39. Downes JA. What is an arctic insect? Canadian Entomologist. 1962;94:143-162.
40. Cannon LRG, Reye EJ. A larval habitat of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) Journal of the Entomological Society of Queensland. 1966;5:7-9.
41. Nevill EM. Biological studies on some South African *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) and the morphology of their immature stages. [M.Sc. (Agric.) Thesis]: University of Pretoria; 1967.
42. Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM. Vectors: *Culicoides* spp. In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Infectious Diseases of Livestock. Cape Town: Oxford University Press; 2004. p. 93-136.
43. Kettle DS, Lawson JWH. The early stages of British biting midges *Culicoides* Latreille and allied genera. Bulletin of Entomological Research. 1952;43:421-467.
44. Downes JA, Kettle DS. Descriptions of three species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science, together with notes on, and a revised key to the British species of the pulicaris and obsoletus groups. Proceedings of the Royal Entomological Society of London (B). 1952;21:61-78.
45. Dyce AL. Distribution of *Culicoides* (*Avaritia*) species. (Diptera: Ceratopogonidae) west of the Pacific ocean. In: St George TD, Kay BH, editors. Arbovirus Research in Australia: CSIRO and QIMR, Brisbane; 1982. p. 35-43.

46. Dyce AL, Marshall BD. An early record of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) developing in the dung of game animals in southern Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1989; 56:85-86.
47. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) kanagai* Khamala & Kettle 1971, reared from elephant dung in the Kruger National Park, South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1987;54:585-590.
48. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African Buffalo, Blue Wildebeest and cattle in South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1989;56:23-39.
49. Nevill EM. (A significant new breeding site of *Culicoides pallidipennis* Carter, Ingram and Macfie (Diptera: Ceratopogonidae). Journal of the South African Veterinary Medical Association. 1968; 39:61.
50. Bishop AL, McKenzie HJ. Overwintering of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hunter Valley, N.S.W. Journal of the Australian Entomological Society. 1994;33:159-163.
51. Watson JAL, Dyce AL. The larval habitat of *Podopteryx selysi* (Odonata: Megapodagrionidae). Journal of the Australian Entomological Society. 1978;17:361-362.
52. Dyce AL, Murray MD. Notes on the pupal behaviour and collection of larvae and pupae of some australian *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). J Ent Soc Qd. 1966;5:37-39.
53. Downes JA. Assembly and mating in biting Nematocera. Proceedings of the 10th International Congress of Entomology. 1958;2:425-434.
54. Downes JA. Notes on the organs and processes of sperm-transfer in the lower Diptera. Canadian Entomologist. 1968;100:608-617.
55. Downes JA. The swarming and mating flight of Diptera. Annual Review of Entomology. 1969;14:271-298.
56. Blackwell A, Mordue AJ, Mordue W. Morphology of the antennae of two species of biting midge: *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) and *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera, Ceratopogonidae). Journal of Morphology. 1992;213(1):85-103.
57. Dyce AL. *Culicoides paragarciai*, a new ornatus group species from Papua New Guinea and the Solomon Islands (Diptera: Ceratopogonidae). Australian Journal of Entomology. 1996;35(4):313-318.
58. Muller MJ, Standfast HA, T.D. SG, et al. *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of arboviruses in Australia. In: St. George TD, B.H. K, editors. Arbovirus Research in Australia 1982. p. 43-49.
59. Meiswinkel R. The 1996 outbreak of African horse sickness in South Africa-the entomological perspective. In: Mellor PS, Baylis M, Hamblin C, et al., editors. African Horse Sickness: Wein:Springer-Verlag. 342; 1998. p. 69-83.
60. Reye EJ. The common pest species. Bulletin of the Mosquito Control Association of Australia. 1992;4(3):6-14.
61. Hendry G. Midges in Scotland. 4th edition ed. Edinburgh: Mercat Press,; 2004

62. Linley JR, Davies JB. Sandflies and tourism in Florida and the Bahamas and Caribbean area. *Journal of Economic Entomology*. 1971;64:264-278.
63. Ratnayake J, Dale PE, Sipe NG, et al. Impact of biting midges on residential property values in Hervey Bay, Queensland, Australia. *J Am Mosq Control Assoc*. 2006;22(1):131-134.
64. Tokunaga M, Murachi EK. Insects of Micronesia. Diptera: Ceratopogonidae. *Insects of Micronesia*. 1959;12(3):103-434.
65. Wirth WW, Arnaud PH. Polynesian biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Pacific Insects*. 1969;11:507-520.
66. Wirth WW, Blanton FS. Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera:Heleidae). *Proceedings of the United States National Museum*. 1959;109:237-482.
67. Wongsathuaythong S, Fuangtong R, Ketavan C. Insect and arachnid allergy in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 1977;60:274-278.
68. Braverman Y. Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*. 1988;20:426.
69. McCaig J. A survey to establish the incidence of sweet itch in ponies in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 1973;93:444-446.
70. Mellor PS, McCaig J. The probable cause of 'sweet itch' in England. *The Veterinary record*. 1974;95:411-415.
71. Nakamura R, Matsubashi A, Yamashita N, et al. Studies on "Kasen" of horses in Hokkaido. III. Research on the actual state of the disease. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 1956;4:81-88.
72. Riek RF. Studies on Allergic Dermatitis (Queensland Itch) of the Horse: The aetiology of the disease. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1954;5:109-129.
73. Cybinski DH, Muller MJ. Isolation of arboviruses from cattle and insects at two sentinel sites in Queensland, Australia, 1979-1985. *Australian Journal of Zoology*. 1990;38:25-32.
74. Doherty RL, Carley JG, Standfast HA, et al. Virus strains isolated from arthropods during an epizootic of bovine ephemeral fever in Queensland. *Australian Veterinary Journal*. 1972;48:81-86.
75. Dyce AL. Bluetongue vectors in Australia - present and future. . In: Uren MF, Blok J, Manderson LH, editors. *Arbovirus research in Australia - Proceedings of the fifth symposium*. Brisbane: CSIRO and QIMR; 1989. p. 315-319
76. St George TD, Standfast HA, Cybinski DH. Isolations of Akabane virus from sentinel cattle and *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal*. 1978;54:558-561.
77. Standfast HA, A.L. D, T.D. SG, et al. Isolation of arboviruses from insects collected at Beatrice Hill, Northern Territory of Australia, 1974-1976. *Australian Journal of Biological Science*. 1984;37:351-366.

78. Anderson RC. The life cycle and seasonal transmission of *Ornithofilaria fallisensis* Anderson, a parasite of domestic and wild ducks. Canadian Journal of Zoology. 1956;34:485-525.
79. Bartlett CM, Anderson RC. Development of *Chandlerella chitwoodae* (Filarioidea:Onchocercidae) in *Culicoides stilbezzoides* and *Culicoides trivisi* (Diptera: Ceratopogonidae). Canadian Journal of Zoology. 1980 58:1002-1006.
80. Davies JB, Trees AL, McCall PJ, et al. On the possibility of bovine *Onchocerca* species infecting *Simulium damnosum* sensu lato in the forest zone of Sierra Leone, II, Biting densities and filarial infections in *Simulium* spp. and *Culicoides* spp. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1989;83:603-614.
81. Mellor PS. Studies of *Onchocerca cervicalis* Raillet et Henry 1910. V. The development of *Onchocerca cervicalis* larvae in the vectors. Journal of Helminthology. 1975;49:33-42.
82. Nathan MB. Transmission of the human filarial parasite *Mansollea ozzardi* by *Culicoides phlebotomus* (Diptera: Ceratopogonidae) in coastal north Trinidad. Bulletin of Entomological Research. 1981;71:97-106.
83. Robinson EJ. *Culicoides crepuscularis* (Malloch) (Diptera: Ceratopogonidae) as a host for *Chandlerella quiscali* (con Linstow, 1904) comb. N. (Filarioidea:Onchocercidae). Journal of Parasitology. 1971;57:772-776.
84. Spratt DM, Dyce AL, Standfast HA. *Onchocerca sweetae* (Nematoda:Filarioidea): notes on the intermediate host. Journal of Helminthology. 1978;52:74-81.
85. Akiba K. Studies on the *Leucocytozoon* found in the chicken in Japan. II. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. Japanese Journal of Veterinary Science. 1960;22:309-317.
86. Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. Experimental vectors of *Haemoproteus meleagridis* Levine from wild turkeys in Florida. Journal of Wildlife Diseases. 1983;19:306-368.
87. Fallis AM, Bennet GP. Ceratopogonidae as intermediate hosts for *Haemoproteus* and other parasites. Mosquito News. 1961;21:21-28.
88. Garnham PCC, Heisch RB, Minter DM, et al. *Culicoides adersi* Ingram and Macfie, 1923, a presumed vector of *Hepatocystis* (= *Plasmodium*) *kochi* (Laveran, 1899). Nature. 1961(190):739-741.
89. Khan RA, Fallis AM. A note on the sporogony of *Parahaemoproteus velans* (= *Haemoproteus velans* Coatney and Roudabush) (Haemosporidia: Haemoproteidae) in species of *Culicoides*. Canadian Journal of Zoology. 1971;49:420-421.
90. Blackburn NK, Searle L, Phelps RJ. Viruses isolated from *Culicoides* (Dipt.: Cerat.) caught at the Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. Journal of the Entomological Society of South Africa. 1985; 48:331-336.
91. Elbel RP, Crane GT, Callisher CH. Arbovirus isolation from southwestern Utah and northwestern Arizona insects 1972-1975 Mosquito News. 1977;37:497-505.

92. Gibbs EPJ, Calisher CH, Tesh RB, et al. Bivens Arm virus: A new rhabdovirus isolated from *Culicoides insignis* in Florida and related to Tibrogargan virus of Australia. *Veterinary Microbiology*. 1989;19:141-150.
93. Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, et al. Isolations of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Veterinary Microbiology*. 1987;15:243-248.
94. Paweska JT, Prinsloo S, Venter GJ. Oral susceptibility of South African *Culicoides* species to live-attenuated serotype-specific vaccine strains of African horse sickness virus (AHSV). *Medical and Veterinary Entomology*. 2003;17(4):436-447.
95. Standfast HA, Dyce AL, Muller MJ. Vectors of bluetongue virus in Australia. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn B, editors. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Monterey, California: January 1984. Alan R. Liss. N.Y. *Progress in Clinical Biological Research*. 178; 1985. p. 177-186.
96. Venter GJ, Wright IM, Van Der Linde TC, et al. The oral susceptibility of South African field populations of *Culicoides* to African horse sickness virus. *Medical and Veterinary Entomology*. 2009;23(4):367-378.
97. Wirth WW. A review of the pathogens and parasites of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the Washington Academy of Science*. 1977;67:60-75.
98. Mullens BA, Sarto i Monteys V, Przhiboro AA. Mermithid parasitism in Ceratopogonidae: A literature review and critical assessment of host impact and potential for biological control of *Culicoides*. *Russian Entomological Journal*. 2008;17(1):87-113.
99. Debenham M. Australasian species of the blood-feeding *Forcipomyia* subgenera, *Lasiohelea* and *Dacnoforcipomyia* (Diptera: Ceratopogonidae). *Australian Journal of Zoology*. 1983;95:1-61.
100. Poinar G, Jr., Sarto i Monteys V. Mermithids (Nematoda: Mermithidae) of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): *Heleidomermis cataloniensis* n. sp. from *Culicoides circumscriptus* Kieffer in Spain and a species of *Cretacimermis* Poinar, 2001 from a ceratopogonid in Burmese amber. *Syst Parasitol*. 2008;69(1):13-21.
101. Reynolds DR, Chapman JW, Harrington R. The migration of insect vectors of plant and animal viruses. *Advances in Virus Research*. 2006;67:453-517.
102. Whelan PI, Hayes GA, Montgomery B. Biting midge surveillance in Darwin Harbour, *Culicoides ornatus* (Diptera: Ceratopogonidae) abundance and dispersal. *Arbovirus Research in Australia*. 1997;7:326-336.
103. Kay BH, Lennon T. Seasonal prevalence and bionomics of biting midges (Ceratopogonidae) at Ocean Shores, New South Wales. *Journal of the Australian Entomological Society*. 1982;21:207-216.
104. Murray MD. Local dispersal of the biting-midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Zoology*. 1987;35:559-573.
105. Johansen CA, Farrow RA, Morrisen A, et al. Collection of wind-borne haematophagous insects in the Torres Strait, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*. 2003;17(1):102-109.

- 106.Quinn MA, Halbert SE, Williams LI. Spatial and temporal changes in aphid (Homoptera: Aphididae) species assemblages collected with suction traps in Idaho. *Journal of Economic Entomology*. 1991 84:1710-1716.
- 107.Dyce AL, Standfast HA, Kay BH. Collection and preparation of biting midges (fam. Ceratopogonidae) and other small diptera for virus isolation. *Journal of the Australian Entomological Society*. 1972; 11:91-96.
- 108.Hardy AC, Cheng L. Studies in the distribution of insects by aerial currents. III. Insect drift over the sea. *Ecological Entomology*. 1986; 11:283-290.
- 109.Farrow RA, Dowse JE. Method of using kites to carry tow nets in the upper air for sampling migrating insects and its application to radar entomology. *Bulletin of Entomological Research*. 1984;74:87-95.
- 110.Hollinger SE, Sivier KR, Irwin ME, et al. A helicopter-mounted isokinetic aerial insect sampler. *Journal of Economic Entomology*. 1991 84:476-483.
- 111.Sellers RF. Weather, host and vector - their interplay in the spread of insectborne animal virus diseases. *Journal of Hygiene (Cambridge)*. 1980;85:65-102.
- 112.Sellers RF, Pedgley DE, Tucker MR. Rift Valley fever, Egypt 1977: disease spread by windborne insect vectors? *The Veterinary record*. 1982;110:73-77.
- 113.Johansen CA, van den Hurk AF, Pyke AT, et al. Entomological investigations of an outbreak of Japanese encephalitis virus in the Torres Strait, Australia, in 1998. *Journal of medical entomology*. 2001;38(4):581-588.
- 114.Johansen CA, van den Hurk AF, Ritchie SA, et al. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Western Province of Papua New Guinea, 1997-1998. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(5):631-638.
- 115.Bishop AL, Kirkland PD, McKenzie HJ, et al. Distribution and seasonal movements of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) at the southern limits of its distribution in New South Wales and their correlation with arboviruses affecting livestock. *Journal of the Australian Entomological Society*. 1995;34:289-298.
- 116.Braverman YC, F. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Review Scientific et Technique (International Office of Epizootics)*. 1996;15:1037-1052.
- 117.Sellers RF, Maarouf AR. Possible introduction of epizootic hemorrhagic disease of deer virus (serotype 2) and bluetongue virus (serotype 11) into British Columbia in 1987 and 1988 by infected *Culicoides* carried on the wind. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1991;55:367-370.
- 118.Chapman HF, Hughes JM, Ritchie SA, et al. Population structure and dispersal of the freshwater mosquitoes *Culex annulirostris* and *Culex palpalis* (Diptera: Culicidae) in Papua New Guinea and northern Australia. *Journal of medical entomology*. 2003;40(2):165-169.
- 119.Nolan DV, Dallas JF, Piertney SB, et al. Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Medical and veterinary entomology*. 2008;22(4):340-351.

120. Wirth WW. The Heleidae of California. University of California Publications in Entomology 1952;9:95-266.
121. Arnaud PH. The heleid genus *Culicoides* in Japan, Korea and Ryukyu Islands (Insecta: Diptera). Microentomology. 1956;21:84-207.
122. Tokunaga M. Biting midges of the genus *Culicoides* from New Guinea (Diptera: Ceratopogonidae). Pacific Insects. 1962;4:457-516.
123. Delfinado MD. Philippine Zoological Expedition 1946–1947. The Philippine biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Fieldiana Zoology. 1961;33:627-675.
124. Khamala CPM, Kettle DS. The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. Transactions of the Royal Entomological Society of London. 1971;123:1-95.
125. Howarth FG. Biosystematics of the *Culicoides* of Laos (Diptera: Ceratopogonidae). International Journal of Entomology 1985;27:1-96.
126. Glukhova VM. Krovosoushchie mokretsy rodov *Culicoides* i *Forcipomyia* (Ceratopogonidae) [Bloodsucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogoniae)]. Fauna SSSR. Novaya seriya No 139. Nasekomye dvukrylye. 1989;3:1-408.
127. Yu YX, Liu JH, Liu GP, et al. Ceratopogonidae of China, Insecta, Diptera. Beijing: Military Medical Science Press; 2005. 1699 p.
128. Arnaud PH, Wirth WW. A name list of World *Culicoides*, 1956-1962. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 1964;66:19-32.
129. Wirth WW, A.L. D. The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn BI, editors. Bluetongue and Related Orbiviruses. 178. Monterey, California: January 1984. Alan R. Liss, N.Y. Progress in Clinical Biological Research; 1985. p. 151-164.
130. Boorman JPT, Hagen DV. A name list of world *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). International Journal of Dipterological Research. 1996;7(3):161-192.
131. Borkent A, Wirth WW. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Bulletin of the American Museum of Natural History. 1997 233-257.
132. Dyce AL. Biogeographic origins of species of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) of the Australasian Region. Arbovirus Research in Australia. 2001;8:133-140.
133. Ilango K. Bluetongue virus outbreak in Tamil Nadu, southern India: Need to study the Indian biting midge vectors, *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). Current Science. 2006;90(2):163-167.
134. Carpenter S, McArthur C, Selby R, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. Veterinary Record. 2008;163:589-592.
135. Root FM, Hoffman WA. The North American species of *Culicoides*. American Journal of Hygiene. 1937;25:150-176.

136. Edwards FW, Oldroyd H, J. S. British blood-sucking flies. London British Museum 1939.
137. Fox I. Hoffmania, a new subgenus in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Proceedings of the Biological Society of Washington. 1948;61:21-28.
138. Vargas L. Beltranmyia n. subgen. of *Culicoides* (Insecta:Heleidae). Revista del Insftuto de Salubridad y Enfermedades Tropicales Mexico. 1953;13:33-36.
139. Vargas L. Wirthomyia, a new subgenus of *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae. Mosquito News. 1973;33:112-113.
140. Wada Y. The Segnis group of *Culicoides* Latreille from Japan, with description of a new species. Tropical Medicine 1979 21(4):197-210.
141. Remm H. New Synonyms and new names of Palaearctic Ceratopogonidae (Diptera). Eesti NSV Teaduste Akadeemia Toimetised. 30. Koide Biologia Number. 1981 1:27-32.
142. Delécolle JC, Kremer M. Revision of *C. segnis*, *C. reconditus* and *C. riouxi* (Diptera, Ceratopogonidae) with a check list of species of the subgenus Wirthomyia. Mosquito News. 1982;42:523.
143. Wirth WW, Dyce AL, Peterson BV. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the Nearctic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Contributions of the American Entomological Institute. 1985;22(4):1-46.
144. Phillips RA, Grogan WLJ, Mullens BA. A new synonym of the biting midge, *Culicoides bottimeri* Wirth, with a redescription, new distribution records and seasonal activity data (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa. 2006;1122:47-55.
145. Curran J. Molecular taxonomy. Nematologica (0028-2596). 1990;36(4) (4):342.
146. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. 2003;270(1512):313-321.
147. Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy. Trends in Ecology & Evolution. 2003;18:70-74.
148. Meier R. DNA sequences in taxonomy: Opportunity and challenges. In: Wheeler Q, editor. The new taxonomy. New York: CRC Press; 2009. p. 95-127.
149. Dayrat B. Towards integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society. 2005;85:407-415.
150. Teletchea F. After 7 years and 1000 citations: comparative assessment of the DNA barcoding and the DNA taxonomy proposals for taxonomists and non-taxonomists. Mitochondrial DNA. 2010;21(6):206-226.
151. Hurst GDD, Jiggins F. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. Proceedings of the Royal Society (Series B). 2005;272:1525-1534.
152. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol. 2007;22(3):148-155.
153. Tabachnick WJ. Genetic differentiation among North American populations of *Culicoides variipennis*. Annals of the Entomological Society of America. 1992;85:140-147.

154. Holbrook FR, Tabachnick WJ, Schmidtmann ET, et al. Sympatry in the *Culicoides variipennis* complex (Diptera: Ceratopogonidae): a taxonomic reassessment. *Journal of medical entomology*. 2000;37(1):65-76.
155. Raich TJ, Archer JL, Robertson MA, et al. Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *Journal of medical entomology*. 1993;30(1):228-232.
156. Dallas JF, Cruickshank RH, Linton YM, et al. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Medical and Veterinary Entomology*. 2003;17(4):379-387.
157. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, et al. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*. 2006;20(2):229-238.
158. Linton YM, Mordue (Luntz) AJ, Cruickshank RH, et al. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical and Veterinary Entomology*. 2002; 16:139-146.
159. Mathieu B, Perrin A, Baldet T, et al. Molecular identification of Western European species of *obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *Journal of medical entomology*. 2007;44(6):1019-1025.
160. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, et al. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*. 2007;124(1-2):82-94.
161. Pages N, Munoz-Munoz F, Talavera S, et al. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology*. 2009;165(3-4):298-310.
162. Sebastiani F, Meiswinkel R, Gomulski LM, et al. Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol Ecol*. 2001;10(7):1773-1786.
163. Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, et al. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and veterinary entomology*. 2006;20(2):219-228.
164. Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, et al. Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Medical and Veterinary Entomology*. 2009;23(1):47-55.
165. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, et al. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*. 2005;30:619- 631.
166. Beckenbach AT, Borkent A. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003;27:21-35.

167. Almeida EA, Danforth BN. Phylogeny of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae) inferred from four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009;50(2):290-309.
168. Moulton JK, Wiegmann BM. Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2004;31(1):363-378.
169. Wild AL, Maddison DR. Evaluating nuclear protein-coding genes for phylogenetic utility in beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008;48(3):877-891.
170. Khalaf KT. The speciation of the genus *Culicoides* (Diptera, Heleidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 1954;47:34-51.
171. Fox I. A catalogue of the bloodsucking midges of the Americas (*Culicoides*, *Leptoconops*, and *Lasiohelea*) with keys to the subgenera and Nearctic species, a geographic index, and bibliography. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 1955;39:214-285.
172. Boorman J. British *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): notes on distribution and biology. *Entomologist's Gazette*. 1986;37:253-266.
173. Lien JC, Lin CC, Weng MH. A revision of the genus *Culicoides* Latreille 1809, *Haemophoructus* Macfie 1925, and *Monoculicoides* Khalaf 1954 (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Taiwan Museum*. 1998;51:33-70.
174. Wada Y, Kitaoka S. Preliminary arrangement of Japanese *Culicoides* into groups (Diptera: Ceratopogonidae). *Tropical Medicine*. 1977;19:169-176.
175. Nielsen SA, Kristensen M. Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia. *Parasites & Vectors*. 2015;8:151.
176. Lane RP. A quantitative analysis of wing pattern in the *Culicoides pulicaris* species group (Diptera: Ceratopogonidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 1981;72:21-41.
177. Remm H. Ceratopogonidae. *Catalogue of Palaearctic Diptera*. 1988;3:11-110.
178. Lassen SB, Nielsen SA, Skovgard H, et al. Molecular differentiation of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the subgenus *Culicoides* Latreille in Denmark. *Parasitology Research*. 2012;110(5):1765-1771.
179. Dik B, Yağcı S, Linton YM. A review of species diversity and distribution of *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *Journal of Natural History*. 2006;40(32/34):1947-1967.
180. Simon C, Frati F, Bechenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am*. 1994;87:651-701.
181. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649.
182. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. 2012;9(8):772.

183. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001;17(8):754-755.
184. Carpenter S, Groschup MH, Garros C, et al. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Research*. 2013;100(1):102-113.
185. Linley JR. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *Journal of medical entomology*. 1985;22(6):589-599.
186. Elbers ARW, Meiswinkel R, van Weezep E, et al. Schmallenberg Virus in *Culicoides* spp. Biting Midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(1):106-109.
187. Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, et al. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2015;30:249-266.
188. Jones RH, Akey DH, Loomis EC, et al. WHO/FAO Working Team Report: entomology. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1985;178:661-664.
189. Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology*. 2009;17(4):172-178.
190. Augot D, Sauvage F, Jouet D, et al. 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*. 2010;10(5):629-637.
191. Cetre-Sossah C, Baldet T, Delecolle JC, et al. 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*. 2004;35(3):325-337.
192. Dik B, Muz D, Muz MN, et al. 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*. 2014;113(11):4225-4232.
193. Dik B, Yavru S, Uslu U, et al. Determination of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) as suspect vectors of Epizootic Haemorrhagic Disease and Blue-tongue viruses in southern and western Anatolia by RT-PCR. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2012;163(11):505-510.
194. Meiswinkel R, Goffredo M, Leijds P, et al. The *Culicoides* 'snapshot': a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008;87(1-2):98-118.