

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**ORTA KIZILIRMAK HAVZASINDA SORUN OLUŞTURAN
KARASİNEK (DİPTERA: SİMULİİDAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KLASİFİKASYONU VE VEKTÖRLÜK POTANSİYELLERİNİN REAL
TİME PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TDA-2013-4292

Dış Kaynaklı Projeler İçin Acil İhtiyaç Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

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

Araştırmacılar:

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

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

Ocak 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, bu çalışmayı 111O426 koduyla destekleyen TÜBİTAK'a ve TDA-2013-4292 koduyla destekleyen ERÜBAP Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
KAPAK	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Simulium</i> Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri	3
2.2. <i>Simulium</i> Türlerinin Morfolojisi	5
2.3. Yaşam Döngüsü	6
2.3.1. Yumurta	6
2.3.2. Larva	6
2.3.3. Pupa	7
2.3.4. Ergin.	7
2.4. Üreme.	7
2.5. Beslenme	7
2.6. <i>Simulium</i> Türlerinin Vektörlük Roller ve Çevresel Önemleri	8
2.7. Türkiye’de Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Çalışmalar	9
2.8. Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar	10
2.9. <i>Simulium</i> Türleri İle Mücadele	11
2.9.1. Orta Kızılırmak Havzasında Afet Boyutunda Yaşanan <i>Simulium</i> Enfestasyonu	11
2.9.2. Orta Kızılırmak Havzasının Yapısı Bölgenin Genel Yapısı	12
2.9.3. Orta Kızılırmak Havzasında <i>Simulium</i> spp. Salgınlarının Nedenleri	13
2.9.4. <i>Simulium</i> Salgınlarının Bölgeye Etkileri Turizm Üzerine Etkileri	14
2.9.5. Hayvancılık Üzerine Etkileri	15
2.9.6. Tarımsal Faaliyetler Üzerine Etkileri.....	15
2.9.7. Halk Sağlığı Üzerine Etkileri.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Araştırma Sahası ve Simuliid örneklerinin toplanması	17
3.2. Laboratuar Çalışmaları	18

3.2.1. Morfolojik İdentifikasyon	18
3.2.2. Kromozomal Analiz.....	18
3.2.3. Genomik DNA İzolasyonu.....	18
3.2.4. Larva örneklerinin DNA amplifikasyonu ve Elektroforezi	19
3.2.5. Ergin dişi simuliid örneklerinin kan beslenmesinde konak spekturumunun PCR ile belirlenmesi	19
3.2.6. Ergin dişi simuliid örneklerinde patojenlerin Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) ile belirlenmesi	20
3.2.7. Sekans ve Filogenetik Analizler	21
3.2.7.1. Simuliid larvalarının ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin sekansı, klonlama ve filogenetik analizleri.....	21
3.2.7.2. Ergin dişi simuliid örneklerinin kan beslenmesinde konak türünün sekans analizleri ile belirlenmesi	22
3.2.7.3. Ergin dişi simuliid örneklerinde belirlenen patojenlerin sekansı ve filogenetik analizi	23
3.3. İstatistiksel Analiz.....	23
4. BULGULAR	25
4.1. Simuliid larvalarının dağılımı ve ekolojik faktörlerle ilişkisi.....	25
4.2. Morfolojik ve Kromozomal İdentifikasyon Sonuçları	37
4.2.1. Morfolojik analiz	37
4.2.2. Kromozom analizi	43
4.3. Simuliid larvalarının mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) ve nükleer internal transcript spacer 2 (ITS-2/28S) gen bölgelerinin sekans analizi ve moleküler Karakterizasyonu	43
4.3.1. Mt-COI gen bölgesi sekansları ve filogenetik analizi.....	43
4.3.2. ITS-2/28S gen bölgesi sekansları ve filogenetik analizi	56
4.3.3. Ergin dişi simuliid örneklerinin beslenme eğilimlerinde konak spekturumu ve türleri.....	66
4.3.4. Ergin dişi simuliid örneklerinde belirlenen patojenler ve filogenetik analizleri	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	88
6. KAYNAKLAR.....	101

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 3.1. <i>Leucocytozoon</i> , <i>Onchocerca</i> ve <i>Mansonella</i> türleri için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan problemleri	20
Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri.....	26
Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri.....	31
Tablo 4.3. 2012 yılı için aylık olarak ölçülen pH, su sıcaklığı ve nisbi nem değerleri ile larva sayıları arasındaki istatistiksel ilişki (Independent-Samples T Test).....	37
Tablo 4.4. 2013 yılı için aylık olarak ölçülen pH, su sıcaklığı ve nisbi nem değerleri ile larva sayıları arasındaki istatistiksel ilişki (Independent-Samples T Test).....	37
Tablo 4.5. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik ve kromozomal identifikasyon sonuçları	38
Tablo 4.6. Araştırma yöresinde Mt-COI gen bölgesine göre filogenetik analizi yapılan izolatların dahil olduğu tür, izolasyon yeri, DNA izolasyon kaynakları ve GenBank aksesyon numaraları	45
Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları	46
Tablo 4.8. mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları	48
Tablo 4.9. Araştırma yöresinde ITS2-28S gen bölgesine göre filogenetik analizi yapılan izolatların dahil olduğu tür, izolasyon yeri, DNA izolasyon kaynakları ile GenBank aksesyon numaraları	57
Tablo 4.10. Multiple alignmentları yapılan izolatların complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları	58
Tablo 4.11. Complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesine göre incelenen izolatların pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları	60
Tablo 4.12. Bireysel olarak incelenen ergin dişi simuliidlerin memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitiflikleri	67
Tablo 4.13. Memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerin Simuliid türlerine göre konak türü dağılımı	71
Tablo 4.14. Ergin dişi simuliid örneklerinde Real Time PCR ile belirlenen patojen türleri	76
Tablo 4.15. Filogenetik analizi yapılan <i>Leucocytozoon</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri, izolasyon konağı ile GenBank aksesyon numaraları	80
Tablo 4.16. <i>Leucocytozoon</i> izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları	81
Tablo 4.17. Mt-cox1 gen bölgesi filogenetik analizi yapılan <i>Onchocerca</i> izolatlarının dahil olduğu tür, izolasyon yeri, izolasyon konağı ile GenBank aksesyon numaraları	84
Tablo 4.18. <i>Onchocerca</i> izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları..	85

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 2.1. <i>Simuliid</i> soylarının sistematikteki yeri..	4
Şekil 2.2. <i>Simulium</i> soyundaki alt soylar..	5
Şekil 2.3. Kızılırmak çevresinde İnsan ve Hayvanlara saldıran <i>Simulium</i> Türleri (Orijinal)	12
Şekil 2.4. <i>Simulium</i> spp. salgınının görüldüğü Orta Kızılırmak Havzası..	13
Şekil 3.1. Araştırma sahası ..	17
Şekil 4.1. 2012 yılında toplanan larva sayılarının aylara göre dağılımı.	36
Şekil 4.2. 2013 yılında toplanan larva sayılarının aylara göre dağılımı	36
Şekil 4.3. <i>Simulium</i> larvası (Orijinal).....	39
Şekil 4.4. Cephalic apotome'nin posterior bölümünde genişleme ve ecdysial çizgi (Orijinal).....	39
Şekil 4.5. Ventral papil yokluğu (Orijinal).....	40
Şekil 4.6. Hypostomdaki dişler (Orijinal).....	40
Şekil 4.7. Posterior çengel halkası (Orijinal).....	41
Şekil 4.8. Solungaç histoblastı (Orijinal).....	41
Şekil 4.9. Solungaç histoblastı filamentleri (<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>) (Orijinal)	42
Şekil 4.10. Solungaç histoblastı filamentleri (<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>) (Orijinal).....	42
Şekil 4.11. <i>Simuliid</i> larvalarının parsiyel mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü.....	44
Şekil 4.12. <i>Simuliid</i> larvalarının klonlanan ITS2/ 28S ve mt-COI gen bölgeleri plasmidlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası insertlerin jel elektroforezde görünümü	44
Şekil 4.13. Sekans analizi yapılan <i>Simulium</i> izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları.....	53
Şekil 4.14. <i>Simulium Wilhelmsia</i> altsoyundaki izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.	55
Şekil 4.15. <i>Simuliid</i> larvalarının complete ITS2 ve parsiyel 28S ribozomal gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası bazı örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1: No DNA; 2,3: <i>S. Wilhelmsia lineatum</i> ; 4,5: <i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	56
Şekil 4.16. Sekans analizi yapılan <i>Simulium</i> izolatlarının complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları	64
Şekil 4.17. <i>Simulium</i> izolatlarının complete ITS2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri	65
Şekil 4.18. Ergin dişi <i>Simulium</i> sp. (Orijinal).....	66
Şekil 4.19. Ergin dişi <i>Simulium</i> sp. göz yapısı (Orijinal).....	66
Şekil 4.20. Ergin dişi <i>simuliid</i> lerde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı amplikonların jel elektroforezde görünümü.....	67

Şekil 4.21. Ergin dişi simuliidlerde memeli mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucunun jel elektroforezde görünümü	68
Şekil 4.22. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen bazı ergin dişi simuliidlerin (ES1-ES4) larval mt-COI sekansları baz alınarak tür tayinlerinin filoegentik ağaç üzerinde görünümü	69
Şekil 4. 23. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen bazı ergin dişi simuliidlerin (ES5-ES8) ITS-2 sekansları baz alınarak tür tayinlerinin filoegentik ağaç üzerinde görünümü	70
Şekil 4.24. Kanatlı konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri	72
Şekil 4.25. Memeli konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri	73
Şekil 4.26. <i>Leucocytozoon</i> türlerinin mitokondriyal cytochrome b (cytb) gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (Lcytbf ve Lcytbr) çeşitli <i>Leucocytozoon</i> , <i>Plasmodium</i> ve <i>Haemoproteus</i> izolatlarına ait sekans dizileri ile alignmentları	74
Şekil 4.27. <i>Onchocerca</i> türlerinin ITS2 gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (OnITS2f, OnITS2r) Filarioidea üst ailesindeki çeşitli türlere ait izolatların sekans dizileri ile alignmentları.	75
Şekil 4.28. <i>M. ozzardi</i> MSP gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (mansf ve mansr) çeşitli izolatlara ait sekans dizileri ile alignmentları.....	75
Şekil 4.29. Ergin dişi simuliidlere ait DNA örneklerinin <i>Leucocytozoon</i> spp. yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları	77
Şekil 4.30. Ergin dişi simuliidlere ait DNA örneklerinin <i>Onchocerca</i> spp. yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları	77
Şekil 4.31. İncelemesi yapılan ergin sineklere ait genomik DNA'ların <i>M. ozzardi</i> yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları	78
Şekil 4.32. <i>Leucocytozoon</i> sp. izolatlarının mt-cytb gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel elektroforezde görünümü	79
Şekil 4.33. <i>Onchocerca</i> sp. izolatının mt-cox1 gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel elektroforezde görünümü	79
Şekil 4.34. Sekans analizi yapılan <i>Leucocytozoon</i> izolatlarının parsiyel mt-cytb gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları	82
Şekil 4.35. <i>Leucocytozoon</i> sp. izolatlarının parsiyel mt-ctb gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri.....	83
Şekil 4.36. Sekans analizi yapılan <i>Onchocerca</i> izolatlarının parsiyel mt-cox1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları.....	86
Şekil 4.37. <i>Onchocerca</i> sp. TrOnchSim1 izolatının parsiyel mt-ctb gen bölgesine göre diğer <i>Onchocerca</i> tür ve izolatlarıyla filogenetik ilişkisi	87

**Orta Kızılırmak Havzasında Sorun Oluşturan Karasinek (*Diptera: Simuliidae*) Türlerinin
Moleküler Klasifikasyonu ve Vektörlük Potansiyellerinin Real Time PCR ile
Araştırılması**

ÖZET

Bu çalışmada Ocak 2012-Kasım 2013 arasında 979 adet simuliid larva ve 610 adet ergin dişi simuliid örnekleme yapılmıştır. Morfolojik analizlerle larvaların 329'u *Simulium Wilhelmsia lineatum*, 190'ı *S. Wilhelmsia balcanicum*, 460'ı *S. Wilhelmsia* spp. olarak tanımlanmıştır. Kromozomal analizlerle 672 larvanın, 419'u *S. lineatum*, 253'ü *S. balcanicum* belirlenmiştir. Simuliidlerde ribosomal internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu amacıyla larva örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonları yapılmış, PCR ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Kan beslenmesinde konak eğiliminin belirlenmesi amacıyla 150 ergin dişi simuliid örneğinden bireysel genomik DNA izolasyonu yapılmış, kanatlı ve memeli mitokondrial cytochrome b (mt-cytb) gen bölgesi yönünden PCR, klonlama ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Ergin dişi simuliid örneklerinde patojenlerinin araştırılmasında 150 bireysel örneğin yanında 46 havuzdan (10 örnek/havuz) DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolatlarda *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* türlerinin araştırılmasında sybergreen tabanlı Real Time PCR kullanılmıştır. Mt-COI gen bölgesine göre *S. balcanicum* izolatları arasında %1,1±0,2, *S. lineatum* izolatları arasında %2,1±0,4 ve *S. equinum* izolatları arasında ise %0,9±0,3; ITS-2 gen bölgesine göre *S. balcanicum* izolatlarının %100 homoloji gösterdiği, *S. lineatum* izolatları arasında %0,1±0,1, *S. equinum* izolatları arasında ise %0,2±0,2 genetik farklılık belirlenmiştir. Bireysel incelenen 150 ergin dişi simuliid örneğinden 23'ü (%45,1) memeli, 11'i (%21,6) kanatlı, 17'si (%33,3) ise kanatlı+memeli kanı pozitif belirlenmiştir. *S. lineatum* ve *S. balcanicum* için beslenme eğilimlerinde memeli tercihi istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Real Time PCR analizleri yapılan 150 adet bireysel ergin dişi simuliid örneğinin birinde *Leucocytozoon* sp., 46 havuzun üçünde *Leucocytozoon* sp. ve dördünde *Onchocerca* sp. pozitifliği belirlenirken *Mansonella* sp.'ye rastlanılmamıştır. Sekans ve filogenetik analizi yapılan iki *Leucocytozoon* sp. izolatının yüksek oranda identik olduğu (%99,8), Türkiye ve Amerika Birleşik Devletleri'nde baykuş türlerinden bildirilen bazı izolatlarla da %99,2-99,8 identiklik gösterdikleri tespit edilmiştir. Filogenetik analizi yapılan bir *Onchocerca* sp. izolatının Kamerun'da *Simulium damnosum*'dan izole edilmiş bazı *Onchocerca* sp. izolatlarıyla yüksek identiklik (%99,4-99,5) gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Karasinek, Simuliidae, Morfolojik ve moleküler klasifikasyon, Vektörlük potansiyeli, Real Time PCR

The Molecular Classification of Black fly (*Diptera: Simuliidae*) Species which Pose a Problem in Central Kızılırmak Basin and the Investigation of Their Vector Potentials by Real Time PCR

ABSTRACT

In this study, 979 simuliid larvae and 610 adult female samplings were performed between January 2012 and November 2013. According to morphological analyses of larvae, 329 were identified as *Simulium Wilhelmsia lineatum*, 190 as *S. Wilhelmsia balcanicum*, and 460 as *S. Wilhelmsia* spp. 419 and 253 out of 672 larvae specimens were identified as *S. lineatum* and *S. balcanicum* by chromosomal analyses. DNA extractions of larvae samples were conducted, PCR and sequence analyzes were utilized to determine molecular characterization of internal transcript spacer 2 (ITS-2) and mitochondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gene regions. DNA isolations were performed on individually 150 adult female simuliid specimens, PCR, cloning and sequence analyses were conducted with respect avian and mammalian mitochondrial cytochrome b (mt-cytb) gene region to determine blood-meal identifications. DNA extractions were performed further on 46 pools (10 specimens/pool) for investigation of pathogens in adult female simuliid specimens. Sybergreen Real Time PCR analyses were performed for investigation of *Leucocytozoon*, *Onchocerca*, and *Mansonella* species in isolates. Genetic diversities were determined as $1.1\pm0.2\%$, $2.1\pm0.4\%$ and $0.9\pm0.3\%$ among isolates from *S. balcanicum*, *S. lineatum* and *S. equinum* for Mt-COI gene region. There was 100.0% homology among *S. balcanicum* isolates while $0.1\pm0.1\%$ and $0.2\pm0.2\%$ genetic differences were determined among isolates under *S. lineatum* and *S. equinum* for ITS-2 gen region. 23, 11 and 17 out of 150 individual adult female simuliid specimens were found to be positive for mammalian, avian and avian+mammalian bloodmeal, respectively. Mammalian host for bloodfeeding was found to be statistically significant ($p<0.05$) for both *S. lineatum* and *S. balcanicum*. According to the Real Time PCR analyses, one of the 150 individual adult female simuliid specimens and three of the 46 pools were found positive for *Leucocytozoon* sp. Four out of 46 pools were also determined positive for *Onchocerca* sp. while no *Mansonella* sp. positivity was detected in the examined samples. Two *Leucocytozoon* sp. isolates which were sequenced and phylogenetically analyzed were found highly identical (99.8%) to each other and also showed high identity (99.2-99.8%) with the isolates obtained from some owl species in Turkey and USA. One phylogenetically analyzed *Onchocerca* sp. isolate exhibited the highest identity (99.4-99.5%) to the *Onchocerca* sp. isolates obtained from *Simulium damnosum* in Cameroon.

Keywords: Black fly, Simuliidae, Morphological and molecular classification, Vector potentials, Real Time PCR

1. GİRİŞ

Diptera dizisi, Nematocera dizialtı ve Simuliidae ailesinde yer alan karasinekler hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit etmelerinin yanında ekonomik ve ekolojik bakımdan da önemli insektlerdir. Orta Kızılırmak Havzası'nda Yamula Barajı'nın 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte Kızılırmak Nehri'nin Kayseri ve Nevşehir illerinden geçen yaklaşık 150 kilometrelik kısmında *Simulium* spp. popülasyonunda afet boyutunda büyük bir artış meydana gelmiş ve bölgede *Simulium* spp. salgını baş göstermiştir. Kayseri Valiliği'nin koordinatörlüğünde 2007 yılında başlatılan mücadele projesi ile karasinek sayısındaki artış kontrol altına alınmış ve sonrasında Avanos-Gölşehir arasında kurulan 3 adet ve Bayram Hacılı-Gölşehir arasında kurulan 2 adet mikro hidroelektrik santrallerinin (HES) inşasına bağlı olarak nehir yatağında vejetasyonun bozulması, çoğu alanda nehrin göletler oluşturması ve sudaki oksijen miktarında azalmasına bağlı olarak *Simulium* popülasyonu oldukça azalmıştır. Ancak biotik potansiyeli yüksek olan bu sineklerin oluşturdukları tehdit devam etmekte olup uygun çevresel koşulların tekrar yerine gelmesi ve etkin mücadelenin bırakılması neticesinde popülasyonun artarak tekrar büyük sorunlara yol açabileceği göz ardı edilmemelidir. Araştırma yöresinde yürütülen mücadeleye eş zamanlı olarak, probleme yol açan Simuliidae tür veya türlerinin belirlenmesine yönelik moleküler tabanlı olan bu araştırma projesi hazırlanmıştır. Böyle bir araştırma Türkiye'de *Simulium* türleri üzerine ilk kez gerçekleştirilmiştir. Simuliidae ailesindeki türlerin morfolojik identifikasyonları oldukça kompleks olup, beraberinde bir takım teşhis hatalarına yol açabilmektedir. Aynı zamanda birçok simuliid türünde görülebilen cryptic ve kardeş (sibling) türlerin belirlenmesi morfometrik analizlerle mümkün değildir. Bu açıdan simuliid türlerin identifikasyon ve klasifikasyonunun yanında cryptic ve sibling türlerin belirlenmesinde sitogenetik kromozomal analizler ve çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgelerinin filogenetik analizleri temeli oluşturmaktadır. Bununla birlikte Orta Kızılırmak Havzasının Kapadokya içerisinde yer alması ve yörenin çok önemli bir turizm potansiyeline sahip olması, dünyanın hemen her bölgesinden yılda yaklaşık üç milyon civarında yabancı turistlerin yöreye gelmesi, bu sineklerin vektörlüğünü yaptığı çeşitli patojenler ve oluşturdukları risk potansiyeli açısından da önemlidir. Bu konuda da bugüne kadar yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

TÜBİTAK tarafından 111 O 426 kod numarası ile desteklenen bu araştırma projesiyle, yörede sorun teşkil eden simuliid larva örneklerinin morfolojik teşhislerini takiben, çeşitli mitokondriyal ve ribozomal gen bölgelerinin moleküler analizleri yapılmış, moleküler karakterleri ortaya konmuş ve filogenileri yapılarak moleküler klasifikasyonları

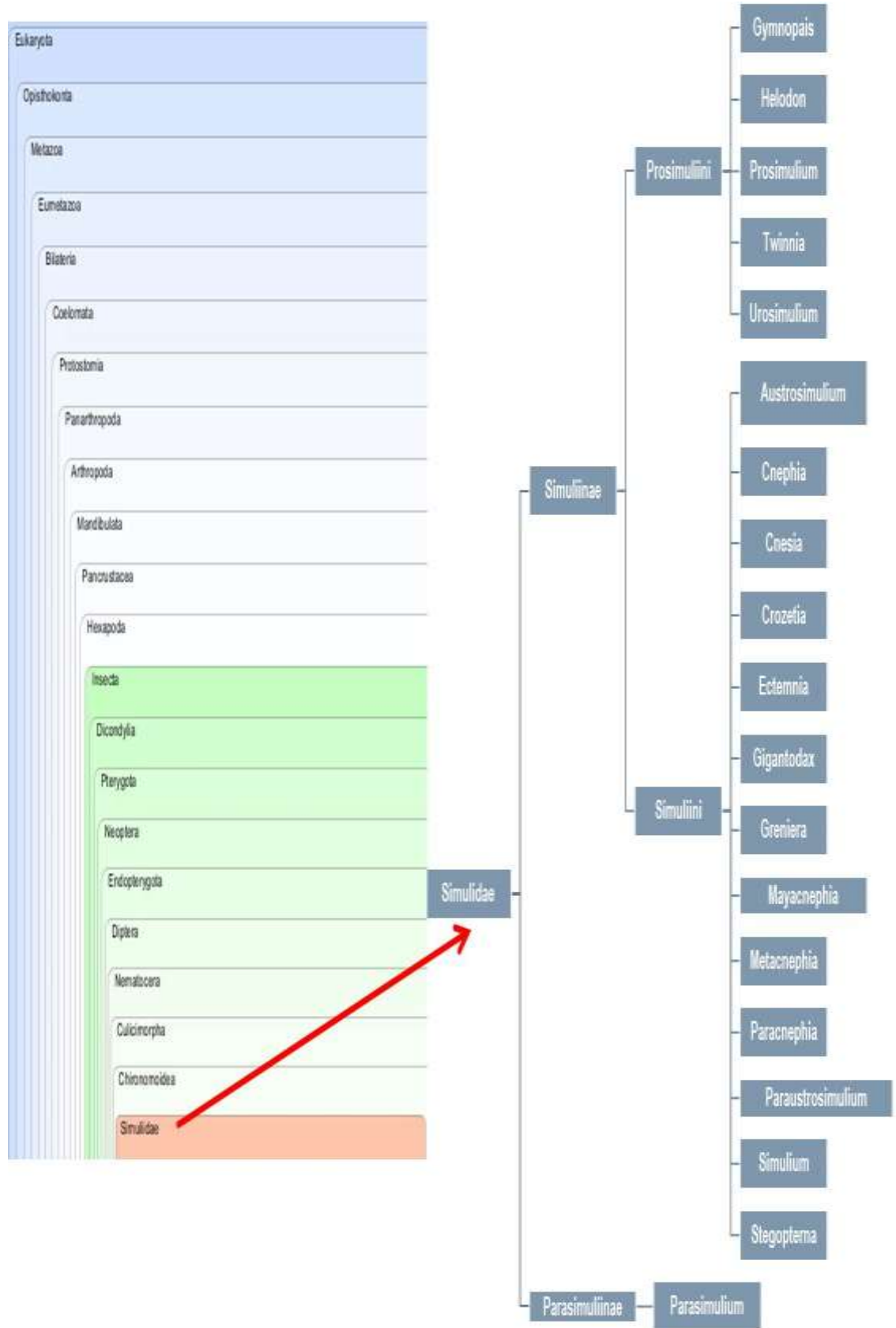
sağlanmıştır. Araştırma yöresindeki simuliid tür ve suş kompozisyonları ortaya konmuş; DNA dizi analizi sonucu elde edilen gen dizilimleri Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak GenBank'a kayıt edilmiştir. Bunun yanında ergin dişilerin olası enfeksiyözleri bulaştırmaları açısından risk potansiyellerini ortaya koymak amacıyla beslenme eğilimleri moleküler olarak saptanmıştır. Ayrıca ergin dişi simuliid örneklerinde olası enfeksiyöz patojenler (*Onchocerca* sp., *Mansonella* sp., *Leucoctozoon* sp.) sybergreen Real Time PCR tekniği ile araştırılmış ve risk potansiyelleri belirlenmiştir. Pozitif saptanan örneklerde izolatların moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Simulium* Türlerinin Sınıflandırmadaki Yeri

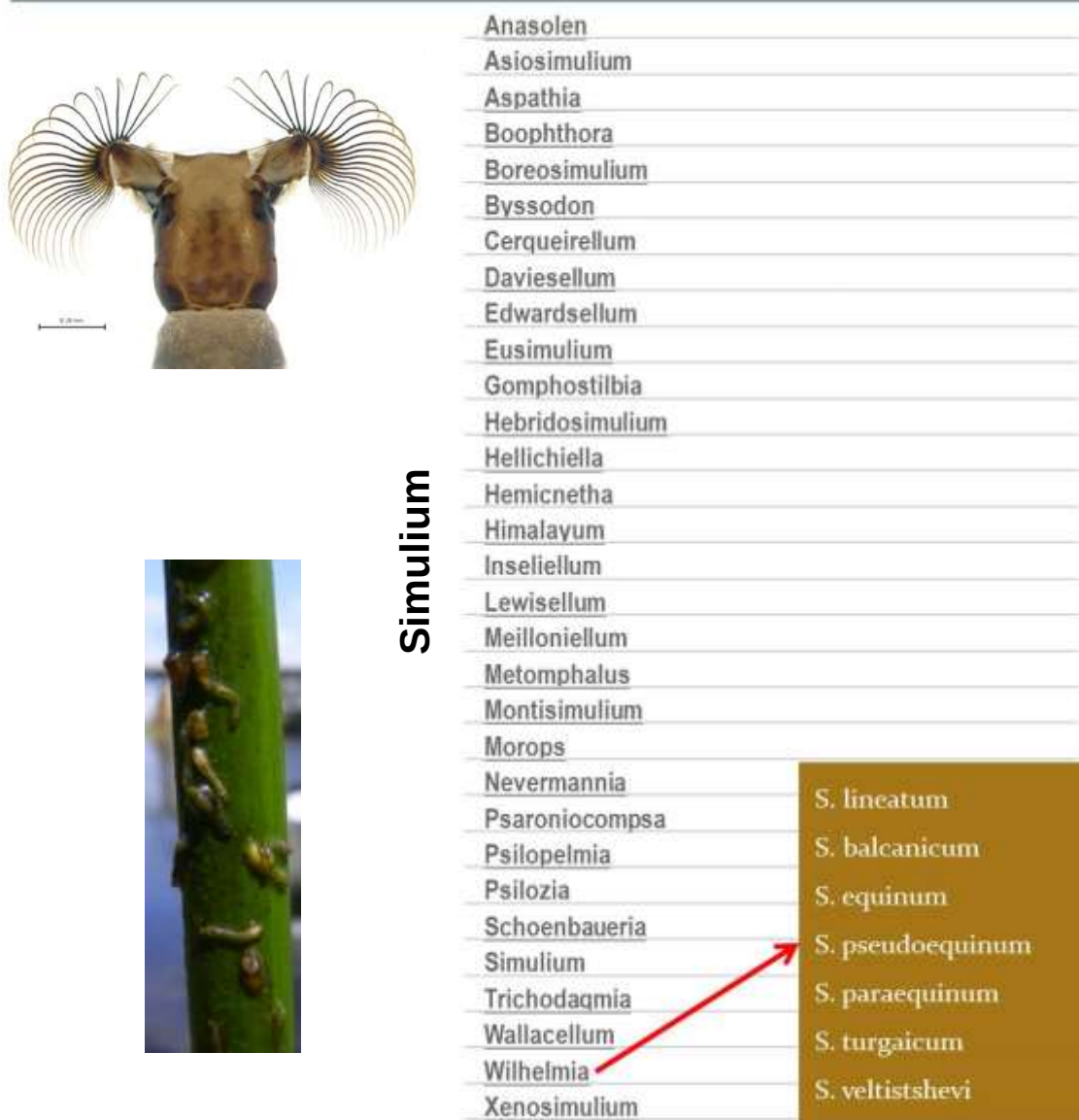
Dünyada yaklaşık 1750 türü kapsayan *Diptera* dizisi içerisinde *Nematocera* dizi bölümünde yer alan ve dünyanın her bölgesinde görülebilen önemli ailelerden birisi de *Simulidae* (Karasinekler, Blackflies) ailesidir. Simulidae ailesinde bu güne kadar 2101'i yaşayan, 12'si ortadan kalkmış (fosil) toplam 2113 tür tarif edilmiş ve bunların 1697'si *Simulium* soyunda yer almıştır (Adler ve Crosskey, 2011). Bu türlerin çoğunda dişilere dünyanın çeşitli bölgelerinde yerel halk tarafından değişik isimler [Buffalo Gnats (İngiltere), mawi (Afrika), piom veya borrachudos (Brezilya), potu (Hindistan), jejenes (Venezuela), bocones (Kosta Rika), rodadores (Küba), karasinek, kanbur sinek, mucuk veya üvez (Türkiye)] verilmiştir.

Simulium türlerinin Systema Naturae 2000'e göre sistematikteki yeri Şekil 2.1-Şekil 2.2'de verilmiştir (Adler ve Crosskey, 2011).



Şekil 2.1. Simuliid soylarının sistematikteki yeri

I



Şekil 2.2. Simulium soyundaki alt soylar

2.2. Simulium Türlerinin Morfolojisi

Simuliidler; küçük, esmer, kalın vücutlu, kambur sırtlı nematocerlerdir. Simuliidler dışarıda yaşarlar (exophilic) ve dışarıda beslenirler (exophagic). Kanat uzunlukları 1,5-6 mm ve genellikle gündüzcü sineklerdir. Dişilerde tek tek elementlerden oluşmuş (ommatidia) olan gözler küçük ve antenlerin dorsalinde ayrı olarak yer almıştır. Erkeklerde ise gözler daha geniş ve antenlerin dorsalinde bitişiktirler. Antenler her iki cinsten de aynıdır ve genellikle 11 segmentlidirler. Palpler 5 segmentli olup kısa olan hortumdan oldukça uzundurlar. Kanatlar kısa, geniş, pulsuz, beneksiz ve parlaktır. Ven

dolaşımı kanadın ön kenarı boyunca uzanan iyi gelişmiş radial venlerle karakterizedir. Zayıf görünümüne rağmen kanatlar oldukça güçlüdürler. Bu sayede uzak mesafelere uçuş yeteneği kazanmışlardır. Durgun havalarda 100 km'den fazla uçabilirler. Etkin uçuş alanları 18 kilometrelik çap içerisinde (Adler vd., 2004; Myburgh ve Nevill, 2013).

2.3. Yaşam Döngüsü

Karasineklerin pek çok türünde yaşam siklusunda farklılıklar vardır. Simuliidlerin larva dağılımına etki eden en önemli etkenler mevsim, akıntı hızı, madde tipi ve su derinliğidir. Yumurtaları yaygın olarak 30-800 arasında, ortalama 200-300'lük gruplar halinde akan suların kenarlarına ya da direkt olarak suyun içine bırakılır (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.3.1. Yumurta

Yumurtalar, önce krem-beyaz, sonra siyaha yakın bir renge dönüşürler. 100-400 µm uzunluğunda ve oval-üç köşelidir. Yüzeyleri düzdür. Gözle görülebilir yumurta kabuğu iç yumurta membranı ve endokoryondur ya da çok az koryonik plastron gelişmiştir (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006). Oksijen basıncının yüksek olduğu akıntılı suların yüzeylerine bırakılan yumurtalar da iyi gelişmiş bir plastrona gereksinim yoktur. Sonbaharın sonlarında bırakılan yumurtalardan takip eden baharda su sıcaklığı yükselene kadar larva çıkışı olmaz. Simuliid yumurtaları kuruluğa karşı hassastırlar (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.3.2. Larva

Yumurtalar, larva üretmek için açılırlar. Hava sıcaklığı 20-22°C iken 4-5 günde yumurtadan larva çıkar. Larva kuyruk emicisi (*sucker*) ile taş, kütük veya su bitkileri gibi herhangi bir objeye tutunur ve ipeksi ipliği ile ıslanmaktan korunur. Larva, kendi yaşamını sürdürüp yerleşebileceği bir yer bulur ve orayı ipek bir ağ ile (zarla) örmeye devam eder. Aynı zamanda larvalar maddelere tutunmak için bol miktarda protein yapıştırıcı da üretirler. Larvalar su yüzeyine yakın kalırlar. Hızlı akımın olduğu çok büyük nehirlerde larvalar birkaç metre derinlikte bulunabilirler. Larvalar bir çift basit göz, sklerozite başı ve kum saati gibi uzamış vücuda sahiptir. Vücutları 90°-180° bükülme hareketi yapar. Baş kısmında yelpaze taşımaktadır. Larvalar genellikle 10-100 µm büyüklüğündeki organik besinlerle (mikroorganizmalar, Örn: Bakteriler) beslenirler. Bunlar su akımının hızlandığı yerlerde boldur (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.3.3. Pupa

Son larva döneminden sonraki gelişim evresidir. Pupanın başı ve toraksı tek bir parça halinde yani sefalotoraks içinde birleşmiştir ve segmentli bir karın bulunmaktadır. Toraks, dikenleri ve koza iplikleri ile ilgili kancaları oluşturur ve pupa yerinde kalır. Sefalotoraks kozanın akım yönüne doğru yer değiştiren bir çift uzamış dallara ayrılmış solungaçlar taşır. Beslenmeyen pupa, içinde erişkin geliştiğinden gitgide kararır. Pupa kabukları dağıldığında erişkin hava akımıyla sürüklenir ve hemen uçmaya başlar (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.3.4. Ergin

Pupadan ergin sineklerin çıkması, genellikle ve çoğunlukla ışık ve ısıya bağlı olarak gündüz olmaktadır. Pupadan erginlerin çıkışı, hava sıcaklığı 24-28 °C aralığında ve su sıcaklığı en düşük 8 °C iken olmakta ve 9.00-12.00 saatleri arasında pik seviyeye ulaşmaktadır (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.4. Üreme

Ergin sinekler üreme yerlerinde birbirlerine yaklaşırlar ve çiftleşme yerde şekillenir. Erkek simulidler dişileri 50 cm'den tanıyabilir ve çiftleşmek için onlara yönelirler. Döllenen dişi simulid 30-800 adet yumurta bırakabilir. Dölllenmiş dişiler sürü halinde gün batımı ve karanlığın başladığı zaman aralığındaki kısa sürede yumurtalarını akışkan olan su üzerindeki otlara bırakırlar. Bazı türler cm²'ye 2000-3000 yumurta bırakırlar. Kara sinekler sadece hızlı akan sularda, barajlardan bırakılan sularda, özellikle hidro elektrik barajlarında tribünlerden çıkan sularda ve dağlardan nehirlerle akan su kesimlerinde üremektedirler (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.5. Beslenme

Simulium spp. dişileri gündüzleri konaklarından kan emmek için saldırırlar. Bazı türler, vücudun burun, kulak ve göz gibi organlarına girmek isterler. Bu özellikleri insanları ve evcil hayvanları rahatsız eder. Erkekleri ise bitki özütü ile beslenirler. Dişi simulidlerin çoğu yumurtaların gelişimi için kan emmeye ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla insan ve birçok memeliden kan emebilirler. Erkekler ise bitki nektarı ile beslenirler. Bu sinekler özellikle gündüz 9.⁰⁰ - 17.⁰⁰ saatleri arasında maksimum aktivite gösterirler. Kan emen dişilerin ömrü 30 güne kadar uzarken bitki özütü ile beslenen erkekler ortalama 10 gün yaşarlar (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006).

2.6. *Simulium* Türlerinin Vektörlük Roller ve Çevresel Önemleri

Simuliidler bizzat kan emerek zarar vermeleri yanında, pek çok patojeni de naklederler. Bu şekilde patojenlere vektörlük yapmaları medikal ve veteriner önemlerini daha da artırmaktadır. Bu sinekler insan ve hayvanların ağız, burun delikleri, gözleri, kulakları başta olmak üzere vücudun değişik bölümlerine saldırarak rahatsızlık verirler. Çok az ses çıkarırlar ancak, aydınlanmış ortamlarda derhal derinin üzerine konarak kan emerler. Genellikle çok sayıda ortaya çıkarlar, kümes hayvanları ve diğer çiftlik hayvanlarına sürüler halinde saldırarak hayvanların solunum yollarını tıkayarak ve/veya toksinleri (similotoksikozis) ile ölümlere sebebiyet verebilirler. Bu sineklerin sokmaları oldukça irritatiftir. Vücudun açıkta kalan bölümlerini, özellikle yüz ve boyun bölgelerini sokarlar. Simulid karasinekler tarafından insanlara nakledilen en önemli parazitler *Onchocerca volvulus* ve *Mansonella ozzardi* türü nematodlardır. Bu türler, dünyanın Afrotropikal ve Netropikal bölgelerinde yaklaşık 17 milyon insanın yakalandığı “onchocerciasis veya nehir körlüğü” olarak bilinen hastalıktan sorumludurlar. Bunun yanında kanatlılara *Leucocytozoon* enfeksiyonunu bulaştırırlar. Simuliidler kan emerek yaptıkları parazitliğin yanında *Onchocerca volvulus*, *O. gutturosa*, *O. cervipedis*, *O. dukei*, *O. lienalis*, *O. ochengi*, *O. ramachandrini*, *O. tarcicola*, *Dirofilaria ursi*, *Splendidofilaria fallisensis*, *Mansonella ozzardi*, *Trypanosoma avium*, *Try. confusum*, *Try. corvi*, *Try. numidae*, *Leucocytozoon anatis*, *L. smithi*, *L. caulleryi*, *Hemoproteus nettionis* türleri gibi parazitlerin yanında çeşitli viral (Arbovirus) ve bakteriyel patojenlerin de vektörlüğünü yaparlar (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006; Adler ve Crosskey, 2011).

Çeşitli kan emici Diptera türlerinde beslenme için konak tercihi çeşitli enfeksiyözler için risk faktörlerinin ortaya konulmasında önemli olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla kanatlı, memeli ve diğer omurgalılara spesifik mitokondriyal gen bölgelerini çoğaltan primerler kullanılmaktadır (Kim vd., 2009; Imura vd., 2010).

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

anlaşılmasında korunumlu özel bir evrimsel öneme sahiptirler (Gray vd., 1999; Adler vd., 2004; Stoops ve Adler, 2006; Adler ve Crosskey, 2011).

2.7. Türkiye’de Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Çalışmalar

Türkiye’de günümüze kadar simuliid sinekler ve onların etkileri üzerine yapılmış kapsamlı çalışmalar çok sınırlıdır. Bununla birlikte, 1994 yılı ilkbaharında Erzurum’un bazı ilçelerinde sığırların günün güneşli saatlerinde küçük karasinek saldırıları sonucu yaklaşık 100 hayvanın öldüğü vakada, sığırlara saldıran ve ölüme sebep olan küçük karasineklerin Almanya’da yapılan laboratuvar teşhisleri sonucu *Tetisimulium bezini* (Corti) (= *T. condici* Baranov) (Diptera, Simuliidae) olduğu ortaya konmuştur (Özbek vd., 1995). Daha sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bir kadına ait idrar örneğinde *Simulium* sp. larvası bildirilmiştir (Akarsu vd., 2003). Türkiye’nin *Simulium* faunasına katkı sağlayacak sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiştir (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990; Clergue-Gazeau ve Kazancı, 1992; Özbek vd., 1995; Balık vd., 2002; Şirin ve Şahin, 2005; Crosskey ve Zwick, 2007; Zwick, 2007; Yılmaz vd., 2007; Kazancı ve Ertunç, 2008a,b; Ertunç vd., 2008; Ertunç, 2009; Kazancı ve Ertunç, 2010). Bu çalışmalardan Kazancı ve Clergue-Gazeau, (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990) Türkiye’de Simuliidae faunası üzerine ilk detaylı çalışmayı yapmışlar ve 22 tür (20’si yeni kayıt) rapor etmişlerdir. Takiben Clergue-Gazeau ve Kazancı, (1992) Türkiye’de 26 türü (7’si yeni kayıt) bildirmişlerdir. Balık vd., (2002), Dikili-Ayvalık yöresinde Yelköprü mağarası ve civarının sucül faunasının tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada *Eusimulium angustitarse*’yi rapor etmişlerdir. Şirin ve Şahin (2005), Sakarya Nehir Havzası’nda 23 türü (10’u yeni kayıt) rapor etmişlerdir. Crosskey ve Zwick (2007), Türkiye’nin Anadolu bölümünde 9 yeni türü tarif etmişlerdir. Yine Zwick (2007), daha önce kaydedilmiş türlerin yeni istasyonlardan kayıtlarını vermiştir. Kazancı ve Ertunç (2008a), Türkiye Simuliidae faunasına ilişkin 19 türü (5’i yeni kayıt) ve bu türlerin bazı ekolojik özelliklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (2008b), Türkiye’nin kuzey, batı ve güneyinden topladıkları örneklerde 15 tür (5’i yeni kayıt) tanımlamışlardır. Ertunç vd., (2008), Yedi Göller Milli Parkı’nda Simuliidae faunası üzerine yaptıkları araştırmada 7 tür tanımlamışlardır. Ertunç (2009), Türkiye’nin batısındaki bazı akarsu sistemlerinin (Köyceğiz Gölü çevresi, Büyük Menderes Nehri çevresi ve Yedigöller Milli Parkı) Simuliidae faunası üzerine yaptığı çalışmada 1 alt familyaya ait 2 cins, 5 alt cins ve 17 tür saptamıştır. Kazancı ve Ertunç (2010), Yeşilırmak Nehir Havzası’nın Simuliidae faunasını ve Simuliidae türlerinin su kalitesi ile ilişkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 10 tür (1’i Yeşilırmak Havzası için ilk kayıt) tanımlamışlardır. Diğer

yandan Yılmaz vd. (2007) Kayseri-Nevşehir arasında kalan Orta Kızılırmak alanında *Simulium* enfestasyonlarının afet boyutundaki artışını rapor etmişlerdir. Ayrıca Gazyağcı (2011), Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde Simuliid türlerinin yayılışı hakkında rapor vermişlerdir.

2.8. Simuliid Sinekler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar

Simulidlerin taksonomik klasifikasyonu konvansiyonel olarak larvada kromozomal analiz, pupada morfoloji ve erginlerinde dış yapı morfolojisine dayanmaktadır. Tür ayrımı morfolojik ve sitolojik olarak çok zordur (Crosskey, 1981; Adler vd., 2004; Jitklang, 2008). Bunun yanında bu aile için geniş çaplı kladistik filogenetik çalışmalar sadece birkaç çalışma ile sınırlıdır (Moulton, 2000, 2003; Adler vd., 2004). Karasineklerin taksonomisi ile ilgili DNA sekans çalışmaları 16S ribozomal RNA ve transfer RNA (Pruess, 1992) gen bölgelerinin araştırılmasıyla başlamıştır. Daha sonra ise 16s rRNA ve NADH subunit 4 (ND4) gen bölgeleri kısmen kullanışlı olmuştur (Higazi vd., 2001; Kruger ve Hennings; 2006). Son yıllarda ise *Simulium* türlerinin DNA tabanlı klasifikasyonunda ise ITS (Internal transcribed spacers) (Phayuhaseena vd., 2010) ve COI (Cytochrome oxidase I) (Conflitti vd., 2010) gen bölgeleri polimorfik bölgeleri ve bu şekilde özgülüğü yüksek moleküler klasifikasyon yapılmaya başlanmıştır.

Hebert vd.(2003a,b) Simuliidae ailesindeki türlerin identifikasyonu için DNA'nın mitokondrial sitokrom oksidaz gen bölgesinin yaklaşık 658 bp bölgesini amplifiye etmişlerdir. 5 cinse (*Prosimulium*, *Twinnia*, *Stegopterna*, *Cnephia* ve *Simulium*) ait 15 Nearktik karasinek türünde nüklear rDNA'nın ITS1 gen bölgesi Simuliidler üzerindeki ilk sistematik çalışmalardır. 18S ve 5.8S arasında bulunan ITS1 gen bölgesi çok değişken bir bölgedir (LaRue vd., 2009). Simuliidler' deki ITS1 gen bölgesi çalışmaları onchocerciasis'in taşıyıcılığını yapan *Simulium damnosum* üzerinde yoğunlaşmıştır. *Simulium* türlerinin ITS1 gen bölgesi 240 nükleotitden 400 nükleotide kadar değişik uzunluktadır (Brockhouse vd., 1993; Tang vd., 1996; Krueger vd., 2006). Tayland da 29 *Simulium* türü bilinmektedir.

Pramula vd., (2011), Gomphostilbia altsoyundaki 13 türden oriyental karasinekte (Oriental black fly) mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesi için yaptıkları moleküler araştırmada, intraspesifik genetik farklılığı ortalama %2,75 (%0-9.28), interspesifik genetik farklılığı ise %11,41 (%0,34-18.84) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar (Pramula vd., 2011) mt-COI gen bölgesine göre DNA barkodlamasının taksonomiye kolaylaştırmada önemli olduğunu kaydetmişlerdir.

Rivera vd. (2009), mt-COI gen bölgesine göre nearctic simuliid türleri arasından morfolojik olarak farklı 65 tür ve kardeş tür içeren tür kompleksinde benzer türler arasında genetik varyasyonu ortalama %14,93 (%2,83-15,33), morfolojik farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise ortalama %0.72 (%0-3,84) olarak tespit etmişlerdir.

16S rRNA ve ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) genlerinin mitokondriyal DNA sekanslarına bağlı olarak, Tang vd. (Tang ve Unnasch, 1995) Batı Afrika'daki *Simulium damnosum*'un 6 suşu ile olan filogenetik yakınlığını göstermişlerdir. Aynı gen bölgeleri hem Afrika hemde Güney Amerikadaki farklı *Simulium* türlerinin filogenetik akrabalıkları üzerinde de çalışılmıştır (Tang vd., 1995).

Krüger vd. (2000), mitokondriyal 16 S rRNA gen sekansı çalışmaları ile *Simulium damnosum*'un Doğu ve Batı Afrika suşlarının filogenetik akrabalığını ortaya koymuşlardır.

Higazi ve ark, (2001), Sudan'ın farklı yerlerinden toplanan *Simulium* örneklerinin 16 S rRNA ve ND4 gen sekansları ile *S. damnosum* ve *S. sirbanum*'un filogenetik olarak birbirlerine yakın olduklarını göstermişlerdir.

2.9. *Simulium* Türleri İle Mücadele

Simuliid sinekler Insekta sınıfında mücadelesi en zor olan arthropodlardandır. Bu sineklere karşı dünyanın çeşitli bölgelerinde mücadele programları uygulanmıştır. Özellikle sınır aşan nehirlerde, ülkeler arası işbirliği ile kapsamlı çalışmalar yürütülmüştür. Bu mücadelelerde Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından izin verilen larvicid etkili *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) kullanılmıştır. Kanada'da (Riley ve Fusco, 1990), Amerika Birleşik Devletleri (Stoops ve Adler, 2006), Brezilya (Regis vd., 2000), Arjantin (Gray vd., 1999), Hindistan (Das vd., 1990), Türkiye (Adler ve Crosskey, 2011) ve Afrika kıtasının birçok bölümünde Simuliidae mücadelesinde Bti sistematik şekilde kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

2.9.1. Orta Kızılırmak Havzasında Afet Boyutunda Yaşanan *Simulium* Enfestasyonu

Orta Kızılırmak Havzasında Kayseri ili Yemliha Kasabasında inşa edilerek 2003 yılında su tutmaya başlayan Yamula Barajının 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte Kızılırmak nehrinin Kayseri ve Nevşehir illerinden geçen 150 kilometrelik kısmında *Simulium* spp. populasyonunda afet boyutunda büyük bir artış meydana gelmiş ve bölgede *Simulium* sp. salgını baş göstermiştir. Karbondioksit affinitesi olan ergin *Simulium* türleri, insanların ve hayvanların ağız ve burunlarına saldırdıkları için bölgede büyük rahatsızlık oluşturmuştur (Şekil 2.3). Bir turizm bölgesi olan Kapadokya'da

Simulium afeti 2007 yılında büyük bir hızla ilerlemiş ve hem bölge turizmini hem de kırsal alanlarda çiftçilerin çalışmalarının yanı sıra insan ve hayvan sağlığını da tehdit eder duruma gelmiştir. Futbol turizminin ilerlemiş olduğu Nevşehir'in ilçesi olan Avanos'ta futbol takımları *Simulium* salgınından dolayı 2007 yılında bölgeyi terk etmeye başlamış, esnaflar iş yerlerine gidemez ve dükkanlarını açamaz hale gelmişler, hemen hemen günlük hayatın durma noktasına geldiği ilçede büyük ekonomik kayıplar meydana gelmiştir. Kapadokya bölgesinde turistik amaçlı tracking faaliyetleri, binicilik sporu gibi birçok turistik etkinlik sekteye uğramıştır. Orta Kızılırmak havzasında nehrin geçtiği bölgeler ve yakın çevresinde tarım ile uğraşan çiftçiler *Simulium* sp. nedeniyle mağdur olmuşlar ve tarlalarında çalışamaz duruma gelmişlerdir. Salgın nedeni ile merada otlayan hayvanlarda strese bağlı verim düşüklükleri gözlenmiştir. Bu şekilde Kapadokya bölgesinde gerek turizm gerekse tarım ve hayvancılık faaliyetleri üzerine büyük ölçüde olumsuz etkiler oluşturan *Simulium* türlerine karşı kapsamlı mücadele çalışmaları başlatılmıştır (Yılmaz vd., 2007).



Şekil 2.3. Kızılırmak çevresinde insan ve hayvanlara saldıran *Simulium* türleri (Orijinal)

2.9.2. Orta Kızılırmak Havzasının Yapısı Bölgenin Genel Yapısı

Afet boyutunda simuliid enfestasyonunun görüldüğü ve mücadelenin yapıldığı Orta Kızılırmak Havzasının Yamula Barajından itibaren Kayseri ve Nevşehir illerinden geçen kısmı yaklaşık 150 kilometre olup nehrin 43 kilometresi Kayseri İl sınırları içerisinde, 107 kilometresi Nevşehir il sınırları içinde yer almaktadır (Şekil 2.4) (Yılmaz vd., 2007).

Kayseri ilinde Yamula Barajı Kocasinan İlçesinde inşa edilmiş olup nehrin barajdan sonraki kısmı Kocasinan ve İncesu ilçelerinden geçmektedir. Nehrin bu bölümünde nehir üzerinde dört adet köprü bulunmaktadır. Köprülerden birincisi Yemliha Kasabasında bulunmaktadır. İkinci Köprü İncesu ilçe sınırları içerisinde olan demiryolu köprüsüdür. Üçüncü köprü Kayseri-Ankara Otobanının nehir üzerinden geçtiği

köprüdür. Dördüncü köprü ise Tekgöz Köprüsü olarak bilinen M.S. 1202 yılında yapılmış olan tarihi bir köprüdür(Yılmaz vd., 2007).

Kızılırmak nehri Nevşehir ilinde ise sırası ile Ürgüp, Avanos ve Gülşehir ilçelerinden geçmektedir. Bu bölümde nehir üzerinde altı adet köprü bulunmaktadır. Bu köprülerden birincisi Sarıhıdır köyünde, üç tanesi Avanos ilçesinde, beşincisi Gülşehir ilçesinde ve altıncısı Nevşehir ile Kırşehir il sınırında Abuşağı Kasabasında yer almaktadır (Yılmaz vd., 2007).

Yöre insanı, nehrin Kayseri ve Nevşehir illerinde geçen bölümünde ağırlıklı olarak geleneksel tarım ve hayvancılıkla uğraşmaktadır. Diğer yandan Nevşehir'in özellikle Avanos ve Ürgüp ilçelerinde turizm, başlıca ekonomik sektördür (Yılmaz vd., 2007).



Şekil 2.4. *Simulium spp.* salgınının görüldüğü Orta Kızılırmak Havzası

2.9.3. Orta Kızılırmak Havzasında *Simulium spp.* Salgınının Nedenleri

Yamula Barajı Hidroelektrik santralinin 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte *Simulium spp.* popülasyonunda büyük bir artış meydana gelmiştir. Baraj faaliyete geçmeden önce ilkbahar aylarında kar sularının erimesi ve yağışların etkisi ile nehirde seller meydana gelmekte ve nehir tabanındaki bitki örtüsü temizlenmekte ve sellere bağlı olarak nehir yatağı alevuyon içermekteydi. Yamula Barajı Hidroelektrik Santralinin faaliyete geçmesi ile birlikte nehir debisi 80 metreküp/saniye ile 150 metreküp/saniye değerleri arasında sabitlenmiş olup nehir tabanındaki su bitkileri çok yıllık bitkiler haline dönüşmüştür. Bu bitkiler *Simulium* larvalarının yaz-kış tutunabilmesi için uygun bir ekosistem haline gelmiştir (Yılmaz vd., 2007).

Yamula Barajı Hidroelektrik santrali inşasından sonra nehirde adeta bir süzgeç görevi görmüş ve nehrin temizlenmesine neden olmuştur. Yemliha Barajı Hidroelektrik Santrali tirübünü baraj gölü yüzeyinin 1003,53-973,53 metre aşağısından temiz ve

soğuk suyu nehir yatağına vermekte ve 96,47 metre net dizayn düşüşü ile suyun oksijenlenmesine neden olmaktadır. Dişi *Simulium*'lar yumurtalarını bol oksijenli temiz akarsulara bıraktıkları için, bu su ortamı ergin *Simulium* sp. için çok uygun bir yumurtlama alanını oluşturmuştur. Diğer yandan 2004 yılında Kayseri Atık Su arıtma tesisinin faaliyete geçmesi de nehir suyunun temizlenmesine katkı sağlamıştır (Adler ve Crosskey, 2004; Yılmaz vd., 2007).

Yamula Barajı ve Hidroelektrik santralinin nehirde bir süzgeç görevi görerek suyun temizlenmesini sağlaması, hidroelektrik santrali tirübünlerinden 96,47 metre net dizayn düşüşü ile nehir suyunun oksijen düzeyinin artması, nehrin debisinin barajın etkisi ile 80-150 metreküp/saniye aralığında sınırlandırılması ve Kayseri Atık Su Arıtma Tesisinin de nehir suyu temizliğine katkı sağlaması ile birlikte Kızılırmak Nehrinin Kayseri ve Nevşehir illerinden geçen 150 kilometrelik kısmı *Simulium* erginlerinin yumurtlayabileceği, larvalarının su altı bitkilerine kolaylıkla tutunabileceği ve bu bitkiler üzerinde kolaylıkla yaşam döngüsünü devam ettirip önce pupa yaşam formu, daha sonra ergine dönüşebileceği uygun bir ekosistem haline gelmesi bölgede *Simulium* salgınına neden olmuştur (Yılmaz vd., 2007).

2.9.4. *Simulium* Salgınının Bölgeye Etkileri Turizm Üzerine Etkileri

Bölge, 60 milyon yıl önce Erciyes, Hasandağı ve Güllüdağ'ın püskürttüğü lav ve küllerin oluşturduğu yumuşak tabakaların milyonlarca yıl boyunca yağmur ve rüzgar tarafından aşındırılmasıyla ortaya çıkmıştır. İnsan yerleşimi *Paleolitik* döneme kadar uzanmaktadır. Hititler'in yaşadığı topraklar daha sonraki dönemlerde Hristiyanlığın en önemli merkezlerinden biri olmuştur. Kayalara oyulan evler ve kiliseler bölgeyi putperestlerin zulmünden kaçan Hristiyanlar için devasa bir sığınak haline getirmiştir. Kapadokya bölgesi, başta Nevşehir olmak üzere Kırşehir, Niğde, Aksaray ve Kayseri illerine yayılmış bir bölgedir. Kapadokya bölgesi, doğa ve tarihin bütünleştiği bir yerdir. Coğrafi olaylar Peribacaları'nı oluştururken, tarihi süreçte, insanlar da bu peribacalarının içlerine ev, kilise oymuş, bunları fresklerle süsleyerek, binlerce yıllık medeniyetlerin izlerini günümüze taşımıştır. İnsan yerleşimlerinin *Paleolitik* döneme kadar uzandığı Kapadokya'nın yazılı tarihi Hititlerle başlar. Tarih boyunca ticaret kolonilerini barındıran ve ülkeler arasında ticari ve sosyal bir köprü kuran Kapadokya, İpek Yolu'nun da önemli kavşaklarından biridir (Yılmaz vd., 2007).

Bu özellikleri ile yerli ve yabancı birçok turistin ilgi odağı haline gelmiş olan bölge turizmi 2007 yılında *Simulium* spp salgınından dolayı olumsuz etkilenmiştir. Bölgeyi her yıl yaklaşık 3 milyonu civarında turist ziyaret etmektedir. *Simulium* sp. erginleri karbondioksit affinitelerinden dolayı insanların ağız ve burunlarına saldırarak büyük

rahatsızlıklar oluşturmaktadır. Sadece gündüz aktivitesi olan *Simulium* sp. erginleri özellikle havaların sıcak olduğu günlerde insanların nefes almalarını engelleyecek kadar yoğunlaşmakta ve insanların açık alanlarda dolaşmalarını engellemektedir. *Simulium* sp. salgınının çok yoğun görüldüğü 2007 yılı yaz mevsiminde bölgede bir çok insan maske takmayı tercih etmiştir (Yılmaz vd., 2007).

Son yıllarda Nevşehir ili Avanos ilçesinde gelişen futbol turizmi de 2007 yılında ortaya çıkan *Simulium* salgınından olumsuz ölçüde etkilenmiştir. Spor yapan insanların solunumları hızlandığından daha çok karbondioksit salınımı yapmakta ve bu da *Simulium* erginlerinin futbolculara daha yoğun bir şekilde saldırımlarına neden olmaktadır. 2007 yılı Temmuz ayında Avanos İlçesini bir haftada *Simulium* salgını nedeni ile 40 tane futbol takımı terk etmiş ve bölgedeki futbol turizmi büyük sekteye uğramıştır (Yılmaz vd., 2007).

2.9.5. Hayvancılık Üzerine Etkileri

Simulium erginleri karbondioksit affinitelerinden dolayı insanlara olduğu kadar hayvanlarda rahatsızlık vermektedir. *Simulium* salgınının başladığı 2007 yılı yaz aylarında salgın özellikler büyük baş hayvanlarda burun deliklerini tıkayacak boyutlara ulaşmıştır. Merada otlayan hayvanlarda salgından dolayı aşırı rahatsızlık görülmüştür. Meraya çıkan hayvanların aşırı rahatsızlık duydukları ve beslenemedikleri gözlenmiştir. Hayvancılıkla uğraşan çiftçilerin sıcak yaz günlerinde bu rahatsızlıktan dolayı hayvanlarını meraya çıkartmak yerine ahırlarda kapalı tutmayı tercih ettikleri görülmüştür. Hayvanlarını meraya çıkartan çiftçilerin *Simulium* erginlerini uzak tutabilmek için merada ateş yakarak sürekli dumanlama yaptıkları gözlenmiştir. Bunun yanında *Simulium* erişkinleri kanatlılarda bir protozoon olan *Leucocytozoon* türlerine vektörlük yapmaktadırlar (Yılmaz vd., 2007).

2.9.6. Tarımsal Faaliyetler Üzerine Etkileri

Simulium türlerinin erkekleri bitki özütü ile, dişileri ise kan emerek ve bitki özütleri ile beslendiklerinden çoğunlukla yeşil alanlarda ve tarımsal arazilerde yoğunlaşmaktadır (Adler ve Crosskey, 2004). Tarımla uğraşan çiftçiler 2007 yılında başlayan salgında tarlada verimli bir şekilde çalışamamışlardır. Çiftçilerin bu rahatsızlıktan korunmak için maske taktıkları görülmüştür (Yılmaz vd., 2007).

2.9.7. Halk Sağlığı Üzerine Etkileri

Simuliidler bizzat kan emmenin yanında insan ve hayvanlara saldırıları ile zarar verdikleri gibi birçok patojenin bulaştırılmasında da vektör olarak görev yapmaları

bakımından önemlidirler. Az ses çıkarırlar ancak, aydınlanmış ortamlarda derhal derinin üzerine konarak kan emerler.

Sokma oldukça irritatiftir. Özellikle yüz ve boyunu ısırırlar. Simuliidlerle zoonotik karakterli nematodlardan *Onchocerca* türleri nakledilir. Nehir körlüğü olarakta bilinen *Onchocercosis* insanlarda kalıcı körlüğe neden olmaktadır. Sokmalar genellikle ağrılı değildir ancak, birkaç gün süren bir kaşıntı, şişlik ve irritasyon oluşabilir. Zehir, bezler üzerine spesifik etkilidir ve kulaklarla boyunda *masoidite* benzer semptomlara neden olabilir (Adler ve Crosskey, 2004; Yılmaz vd., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Sahası ve Simuliid örneklerinin toplanması

Saha çalışmaları, Orta Kızılırmak Havzasında daha önceki ön çalışmalarda simuliid popülasyonunun yoğun görüldüğü ve larvicide ile mücadelenin yapıldığı çeşitli odaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Ocak 2012-Kasım 2013 tarihleri arasında toplam 20 istasyondan (Şekil 3.1) her ay en az dört kez larva örnekleme amacıyla saha çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Larva örneklemeinde; istasyonların akıntılı ve durgun bölgeleri, farklı zemin yapısına sahip alanlar, gölgeli ve güneşli kısımlar ve kenar vejetasyon yapısının olup olmamasına göre numune alımına dikkat edilmiştir. Simuliid larvaları nehir yatağı içinde tutundukları taş ve bitkilerden pens yardımı ile ağız vida kapaklı vialler içerisine toplanmıştır. Preservatif olarak simuliid larvaları için özellikle kromozom analizinde önerilen Carnoy's solüsyonu kullanılmıştır (Hamada ve Adler, 1998). Solüsyonlar soğuk zincirde tutulmuş ve sahada her tüp için 10dk ara ile 3 kez değiştirilmiştir. Laboratuara ulaştırılan örnekler son kez solüsyonları değiştirilerek incelenene kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Larva örnekleme yapılan odaklarda suyun pH ve sıcaklığı ile ortalama nisbi nem ölçümleri alınmış toplanan larva sayısı ile birlikte protokole geçilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırma sahası

Ergin simuliid örnekleme larva örnekleme zamanına paralel ve hava sıcaklığına bağlı olarak uçkunların aktif oldukları Mart–Ekim ayları arasında ayda iki kez gündüz saatlerinde (10.00-17.00) yerleşim yerlerine yakın çeşitli odalarda yapılmıştır. Ergin simuliidlerin yakalanmasında karbondioksitli (Kurubuz hazneli) CDC ışık tuzaklarıyla (All-Weather LED EVS Traps, 2780, BioQuip Products CA 90220, USA) birlikte bazı yumurtlama odaklarında fileler kullanılarak yumurtlamak üzere su üzerine gelen ergin dişi *Simulium* türleri de yakalanmıştır. Ergin örnekleme yapılan odaklar ve toplanan ergin dişi simuliid sayıları protokole geçilmiştir. Toplanan ergin dişi karasinekler tutuldukları fileler içinde laboratuara getirilmiş ve morfolojik analiz sonrası 150'si tek, 460'ı ise örneklendiği odaklar dikkate alınarak 10'arlı gruplandıktan sonra (toplam 46 havuz) moleküler analizlere kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Morfolojik İdentifikasyon

Larva ve ergin örneklerinin morfolojik identifikasyonları digital kameralı ve özel yazılıma sahip bilgisayar destekli stereo mikroskop altında ilgili teşhis anahtarlarına göre yapılmıştır (Adler vd., 2004; Lechthaler ve Car, 2005; Crosskey, 2007; Crosskey ve Zwick, 2007; Ertunç, 2009).

3.2.2. Kromozomal Analiz

Toplanan larva örneklerinden bazıları sitogenetik analiz ve kromozomal teşhis amacıyla ABD Clemson Üniversitesi Entomoloji bölümü öğretim üyesi ve simuliid uzmanı Prof. Dr. Peter Adler'e gönderilmiş, gerekli analiz ve teşhisler Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılmıştır.

3.2.3. Genomik DNA İzolasyonu

Carnoy's solüsyonu içerisinde muhafaza edilen larva örnekleri, bireysel ve gruplandırılarak havuz oluşturulmuş ergin dişi simuliid örneklerinden ön homojenizasyon sonrası 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 elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları moleküler analizlerde optimum DNA konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Larva örneklerinin DNA amplifikasyonu ve Elektroforezi

Simuliid larva örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktları ribosomal internal transcript spacer 2 (ITS-2) ve 28S gen bölgesinin yaklaşık 430 bp gen fragmentini amplifiye eden ITS2F (5'-TTGAACGCATATCGCACTTCTTGC-3') ve ITS2R (5'-CCTTATTAATATGCTTAAATTCAGGG-3') (LaRue vd., 2009); mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgesinin yaklaşık 658 bp gen fragmentini amplifiye eden LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATAT TGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Hebert vd., 2003b) primerler ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda, 2,5 µl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5µM her bir primer, 0.5 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polymerase ve 50ng/µl template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerde protokol ITS-2 gen bölgesi için initial denaturation: 95 °C'de 5 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 58 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 2 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk, mt-COI gen bölgesi için de 96 °C'de 1 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 55 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 1,5 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örnekler ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Upland, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.5. Ergin dişi simuliid örneklerinin kan beslenmesinde konak spekturumunun PCR ile belirlenmesi

Simuliidlerin beslenme eğilimlerini belirlenmesinde mitochondrial cytochrome b gen bölgelerinden dizayn edilen kanatlı spesifik Avian-3 (5'-GACTGTGAY AAAATYCCMTTCCA-3') ve Avian-8 (5'-GYCTTCAITYTTTGGYTTACAAGAC-3') primerleri, memeli spesifik Mammalian-1 (5'-TGAYATGAAAAAYCATCG TTG-3') ve Mammalian-2 (5'-TGTAGTTRTCWGGGTCKCCTA-3') primerleri kullanılmıştır (Kim vd., 2009). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25µl final konsantrasyonda; 2,5 µl 10XPCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1µl 20 pmol her bir primer, 2 µl 200 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polymerase ve 50ng/µl template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra karışım thermalcyclera kanatlı ve memeli primerleri için initial denaturation: 94°C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94°C'de 30s, annealing: 55°C'de 30s, extension:

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

3.2.6. Ergin dişi simuliid örneklerinde patojenlerin Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) ile belirlenmesi

Bireysel ve gruplandırılarak havuz oluşturulmuş ergin dişi simuliid örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktlarında *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* patojenlerinin araştırılmasında syber green tabanlı Real Time PCR tekniği kullanılmıştır. Her üç patojen için de GenBank'ta mevcut izolatların çeşitli gen bölgeleri analiz edilmiş ve sırasıyla mitokondriyal cytochrome b (cytb), ITS-2 ve major sperm protein (MSP) gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primer dizaynı yapılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* türleri için Real Time PCR'da kullanılan primer ve TaqMan probolar

Primer Adı	Primer Dizilimi (5'---3')	TM* (°C)
<i>Leucocytozoon</i> sp.		
Lcytbf	ATGACGGGTAACGGGGAAT	57,3
Lcytbr	CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC	55,9
<i>Onchocerca</i> sp.		
OnITS2f	TTGTGCAAATAATACATCTTTCATACA	55,9
OnITS2r	AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA	57,3
<i>Mansonella</i> sp.		
mansf	GGTTGGGCAATTAACGAC	49,7
mansr	TCTTTTGGATCCAGGACACC	51,8

*TM: Melting Temperature

Real Time PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının kontrolü amacıyla her qPCR analizinde pozitif kontrol olarak *Leucocytozoon* için İsveç'te Lund Üniversitesi, Animal Ecology Departmanından Dr. Staffan Bensch'ten, *Mansonella* ve *Onchocerca* için de Arjantin'de "Dr. Carlos G. Malbran" Araştırma Merkezi Parazitoloji Departmanından Dr. María Fernanda Degese'den temin edilen referans izolatlar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR, master mix her üç etken için de üreticinin açıklamalarına göre toplam 20 µl hacimde aşağıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix	10,0 µl
(Agilent Technologies)	
Forward primer (10 pmol)	1,0 µl
Reverse primer (10 pmol)	1,0 µl
Genomik DNA (50 ngr)	1,0 µl
PCR Grade Deiyonize su	7,0 µl

Real Time PCR amplifikasyonu için termal profil her üç etken için de 95 °C 10dk 1 siklus ve 40 siklus, 95 °C 30sn, 60 °C 1dk, ve melting curve analizi için 95 °C 1dk 1 siklus, 55 °C 30sn 1 siklus, 95 °C 30sn 1 siklus olarak ayarlanmıştır. Real Time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon ve melting eğrileri ile Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

3.2.7. Sekans ve Filogenetik Analizler

3.2.7.1. Simuliid larvalarının ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerinin sekansı, klonlama ve filogenetik analizleri

Morfolojik ve kromozomal tür teşhisleri yapılmış larva örneklerinin PCR analizleri sonucu uygun bant profilleri gösterenlerden seçilen izolatlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler ITS-2 ve mt-COI gen bölgeleri sırasıyla ITS2F/ITS2R ve LCO1490/HCO2198 primerleri ile ABI 3700 Capillary Sequence System (Applied Biosystems) de sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious 5.5.5 (Drummond vd., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final

dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (Tamura vd., 2011) ve Geneious 5.5.5 (Drummond vd., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Araştırmada ayrıca bazı larva örneklerine ait ITS-2 ve mt-COI amplikonları jel pürifikasyon sonrasında full dizilimlerin elde edilmesi amacıyla klonlanmış ve sekanslanmışlardır. Klonlamanın ligasyon basamağında pürifiye DNA'lar pJET1.2/blunt cloning vector'e (Thermo Scientific) insert edilmiş ve ilgili prosedürleri takiben vektörler One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen) hücrelerine transforme edilerek klonlama amacıyla ampisilinli LB agar pleytlerine ekilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda pleyt üzerinde üreyen koloniler PCR screening yöntemiyle insertlerin varlığı yönünden kontrol edilmiş ve inert bulunan koloniler LB mediuma geçilerek hücrelerin üremesi amacıyla inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası sıvı besi yerinde üreyen klon hücrelerden GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ile plasmid pürifikasyonu yapılmıştır. Plasmidler XbaI ve Aval (Thermo Scientific) restriksiyon enzimleri ile prosedürüne uygun olarak analize tabi tutulmuş ve insertlerin varlığı yönünden konfirmasyonları sağlanmıştır. Plasmidler vektöre özgü pJET1.2F ve pJET1.2R primerleri ile sekanslanmış ve çift yönlü DNA dizisi belirlenen plasmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra insert DNA dizilimi full olarak elde edilmiştir. Elde edilen dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.2.7.2. Ergin dişi simuliid örneklerinin kan beslenmesinde konak türünün sekans analizleri ile belirlenmesi

Mitochondrial cytochrome b gen bölgelerinden dizayn edilen kanatlı spesifik Avian-3/Avian-8, memeli spesifik Mammalian-1/Mammalian-2 primerleri ile pozitif belirlenen örneklerde konak türünü belirleme amacıyla konsantrasyonu uygun belirlenen izolatlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ile jel pürifiye edilmiştir. Pürifiye edilen amplikonlar yukarıda (3.2.7.1) anlatıldığı gibi klonlanarak plasmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plasmidler vektör spesifik primerler ile ABI 3700 Capillary Sequence System (Applied Biosystems) de sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plasmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 5.5.5 (Drummond vd., 2011) yazılımı ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış, insert noktaları belirlenmiş ve hedef gen bölgeleri için final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'a kayıtlı kanatlı ve memeli türlerine ait mitochondrial cytochrome b gen bölgesi sekansları ile Geneious 5.5.5

(Drummond vd., 2011) yazılımında multiple alignmentları yapılarak konak türleri belirlenmiştir.

3.2.7.3. Ergin dişi simuliid örneklerinde belirlenen patojenlerin sekansı ve filogenetik analizi

Real Time PCR analizleri sonucu Leucocytozoon ve Onchocerca pozitif belirlenen izolatların sırasıyla partial mt-cytb ve cytochrome oxidase subunit I (coxI) gen bölgeleri Nested PCR ve PCR ile amplifiye edilmiştir. *Leucocytozoon* için Nested PCR analizlerinin birinci basamağında HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') ve HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGA AATACCATTC-3') [*Haemoproteus*, *Plasmodium* ve *Leucocytozoon* spesifik]; ikinci basamağında ise HaemFL (5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3') ve HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') [*Leucocytozoon* spp. spesifik] primerleri kullanılmış, amplifikasyon prosedürleri ilgili literatüre göre dizayn edilmiştir (Hellgren ve ark., 2004). *Onchocerca* için PCR analizlerinde COLintF (5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3') ve COLintR (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') primerleri ile mt- coxI gen bölgesi ilgili protokole (Eisenbarth vd., 2013) göre amplifiye edilmiştir. Elde edilen ampikonlar jel pürifiye edilmiş (High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)) ve sonrasında her patojen etken için amplifikasyon primerleri ile ABI 3700 Capillary Sequence System (Applied Biosystems) de sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlara ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) ve Geneious 5.5.5 (Drummond vd., 2011) yazılımları ile forward ve revers dizilimlerin pairwise alignmentları yapılmış final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen mt-cytb ve mt-coxI gen bölgelerine ait sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı *Leucocytozoon* ve *Onchocerca* izolatları ile Mega 5.0 (Tamura vd., 2011) ve Geneious 5.5.5 (Drummond vd., 2011) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları belirlenmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Ergin sineklerde patojenler için gözlenen minimum enfeksiyon oranının (MIRs) hesaplanmasında aşağıdaki standart formül kullanılmıştır (Santa-Ana vd., 2006):

Pozitif sinek havuzu sayısı X 100.

Toplam incelenen sinek sayısı

Patojenlerin binominal dağılımına göre, beklenen enfeksiyon oranları ayrıca değerlendirilmiş (Cinco vd., 1998), ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$P = 1 - \sqrt[n]{n / N}$$

n: Negatif havuz sayısı

N: İncelenen toplam havuz sayısı

k: Her bir havuzdaki ortalama sinek sayısı

İstatistik açıdan araştırma odaklarında aylara göre toplanan larva sayıları ile suyun pH, sıcaklık ve ortalama nisbi nem değerleri arasındaki ilişki One-Way Anova testiyle araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Simuliid larvalarının dağılımı ve ekolojik faktörlerle ilişkisi

Araştırma sahasında Aralık 2011-Aralık 2013 tarihleri arasında 20 örnekleme istasyonundan toplam 979 adet simuliid larva örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerin örnekleme noktası ve bağlı olduğu merkez ile aylara göre dağılımları, pH, su sıcaklığı ve nem değerleriyle (ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerler) birlikte 2012 yılı için Tablo 4.1, 2013 yılı için de Tablo 4.2'de verilmiştir. 2012 ve 2013 yıllarında toplanan larva sayılarının aylara göre dağılımları ayrıca sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de görüleceği üzere her iki yıl için de en yüksek larva sayısı Nisan-Ağustos, en düşük larva sayısı ise Ekim-Mart ayları arasında belirlenmiştir. 2012 ve 2013 yılları için aylık olarak ölçülen pH, su sıcaklığı ve nisbi nem değerleri ile larva sayıları arasındaki istatistiksel ilişki sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir. İlgili tablolarda görüleceği üzere her iki yıl için de larva sayıları ile su sıcaklığı arasında istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) pozitif yönlü bir ilişki belirlenmiştir. Larva sayıları ile suyun pH'sı ve ortalama nisbi nem değerleri arasında ise istatistiksel olarak önemli bir ilişki saptanmamıştır.

Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
A	38°43'58.78''K 34°55'45.91''D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,3	0,14	6,0	6,6	73,5	2,40	68,5	80,0
			Ocak	0	7,8	0,08	7,6	8,0	6,7	0,11	6,5	7,0	72,2	2,89	63,8	77,0
			Şubat	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,7	0,10	6,5	7,0	72,5	3,57	65,0	80,0
			Mart	2	7,9	0,07	7,7	8,0	7,1	0,08	7,0	7,3	80,3	3,18	74,3	88,0
			Nisan	2	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,15	8,0	8,7	58,2	2,53	52,0	63,3
			Mayıs	3	7,9	0,07	7,7	8,0	12,1	0,09	11,9	12,3	49,1	1,84	44,0	52,3
			Haziran	2	7,7	0,05	7,6	7,8	12,4	0,21	12,0	12,8	69,1	3,21	60,3	75,1
			Temmuz	2	7,5	0,07	7,4	7,7	12,5	0,18	12,0	12,9	66,1	1,83	62,3	70,1
			Ağustos	4	7,8	0,09	7,6	8,0	12,9	0,04	12,8	13,0	55,7	1,29	52,3	58,3
			Eylül	1	7,9	0,11	7,7	8,2	12,0	0,36	11,0	12,6	71,0	1,47	67,5	74,3
			Ekim	1	7,7	0,12	7,4	8,0	11,4	0,18	11,0	11,8	78,9	1,37	75,1	81,4
			Kasım	0	8,1	0,09	7,9	8,3	10,5	0,23	10,0	10,9	82,8	1,46	79,3	86,4
B	38°45'25.17''K 34°36'55.32''D	Gülşehir	Aralık	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,3	0,13	6,0	6,6	79,0	2,33	72,3	82,3
			Ocak	0	7,9	0,09	7,7	8,1	6,6	0,07	6,5	6,8	79,8	1,88	76,3	85,0
			Şubat	1	7,9	0,05	7,8	8,0	6,8	0,12	6,5	7,0	68,7	1,44	65,0	72,0
			Mart	3	7,9	0,09	7,6	8,0	7,2	0,22	6,8	7,8	55,6	1,17	52,3	57,8
			Nisan	5	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,16	8,0	8,6	39,2	1,40	35,2	41,8
			Mayıs	9	7,9	0,04	7,8	8,0	12,0	0,17	11,5	12,3	71,6	2,79	65,2	78,8
			Haziran	3	8,0	0,12	7,8	8,3	12,2	0,19	11,8	12,6	63,2	4,70	51,3	72,3
			Temmuz	2	7,7	0,09	7,5	7,9	12,3	0,15	12,0	12,7	59,5	3,66	48,5	63,8
			Ağustos	4	7,8	0,12	7,6	8,1	12,8	0,06	12,6	12,9	52,6	5,02	38,6	61,2
			Eylül	3	8,0	0,13	7,8	8,4	11,8	0,34	10,8	12,4	66,4	3,66	55,8	72,3
			Ekim	2	7,8	0,17	7,5	8,2	11,3	0,20	10,9	11,7	68,0	5,99	53,6	80,2
			Kasım	1	7,9	0,10	7,7	8,1	10,5	0,25	10,0	11,0	75,9	3,23	69,7	83,2
C	38°46'33.74''K 34°34'12.75''D	Gülşehir	Aralık	0	7,8	0,04	7,7	7,9	6,4	0,13	6,1	6,7	71,1	4,06	61,1	81,0
			Ocak	0	7,9	0,08	7,7	8,0	6,5	0,06	6,3	6,6	60,0	1,65	55,3	62,3
			Şubat	0	7,8	0,06	7,7	8,0	6,6	0,13	6,4	7,0	55,7	0,20	55,1	56,0
			Mart	4	7,9	0,09	7,6	8,0	7,1	0,10	7,0	7,4	63,9	3,65	53,0	68,0
			Nisan	6	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,15	8,0	8,7	70,9	0,15	70,5	71,2
			Mayıs	6	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,15	11,8	12,5	78,1	0,66	77,0	80,0
			Haziran	3	7,7	0,11	7,4	7,9	12,3	0,15	12,0	12,6	64,9	4,42	55,3	75,1
			Temmuz	3	8,1	0,16	7,7	8,4	12,4	0,13	12,0	12,6	62,1	4,04	51,0	70,1
			Ağustos	5	7,8	0,17	7,4	8,2	12,9	0,06	12,8	13,1	52,2	3,29	43,0	58,3
			Eylül	4	7,9	0,13	7,6	8,2	12,1	0,29	11,3	12,6	69,4	1,09	67,5	72,3
			Ekim	2	7,8	0,11	7,6	8,1	11,5	0,11	11,3	11,8	76,7	2,14	71,3	80,2
			Kasım	2	8,0	0,09	7,8	8,2	10,7	0,23	10,0	11,0	75,7	2,85	69,0	81,4
D	38°45'15.54''K 34°37'24.33''D	Gülşehir	Aralık	0	7,8	0,10	7,6	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	80,3	0,87	78,0	82,0
			Ocak	0	7,9	0,08	7,7	8,0	6,7	0,12	6,5	7,0	76,4	0,77	74,5	78,2
			Şubat	0	7,8	0,10	7,6	8,1	6,8	0,12	6,5	7,0	75,0	0,82	73,0	77,0
			Mart	2	7,9	0,08	7,7	8,0	7,3	0,11	7,0	7,5	87,9	0,82	86,1	90,0
			Nisan	3	7,9	0,10	7,6	8,0	8,2	0,12	7,9	8,4	38,1	1,52	34,0	41,3
			Mayıs	3	7,8	0,10	7,6	8,0	12,0	0,12	11,7	12,3	245,8	170,39	73,2	757,0
			Haziran	4	7,7	0,16	7,4	8,1	12,1	0,19	11,8	12,6	60,9	3,21	52,3	67,5
			Temmuz	4	7,7	0,07	7,6	7,9	12,3	0,21	12,0	12,9	61,0	5,52	45,8	72,2
			Ağustos	6	7,9	0,20	7,4	8,2	12,8	0,12	12,4	12,9	57,6	2,20	52,3	63,0
			Eylül	3	7,8	0,15	7,4	8,1	11,9	0,38	11,0	12,6	68,8	2,81	62,0	74,3
			Ekim	2	7,8	0,17	7,4	8,2	11,3	0,26	10,7	11,8	76,2	1,97	71,2	80,2
			Kasım	0	8,0	0,06	7,8	8,1	10,6	0,19	10,2	10,9	80,3	1,31	77,2	83,2

Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
E	38°45'11.00"K 34°39'23.21"D	Gülşehir	Aralık	0	8,0	0,05	7,8	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	75,6	1,60	72,3	80,0
			Ocak	0	7,9	0,09	7,7	8,1	6,5	0,07	6,3	6,6	90,4	1,03	88,0	93,0
			Şubat	1	7,8	0,03	7,7	7,8	6,7	0,10	6,5	7,0	85,3	1,62	81,3	89,2
			Mart	2	7,9	0,07	7,7	8,0	7,1	0,08	7,0	7,3	58,4	1,58	54,6	62,3
			Nisan	2	7,9	0,13	7,5	8,1	8,4	0,13	8,0	8,6	40,6	0,55	39,5	42,1
			Mayıs	5	8,0	0,13	7,7	8,3	11,7	0,29	11,0	12,3	53,3	0,31	52,6	54,0
			Haziran	5	7,8	0,17	7,4	8,2	12,4	0,23	11,9	12,8	69,1	3,21	60,3	75,1
			Temmuz	4	7,5	0,07	7,4	7,7	12,4	0,23	11,8	12,9	64,2	2,78	57,8	69,5
			Ağustos	5	7,8	0,06	7,6	7,9	12,8	0,07	12,6	12,9	58,6	3,10	52,3	67,1
			Eylül	4	7,8	0,09	7,6	8,0	11,9	0,35	10,9	12,4	71,9	2,20	67,5	77,8
			Ekim	3	7,7	0,07	7,6	7,9	11,3	0,24	10,7	11,8	74,0	4,16	61,9	80,0
			Kasım	3	8,1	0,09	7,9	8,3	10,6	0,17	10,2	10,9	77,1	3,51	67,0	83,2
F	38°45'26.66"K 34°41'06.88"D	Gülşehir	Aralık	0	8,0	0,06	7,9	8,2	6,3	0,11	6,0	6,5	78,8	2,10	76,0	85,0
			Ocak	0	7,9	0,15	7,6	8,3	6,6	0,15	6,3	7,0	88,5	0,86	87,0	91,0
			Şubat	0	7,9	0,11	7,7	8,2	6,9	0,12	6,6	7,1	81,4	0,23	81,0	82,0
			Mart	1	7,9	0,13	7,5	8,1	7,3	0,12	7,0	7,5	51,6	0,63	50,0	53,0
			Nisan	3	7,9	0,11	7,7	8,2	8,4	0,23	8,0	9,0	31,4	1,43	28,0	35,0
			Mayıs	4	7,9	0,09	7,7	8,1	12,0	0,17	11,5	12,3	55,2	0,63	54,0	57,0
			Haziran	3	7,8	0,04	7,7	7,9	12,1	0,40	11,0	12,8	68,7	4,00	57,7	76,3
			Temmuz	3	7,8	0,14	7,5	8,1	12,1	0,40	11,0	12,9	63,3	3,67	54,0	70,1
			Ağustos	5	7,8	0,11	7,5	8,0	12,7	0,22	12,0	12,9	53,4	4,53	42,0	64,0
			Eylül	2	8,0	0,09	7,8	8,2	11,8	0,43	11,0	12,6	68,8	0,65	67,5	70,0
			Ekim	3	7,8	0,11	7,5	8,0	11,2	0,14	11,0	11,6	78,6	1,85	75,1	83,0
			Kasım	1	8,1	0,12	7,8	8,3	10,0	0,39	9,0	10,9	78,8	4,17	67,0	86,4
G	38°45'17.99"K 34°41'43.86"D	Gülşehir	Aralık	0	7,9	0,13	7,6	8,2	6,4	0,10	6,2	6,7	78,6	1,68	75,5	82,0
			Ocak	0	7,9	0,10	7,7	8,1	6,8	0,13	6,5	7,0	80,1	0,34	79,4	81,0
			Şubat	0	7,9	0,10	7,6	8,0	6,9	0,08	6,7	7,0	61,7	0,47	61,0	63,0
			Mart	2	8,0	0,17	7,5	8,2	7,1	0,13	6,8	7,4	28,8	1,25	26,0	32,0
			Nisan	2	7,9	0,05	7,8	8,0	8,4	0,17	8,0	8,8	30,4	0,22	30,0	31,0
			Mayıs	2	7,9	0,10	7,7	8,1	12,0	0,03	11,9	12,0	43,8	0,84	42,0	46,0
			Haziran	4	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,09	12,0	12,3	69,4	4,30	60,3	77,9
			Temmuz	5	7,8	0,11	7,5	8,0	12,4	0,13	12,0	12,6	66,4	3,02	62,3	75,4
			Ağustos	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,8	0,06	12,6	12,9	53,2	1,81	49,8	58,3
			Eylül	4	7,7	0,13	7,4	8,0	12,2	0,34	11,3	12,8	72,7	2,94	67,5	81,0
			Ekim	2	7,8	0,14	7,4	8,0	11,5	0,13	11,2	11,8	79,6	2,43	75,1	86,2
			Kasım	1	7,9	0,13	7,6	8,2	10,6	0,19	10,2	10,9	80,3	3,55	71,2	88,3
H	38°50'18.40"K 34°24'16.04"D	Gülşehir	Aralık	0	7,9	0,09	7,7	8,1	6,2	0,07	6,0	6,3	74,9	1,85	72,0	80,0
			Ocak	0	7,9	0,08	7,7	8,0	6,6	0,11	6,3	6,8	63,2	0,84	61,0	65,0
			Şubat	0	7,9	0,06	7,8	8,0	6,7	0,09	6,5	6,9	75,7	0,85	74,0	78,0
			Mart	0	7,9	0,06	7,7	8,0	7,3	0,10	7,0	7,5	49,3	0,68	48,0	51,2
			Nisan	4	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,11	8,0	8,5	24,3	0,82	22,3	26,3
			Mayıs	6	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,11	12,0	12,5	66,0	1,63	62,0	70,0
			Haziran	4	8,0	0,17	7,6	8,4	12,3	0,21	11,9	12,8	67,4	4,01	57,2	75,1
			Temmuz	4	7,7	0,10	7,4	7,9	12,4	0,19	12,0	12,9	67,3	2,20	63,8	73,2
			Ağustos	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,8	0,06	12,6	12,9	53,9	4,28	41,7	61,7
			Eylül	3	7,9	0,19	7,4	8,2	11,8	0,36	10,9	12,4	71,0	2,06	66,0	75,8
			Ekim	2	7,7	0,12	7,4	8,0	11,3	0,19	11,0	11,8	78,6	2,36	72,1	83,3
			Kasım	1	8,1	0,09	7,9	8,3	10,4	0,21	10,0	10,8	81,3	2,34	74,5	85,2

Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
I	38°48'42.70"K 34°25'37.77"D	Gülşehir	Aralık	0	7,8	0,03	7,7	7,8	6,3	0,11	6,0	6,5	73,1	1,67	70,0	77,8
			Ocak	0	7,7	0,11	7,5	8,0	6,5	0,07	6,3	6,6	71,9	0,65	70,0	73,0
			Şubat	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,6	0,05	6,5	6,7	85,2	1,24	82,0	88,0
			Mart	1	7,9	0,07	7,7	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	74,1	1,57	70,0	77,0
			Nisan	4	7,8	0,07	7,7	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	38,7	0,85	37,0	41,0
			Mayıs	7	7,9	0,06	7,7	8,0	12,1	0,09	11,9	12,3	60,3	1,65	58,0	65,0
			Haziran	4	7,7	0,17	7,4	8,2	12,0	0,27	11,4	12,7	67,6	5,65	51,6	77,8
			Temmuz	5	7,7	0,10	7,4	7,9	12,3	0,24	11,8	12,9	61,7	5,14	47,1	71,3
			Ağustos	6	7,8	0,09	7,6	8,0	12,8	0,06	12,6	12,9	57,1	3,76	49,1	67,2
			Eylül	2	7,8	0,07	7,7	8,0	11,8	0,35	11,0	12,4	72,5	2,34	67,5	78,1
			Ekim	2	7,7	0,06	7,5	7,8	11,3	0,23	10,7	11,8	78,5	1,23	75,1	81,0
			Kasım	1	7,9	0,13	7,6	8,2	10,3	0,27	9,6	10,9	82,6	2,34	76,8	88,2
J	38°45'04.96"K 34°44'28.43"D	Avanos	Aralık	0	7,8	0,04	7,7	7,9	6,3	0,11	6,0	6,5	74,9	1,20	73,0	78,0
			Ocak	0	7,7	0,11	7,5	8,0	6,6	0,06	6,5	6,8	86,9	1,12	84,1	89,2
			Şubat	0	7,8	0,06	7,7	8,0	6,8	0,12	6,5	7,0	77,1	0,83	75,0	79,0
			Mart	1	7,8	0,07	7,7	8,0	7,3	0,13	7,0	7,6	88,7	0,21	88,1	89,0
			Nisan	1	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,16	8,0	8,6	50,7	0,24	50,0	51,0
			Mayıs	4	7,9	0,06	7,7	8,0	12,0	0,19	11,5	12,3	49,9	0,72	49,0	52,0
			Haziran	3	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,29	11,6	12,8	68,7	3,76	60,3	77,2
			Temmuz	3	7,6	0,09	7,4	7,8	12,4	0,22	12,0	12,9	67,6	3,54	61,0	77,2
			Ağustos	4	7,7	0,11	7,5	8,0	13,0	0,11	12,8	13,3	56,3	4,36	47,8	68,1
			Eylül	2	7,9	0,10	7,6	8,0	12,1	0,31	11,2	12,6	73,3	2,25	69,8	79,3
			Ekim	1	7,8	0,15	7,4	8,1	11,4	0,21	11,0	11,8	74,9	5,43	59,6	84,5
			Kasım	1	8,0	0,11	7,8	8,3	10,4	0,18	10,0	10,8	81,9	2,51	75,0	87,0
K	38°43'58.15"K 34°46'56.48"D	Avanos	Aralık	0	7,8	0,04	7,7	7,9	6,3	0,08	6,2	6,5	73,2	1,21	70,1	76,0
			Ocak	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,7	0,08	6,5	6,8	55,4	0,15	55,1	55,8
			Şubat	2	7,9	0,07	7,8	8,1	6,8	0,17	6,3	7,0	50,3	0,47	49,0	51,0
			Mart	3	7,9	0,07	7,7	8,0	7,4	0,08	7,2	7,5	87,5	0,34	86,6	88,1
			Nisan	3	7,8	0,06	7,7	8,0	8,3	0,10	8,1	8,6	70,8	0,08	70,6	71,0
			Mayıs	5	7,9	0,07	7,7	8,0	12,2	0,13	11,9	12,5	75,7	1,84	71,0	80,0
			Haziran	2	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,22	11,8	12,8	70,4	2,75	64,0	76,9
			Temmuz	2	7,8	0,19	7,4	8,3	12,3	0,24	11,8	12,9	67,2	3,79	62,3	78,5
			Ağustos	3	7,9	0,09	7,7	8,0	12,7	0,09	12,5	12,9	53,9	2,67	47,2	59,3
			Eylül	2	7,9	0,06	7,7	8,0	11,8	0,47	10,4	12,6	63,4	4,03	51,8	69,9
			Ekim	1	7,7	0,00	7,7	7,7	11,2	0,25	10,6	11,8	75,5	1,83	71,3	80,2
			Kasım	0	8,0	0,20	7,4	8,3	10,3	0,28	9,6	10,9	81,2	3,49	71,0	86,4
L	38°42'59.37"K 34°50'11.57"D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	76,3	1,47	72,0	78,8
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,05	6,5	6,7	80,9	0,24	80,3	81,5
			Şubat	1	7,9	0,08	7,7	8,0	6,8	0,03	6,7	6,8	63,7	0,13	63,3	63,9
			Mart	2	7,9	0,09	7,7	8,0	7,2	0,16	6,8	7,5	35,0	0,82	33,0	37,0
			Nisan	2	7,9	0,10	7,6	8,0	8,4	0,14	8,0	8,6	60,5	7,75	42,3	80,0
			Mayıs	3	7,8	0,09	7,6	8,0	12,1	0,18	11,7	12,5	53,4	0,45	52,1	54,0
			Haziran	3	7,9	0,06	7,7	8,0	12,3	0,15	12,0	12,6	68,8	3,43	60,3	75,1
			Temmuz	3	7,8	0,09	7,6	8,0	12,3	0,15	12,0	12,7	65,9	2,45	62,3	73,1
			Ağustos	3	7,6	0,09	7,4	7,8	12,8	0,09	12,5	12,9	53,6	4,31	42,3	62,7
			Eylül	2	7,8	0,04	7,7	7,9	11,9	0,38	11,0	12,6	71,4	1,03	69,9	74,3
			Ekim	1	7,8	0,09	7,6	8,0	11,2	0,30	10,5	11,8	77,6	1,89	72,0	80,2
			Kasım	1	8,0	0,16	7,6	8,3	10,4	0,34	9,5	10,9	79,2	2,48	72,2	83,2

Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
M	38°43'55.67"K 34°53'48.96"D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,2	0,14	5,9	6,5	76,6	0,83	75,0	78,0
			Ocak	0	7,7	0,04	7,6	7,8	6,4	0,10	6,2	6,6	83,2	0,22	82,8	83,8
			Şubat	2	7,9	0,06	7,7	8,0	6,7	0,06	6,5	6,8	75,2	0,80	73,0	76,8
			Mart	4	7,9	0,07	7,7	8,0	7,2	0,13	7,0	7,6	56,0	1,47	53,0	60,0
			Nisan	4	7,9	0,06	7,8	8,0	8,2	0,16	7,9	8,6	41,5	0,48	40,1	42,2
			Mayıs	5	7,8	0,08	7,7	8,0	12,1	0,23	11,8	12,8	58,5	1,64	55,1	63,0
			Haziran	5	7,9	0,08	7,7	8,0	12,2	0,30	11,5	12,8	66,0	3,42	60,3	75,1
			Temmuz	5	7,7	0,13	7,4	8,0	12,3	0,23	11,9	12,9	63,2	3,53	54,8	72,0
			Ağustos	5	7,8	0,10	7,6	8,0	13,0	0,05	12,9	13,1	52,7	3,77	42,3	59,4
			Eylül	3	7,9	0,17	7,4	8,2	12,1	0,39	11,0	12,8	69,1	1,69	65,1	72,3
			Ekim	2	7,7	0,13	7,4	8,0	11,5	0,17	11,0	11,8	77,3	1,07	75,1	80,2
			Kasım	1	7,9	0,19	7,4	8,3	10,5	0,25	10,0	11,0	78,0	3,39	68,1	82,5
N	38°45'10.83"K 34°42'56.72"D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,09	6,1	6,5	76,8	1,89	72,3	80,0
			Ocak	0	7,8	0,08	7,6	8,0	6,5	0,09	6,3	6,7	59,8	17,63	7,0	79,6
			Şubat	1	7,9	0,06	7,8	8,0	6,8	0,09	6,6	7,0	56,2	1,50	52,3	59,6
			Mart	3	7,9	0,07	7,7	8,0	7,3	0,06	7,2	7,5	48,1	2,27	42,5	53,6
			Nisan	4	7,9	0,06	7,8	8,0	8,4	0,15	8,0	8,7	50,7	0,56	49,9	52,3
			Mayıs	4	7,8	0,09	7,6	8,0	12,1	0,06	12,0	12,3	41,3	1,34	38,8	45,0
			Haziran	4	7,9	0,10	7,6	8,0	12,5	0,17	12,0	12,8	68,9	2,89	60,3	72,3
			Temmuz	4	7,7	0,14	7,4	8,0	12,6	0,20	12,0	12,9	62,3	5,54	46,2	70,1
			Ağustos	4	7,9	0,07	7,7	8,0	13,1	0,17	12,9	13,6	47,5	4,68	35,4	56,9
			Eylül	2	7,8	0,08	7,6	8,0	12,2	0,22	11,6	12,6	67,7	2,34	61,4	72,3
			Ekim	2	7,8	0,14	7,6	8,2	11,5	0,26	11,0	12,2	76,6	2,74	68,8	81,4
			Kasım	0	8,0	0,12	7,7	8,3	10,6	0,18	10,2	10,9	76,3	4,64	62,5	82,2
O	38°43'55.79"K 34°54'39.01"D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,4	0,15	6,0	6,7	78,9	2,05	76,3	85,0
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,06	6,5	6,8	78,2	1,35	75,8	82,0
			Şubat	1	7,9	0,08	7,7	8,0	6,8	0,14	6,5	7,0	72,5	1,55	68,0	75,0
			Mart	1	7,9	0,07	7,7	8,0	6,9	0,09	6,8	7,2	47,4	0,88	45,6	49,8
			Nisan	2	7,9	0,06	7,8	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	33,3	0,42	32,1	34,1
			Mayıs	4	7,9	0,09	7,7	8,1	12,2	0,13	11,9	12,5	42,0	1,48	38,0	45,1
			Haziran	3	7,9	0,18	7,6	8,4	12,4	0,25	12,0	12,9	67,2	3,50	57,0	72,3
			Temmuz	3	7,7	0,09	7,4	7,8	12,5	0,13	12,3	12,9	65,0	2,54	59,2	70,1
			Ağustos	4	7,7	0,13	7,4	8,0	13,0	0,09	12,8	13,2	49,4	3,38	41,2	56,9
			Eylül	2	7,9	0,11	7,7	8,2	12,1	0,36	11,0	12,6	69,7	1,00	67,5	72,3
			Ekim	1	7,8	0,09	7,6	8,0	11,4	0,19	11,0	11,8	76,3	2,52	69,8	81,4
			Kasım	0	8,0	0,04	7,9	8,1	10,6	0,21	10,0	10,9	79,7	3,06	71,3	85,1
P	38°43'58.52"K 34°55'10.66"D	Ürgüp	Aralık	0	8,0	0,06	7,9	8,2	6,2	0,13	6,0	6,5	77,1	1,74	74,0	82,0
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,4	0,11	6,1	6,6	83,1	0,82	81,0	85,0
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,9	0,08	6,7	7,0	84,4	1,43	81,0	88,0
			Mart	2	7,9	0,09	7,7	8,0	7,4	0,10	7,2	7,6	43,1	1,78	40,0	48,0
			Nisan	2	7,9	0,06	7,8	8,0	8,3	0,18	8,0	8,8	38,3	0,29	37,8	39,1
			Mayıs	5	7,9	0,07	7,7	8,0	12,0	0,11	11,8	12,3	52,3	1,25	49,0	55,0
			Haziran	2	7,7	0,09	7,4	7,8	12,2	0,19	12,0	12,8	67,5	3,42	60,3	75,1
			Temmuz	2	7,7	0,16	7,4	8,0	12,4	0,20	12,0	12,9	59,7	7,02	39,1	69,1
			Ağustos	3	7,7	0,05	7,6	7,8	12,8	0,11	12,5	13,0	48,5	4,04	36,8	55,1
			Eylül	1	7,7	0,06	7,5	7,8	12,1	0,36	11,0	12,6	70,8	0,58	69,8	72,3
			Ekim	0	7,8	0,14	7,4	8,0	11,5	0,21	11,0	11,8	76,6	1,54	73,0	79,4
			Kasım	0	7,8	0,13	7,4	8,0	10,6	0,19	10,2	10,9	82,6	1,90	79,3	87,7

Tablo 4.1. 2012 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
R	38°44'15.02"K 34°55'59.84"D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,1	0,13	5,8	6,4	67,7	0,70	66,0	69,0
			Ocak	0	7,9	0,06	7,8	8,0	6,5	0,11	6,3	6,8	83,4	1,70	80,1	88,1
			Şubat	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,7	0,13	6,4	7,0	58,1	1,09	55,1	60,3
			Mart	2	7,8	0,08	7,7	8,0	7,3	0,10	7,0	7,5	42,3	1,08	40,0	45,2
			Nisan	2	7,9	0,06	7,8	8,0	8,4	0,14	8,0	8,6	38,2	0,30	37,6	39,0
			Mayıs	3	7,9	0,07	7,7	8,0	12,2	0,18	11,8	12,6	41,2	0,47	40,0	42,3
			Haziran	2	7,8	0,12	7,4	7,9	12,2	0,18	11,8	12,6	66,5	2,87	60,3	73,0
			Temmuz	3	7,7	0,16	7,4	8,0	12,4	0,27	11,6	12,9	63,8	2,25	57,6	68,2
			Ağustos	5	7,7	0,05	7,6	7,8	12,8	0,18	12,2	13,0	53,7	2,00	48,9	58,3
			Eylül	2	7,7	0,09	7,5	7,9	11,9	0,38	11,0	12,6	69,5	1,79	64,3	72,3
			Ekim	1	7,7	0,11	7,4	7,9	11,3	0,28	10,6	11,8	77,5	1,63	74,5	81,4
			Kasım	0	7,8	0,09	7,6	8,0	10,4	0,34	9,5	10,9	80,1	1,82	75,3	83,2
S	38°44'39.24"K 34°56'23.15"D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,4	0,13	6,0	6,6	70,0	1,02	68,0	72,3
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,12	6,3	6,8	78,6	0,92	76,3	80,1
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,8	0,14	6,5	7,1	74,0	0,83	72,5	76,3
			Mart	3	7,8	0,11	7,5	8,0	6,9	0,15	6,5	7,2	47,8	1,55	43,8	51,0
			Nisan	3	7,9	0,05	7,8	8,0	8,1	0,17	7,9	8,6	31,4	0,64	29,9	33,0
			Mayıs	4	7,8	0,06	7,6	7,9	12,6	0,16	12,1	12,8	52,4	0,21	52,0	52,9
			Haziran	2	7,9	0,10	7,6	8,0	12,3	0,26	11,7	12,8	69,5	4,26	60,3	77,8
			Temmuz	2	7,8	0,14	7,4	8,0	12,4	0,21	12,0	12,9	65,0	1,64	62,3	69,8
			Ağustos	2	7,6	0,09	7,4	7,8	12,8	0,09	12,6	13,0	55,5	2,34	51,2	61,4
			Eylül	1	7,7	0,05	7,6	7,8	11,9	0,32	11,0	12,4	71,3	2,28	66,1	77,0
			Ekim	0	7,8	0,07	7,7	8,0	11,3	0,22	10,9	11,8	77,1	1,79	73,1	80,2
			Kasım	0	7,9	0,09	7,6	8,0	10,5	0,27	9,8	10,9	79,1	3,48	69,7	86,4
			Aralık	0	7,9	0,12	7,5	8,0	6,4	0,13	6,0	6,6	76,2	1,34	72,3	78,1
T	38°44'15.74"K 34°56'22.41"D	Ürgüp	Ocak	0	7,8	0,08	7,6	8,0	6,6	0,06	6,5	6,8	83,0	1,63	79,0	87,0
			Şubat	0	7,8	0,09	7,6	8,0	6,8	0,12	6,5	7,0	79,3	0,18	79,0	79,8
			Mart	1	7,8	0,08	7,7	8,0	7,3	0,26	6,8	8,0	46,4	2,01	43,0	52,0
			Nisan	3	7,9	0,06	7,8	8,0	8,4	0,13	8,0	8,6	37,2	0,69	36,2	39,1
			Mayıs	4	7,9	0,09	7,7	8,1	12,5	0,33	11,5	13,0	49,6	1,65	46,0	53,9
			Haziran	3	7,8	0,05	7,7	7,9	12,2	0,12	12,0	12,5	66,4	3,14	60,3	75,1
			Temmuz	3	7,8	0,10	7,5	7,9	12,4	0,20	12,0	12,9	59,7	5,99	42,4	70,1
			Ağustos	3	7,8	0,09	7,6	8,0	12,8	0,11	12,5	13,0	50,1	5,25	34,8	58,3
			Eylül	1	7,8	0,07	7,7	8,0	11,9	0,37	11,0	12,6	69,5	1,08	67,5	72,3
			Ekim	1	7,9	0,09	7,7	8,0	11,3	0,18	11,0	11,8	74,1	2,32	69,7	80,2
			Kasım	0	7,9	0,09	7,6	8,0	10,4	0,28	9,9	10,9	80,1	2,09	74,0	83,2
			Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,08	6,2	6,5	80,7	0,55	79,6	82,0
			Ocak	0	7,9	0,08	7,7	8,0	6,6	0,09	6,3	6,7	77,9	0,59	76,3	79,1
U	38°44'32.87"K 34°56'57.48"D	Ürgüp	Şubat	0	7,8	0,08	7,6	8,0	6,7	0,03	6,6	6,7	76,5	0,57	75,1	77,8
			Mart	2	8,0	0,13	7,7	8,3	7,2	0,14	6,8	7,4	32,5	0,50	31,2	33,5
			Nisan	2	7,9	0,06	7,7	8,0	8,4	0,07	8,3	8,6	32,2	0,35	31,4	33,1
			Mayıs	3	7,9	0,06	7,7	8,0	12,9	0,12	12,5	13,0	41,1	1,80	37,8	46,0
			Haziran	2	7,8	0,10	7,6	8,0	12,2	0,20	12,0	12,8	69,0	4,31	57,4	77,8
			Temmuz	2	7,7	0,13	7,4	8,0	12,4	0,27	11,6	12,9	67,5	3,86	62,3	79,0
			Ağustos	4	7,7	0,09	7,6	8,0	12,9	0,05	12,8	13,0	54,1	1,75	50,0	57,1
			Eylül	1	7,8	0,13	7,6	8,2	12,1	0,36	11,0	12,6	69,6	1,28	66,1	72,3
			Ekim	1	7,8	0,13	7,4	8,0	11,5	0,22	11,0	12,0	77,3	2,22	71,0	81,4
			Kasım	0	7,8	0,10	7,5	7,9	10,6	0,21	10,0	10,9	78,9	2,62	71,3	83,2

Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
A	38°43'58.78"K 34°55'45.91"D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	71,0	3,51	63,3	80,0
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,5	0,07	6,3	6,6	68,1	2,26	63,8	74,3
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,6	0,05	6,5	6,7	58,9	3,07	55,1	68,0
			Mart	2	7,8	0,08	7,7	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	68,8	1,87	66,0	74,3
			Nisan	3	7,9	0,06	7,8	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	58,2	2,53	52,0	63,3
			Mayıs	3	7,9	0,09	7,7	8,1	11,7	0,28	11,0	12,3	82,8	1,46	79,3	86,4
			Haziran	3	7,6	0,08	7,5	7,8	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	5	7,6	0,06	7,4	7,7	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	5	7,7	0,06	7,5	7,8	12,3	0,10	12,0	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	2	7,9	0,08	7,7	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,8	0,11	7,5	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	0	7,9	0,06	7,7	8,0	10,5	0,08	10,3	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2
B	38°45'25.17"K 34°36'55.32"D	Gülşehir	Aralık	1	7,9	0,09	7,7	8,1	6,3	0,11	6,1	6,6	64,4	4,62	51,3	72,3
			Ocak	1	7,9	0,08	7,7	8,0	6,5	0,06	6,3	6,6	56,4	3,89	48,5	63,8
			Şubat	0	8,0	0,06	7,8	8,1	6,7	0,11	6,5	7,0	62,2	4,32	52,3	72,0
			Mart	2	7,9	0,06	7,7	8,0	7,3	0,26	6,8	8,0	62,1	2,39	55,9	67,5
			Nisan	2	8,0	0,06	7,8	8,1	8,4	0,13	8,0	8,6	43,1	3,21	38,0	52,4
			Mayıs	3	7,9	0,06	7,7	8,0	11,8	0,24	11,3	12,3	51,8	3,12	45,0	60,0
			Haziran	4	7,9	0,06	7,7	8,0	12,1	0,04	12,0	12,2	65,7	2,30	62,0	72,3
			Temmuz	4	7,7	0,13	7,4	8,0	12,1	0,06	12,0	12,3	68,3	1,59	63,8	71,0
			Ağustos	3	8,0	0,06	7,8	8,1	12,4	0,10	12,1	12,5	59,3	5,64	45,0	68,6
			Eylül	3	7,9	0,06	7,7	8,0	11,2	0,04	11,1	11,3	64,6	4,24	52,0	70,0
			Ekim	1	7,8	0,12	7,5	8,0	10,9	0,03	10,8	10,9	70,1	5,11	56,3	80,0
			Kasım	1	7,7	0,06	7,6	7,9	10,6	0,05	10,5	10,7	77,9	2,19	73,0	83,2
C	38°46'33.74"K 34°34'12.75"D	Gülşehir	Aralık	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,3	0,17	5,9	6,7	67,6	2,46	60,3	71,0
			Ocak	0	7,8	0,07	7,7	8,0	6,4	0,07	6,3	6,6	63,9	4,77	51,0	72,0
			Şubat	1	7,9	0,06	7,8	8,0	6,7	0,09	6,5	6,9	57,7	2,73	52,3	65,0
			Mart	2	7,8	0,08	7,6	7,9	7,2	0,15	6,8	7,4	57,6	6,26	42,0	68,0
			Nisan	3	7,8	0,02	7,7	7,8	8,3	0,15	8,0	8,7	67,3	5,27	56,0	80,0
			Mayıs	2	7,8	0,09	7,6	8,0	11,8	0,24	11,3	12,3	61,1	7,22	49,0	79,3
			Haziran	4	7,7	0,03	7,6	7,7	12,2	0,09	12,0	12,4	64,7	2,95	58,0	72,3
			Temmuz	2	7,7	0,06	7,6	7,9	12,2	0,14	12,0	12,6	69,6	1,76	66,0	74,3
			Ağustos	4	7,9	0,08	7,7	8,0	12,4	0,17	12,0	12,8	62,6	3,28	56,9	68,6
			Eylül	1	7,8	0,11	7,5	8,0	11,2	0,12	11,0	11,5	68,7	1,30	66,0	72,1
			Ekim	1	7,8	0,13	7,4	8,0	10,9	0,03	10,8	10,9	62,2	2,83	55,3	69,0
			Kasım	1	7,9	0,10	7,6	8,1	10,5	0,05	10,3	10,5	76,8	3,02	69,0	83,2
D	38°45'15.54"K 34°37'24.33"D	Gülşehir	Aralık	0	7,8	0,10	7,6	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	66,0	4,78	55,0	78,0
			Ocak	1	7,9	0,09	7,7	8,0	6,5	0,04	6,4	6,6	62,6	5,98	45,8	72,2
			Şubat	0	7,8	0,10	7,6	8,1	6,6	0,08	6,4	6,7	53,1	3,00	45,0	58,3
			Mart	2	7,9	0,08	7,7	8,0	7,2	0,16	6,8	7,5	66,9	2,60	60,0	72,3
			Nisan	4	7,9	0,10	7,6	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	64,6	5,58	50,0	75,1
			Mayıs	3	7,8	0,10	7,6	8,0	11,8	0,17	11,5	12,3	70,4	3,92	63,0	77,2
			Haziran	4	7,9	0,06	7,7	8,0	12,2	0,05	12,1	12,3	67,5	1,85	64,2	72,3
			Temmuz	5	7,7	0,05	7,5	7,7	12,2	0,12	12,0	12,5	69,4	1,94	65,0	74,3
			Ağustos	5	7,8	0,10	7,6	8,1	12,5	0,18	12,2	13,0	62,9	3,14	56,9	68,6
			Eylül	2	7,8	0,14	7,4	8,1	11,3	0,11	11,0	11,5	68,6	1,28	66,0	72,0
			Ekim	2	7,7	0,11	7,5	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	63,0	3,06	56,3	71,0
			Kasım	1	7,9	0,12	7,6	8,1	10,6	0,08	10,5	10,8	76,4	2,67	69,0	81,1

Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
E	38°45'11.00''K 34°39'23.21''D	Gülşehir	Aralık	0	7,9	0,15	7,5	8,2	6,3	0,11	6,0	6,5	71,9	4,19	60,3	80,0
			Ocak	1	7,9	0,09	7,7	8,1	6,5	0,07	6,3	6,6	67,7	5,37	57,8	82,0
			Şubat	1	7,8	0,03	7,7	7,8	6,6	0,05	6,5	6,7	63,6	5,42	52,3	77,0
			Mart	3	7,8	0,11	7,5	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	71,2	1,61	67,5	75,0
			Nisan	3	7,9	0,13	7,5	8,1	8,3	0,13	8,0	8,6	72,7	4,22	62,0	80,0
			Mayıs	4	8,0	0,13	7,7	8,3	11,7	0,28	11,0	12,3	59,9	12,65	32,0	83,2
			Haziran	3	7,7	0,12	7,5	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	68,2	2,34	63,3	72,3
			Temmuz	5	7,6	0,13	7,4	8,0	12,0	0,02	12,0	12,1	69,9	2,43	63,8	74,3
			Ağustos	3	7,7	0,07	7,5	7,8	12,4	0,19	12,0	12,9	62,9	3,14	56,9	68,6
			Eylül	1	7,8	0,09	7,6	8,0	11,4	0,22	11,0	12,0	68,5	1,13	66,0	71,3
			Ekim	1	7,7	0,11	7,5	8,0	10,8	0,08	10,6	11,0	63,1	2,15	59,0	69,0
			Kasım	1	7,9	0,04	7,8	8,0	10,6	0,11	10,3	10,8	76,0	2,46	69,0	79,6
F	38°45'26.66''K 34°41'06.88''D	Gülşehir	Aralık	0	8,0	0,06	7,9	8,2	6,2	0,13	6,0	6,5	74,3	5,83	57,7	85,0
			Ocak	0	7,9	0,15	7,6	8,3	6,5	0,09	6,3	6,7	70,3	4,36	61,0	82,0
			Şubat	0	7,9	0,11	7,7	8,2	6,6	0,07	6,4	6,7	67,1	5,69	52,3	77,0
			Mart	3	7,9	0,09	7,7	8,1	7,0	0,09	6,8	7,2	64,2	2,93	57,0	69,9
			Nisan	3	8,0	0,10	7,7	8,2	8,4	0,23	8,0	9,0	62,0	7,94	45,0	76,0
			Mayıs	3	8,0	0,13	7,7	8,3	11,7	0,30	11,0	12,3	57,4	11,85	38,0	86,4
			Haziran	4	7,8	0,05	7,7	7,9	12,1	0,06	12,0	12,3	66,5	1,98	63,3	72,3
			Temmuz	2	7,7	0,09	7,4	7,8	12,2	0,12	12,0	12,5	69,0	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	3	8,0	0,06	7,8	8,1	12,4	0,17	12,0	12,8	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	1	7,7	0,12	7,4	7,9	11,3	0,12	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,8	0,12	7,5	8,0	10,8	0,06	10,6	10,9	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,7	0,06	7,6	7,9	10,5	0,13	10,1	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2
			Aralık	0	7,9	0,13	7,6	8,2	6,3	0,19	5,8	6,7	69,9	5,43	58,0	82,0
G	38°45'17.99''K 34°41'43.86''D	Gülşehir	Ocak	1	7,9	0,13	7,7	8,2	6,5	0,04	6,4	6,6	71,4	3,17	62,3	76,0
			Şubat	1	7,9	0,10	7,6	8,0	6,6	0,09	6,3	6,7	59,7	5,62	52,2	76,0
			Mart	2	8,0	0,17	7,5	8,2	7,1	0,13	6,8	7,4	67,7	6,53	50,0	81,0
			Nisan	2	8,0	0,09	7,8	8,2	8,3	0,18	8,0	8,8	72,8	7,04	53,0	86,2
			Mayıs	2	8,0	0,09	7,7	8,1	11,6	0,21	11,0	11,9	66,1	6,42	49,0	79,3
			Haziran	3	7,9	0,15	7,6	8,2	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,1	0,05	12,0	12,2	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,9	0,08	7,7	8,0	12,2	0,11	12,0	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	1	7,9	0,09	7,7	8,1	11,3	0,13	10,9	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,7	0,13	7,4	8,0	10,9	0,06	10,7	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,9	0,03	7,8	7,9	10,5	0,06	10,4	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2

Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

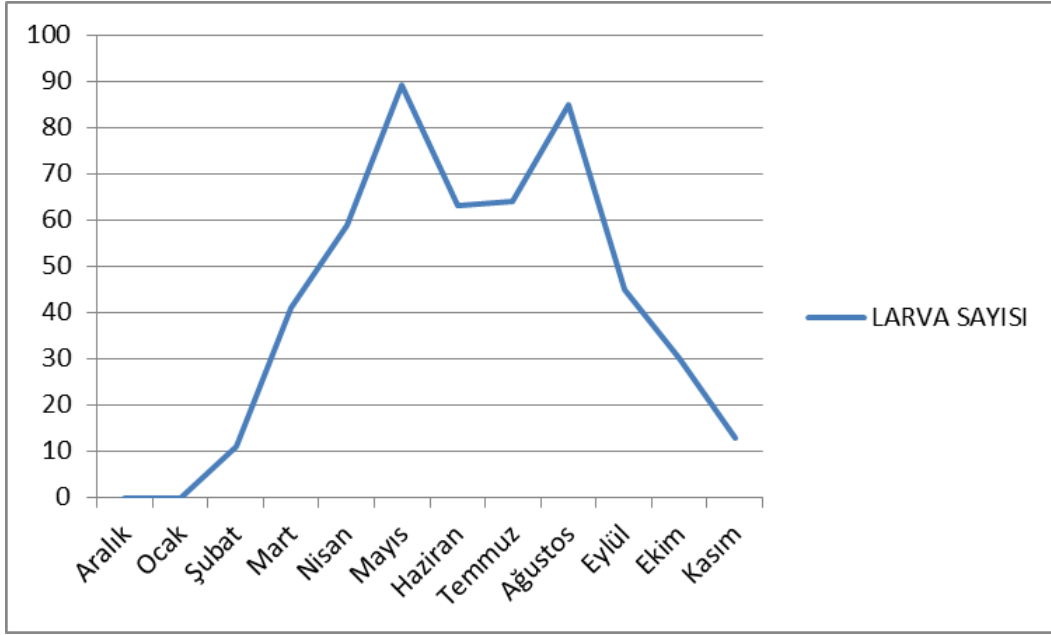
Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
I	38°48'42.70''K 34°25'37.77''D	Gülşehir	Aralık	1	7,8	0,07	7,7	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	69,2	5,96	51,6	77,8
			Ocak	0	7,7	0,08	7,5	7,8	6,5	0,07	6,3	6,6	73,2	3,42	64,5	80,0
			Şubat	0	7,8	0,06	7,6	7,9	6,6	0,05	6,5	6,7	67,3	4,78	56,9	80,0
			Mart	3	7,9	0,07	7,7	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	57,1	5,54	44,0	67,5
			Nisan	4	7,8	0,07	7,7	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	66,6	7,62	44,9	79,0
			Mayıs	5	7,9	0,05	7,7	7,9	11,7	0,28	11,0	12,3	57,3	4,96	46,0	66,0
			Haziran	4	7,8	0,14	7,4	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	4	7,8	0,06	7,7	8,0	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,8	0,09	7,5	7,9	12,3	0,10	12,0	12,5	63,0	3,10	56,9	68,6
			Eylül	2	7,8	0,08	7,7	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	69,1	0,59	67,5	70,0
			Ekim	2	7,8	0,14	7,4	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	0	7,9	0,02	7,9	8,0	10,5	0,08	10,3	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2
J	38°45'04.96''K 34°44'28.43''D	Avanos	Aralık	0	7,8	0,04	7,7	7,9	6,3	0,11	6,0	6,5	73,6	4,10	63,3	83,1
			Ocak	0	7,7	0,08	7,5	7,8	6,5	0,07	6,3	6,6	69,8	2,88	63,8	75,2
			Şubat	1	7,8	0,03	7,7	7,8	6,6	0,05	6,5	6,7	60,8	2,88	55,5	68,0
			Mart	2	7,8	0,07	7,7	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	65,7	3,95	55,2	74,3
			Nisan	2	7,9	0,05	7,8	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	55,1	3,77	45,8	61,2
			Mayıs	4	7,8	0,05	7,7	7,9	11,7	0,28	11,0	12,3	57,1	4,46	45,0	65,4
			Haziran	5	7,7	0,06	7,5	7,8	12,0	0,07	11,8	12,1	68,2	2,35	63,3	72,3
			Temmuz	3	7,7	0,11	7,5	8,0	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	3	7,8	0,06	7,7	8,0	12,3	0,06	12,2	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	3	7,7	0,06	7,5	7,8	11,3	0,12	11,0	11,5	67,9	1,11	64,9	70,0
			Ekim	1	7,8	0,06	7,6	7,9	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,8	0,05	7,7	7,9	10,6	0,05	10,5	10,7	76,2	2,55	69,0	80,3
K	38°43'58.15''K 34°46'56.48''D	Avanos	Aralık	1	7,8	0,04	7,7	7,9	6,3	0,11	6,0	6,5	72,6	3,05	65,0	79,9
			Ocak	1	7,8	0,04	7,7	7,9	6,5	0,07	6,3	6,6	72,6	5,68	62,3	85,5
			Şubat	0	7,9	0,07	7,8	8,1	6,5	0,12	6,3	6,7	68,9	1,24	66,0	72,0
			Mart	3	7,9	0,07	7,7	8,0	7,2	0,15	6,8	7,5	58,4	5,89	41,1	67,5
			Nisan	3	7,8	0,06	7,7	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	48,5	4,59	39,9	59,6
			Mayıs	3	7,8	0,08	7,7	8,0	11,7	0,24	11,2	12,3	45,7	3,66	35,6	52,1
			Haziran	4	7,8	0,11	7,5	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	8,0	0,06	7,8	8,1	12,3	0,10	12,0	12,5	61,1	2,95	55,5	68,0
			Eylül	2	8,0	0,03	7,9	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,8	1,41	66,0	72,6
			Ekim	1	7,9	0,05	7,8	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	2	7,8	0,12	7,5	8,0	10,5	0,08	10,3	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2
L	38°42'59.37''K 34°50'11.57''D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,06	7,7	8,0	6,3	0,11	6,0	6,5	71,3	4,26	60,3	78,8
			Ocak	1	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,05	6,5	6,7	68,6	6,34	51,0	81,2
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,8	0,03	6,7	6,8	60,8	3,46	52,3	67,7
			Mart	2	7,9	0,09	7,7	8,0	7,2	0,16	6,8	7,5	56,2	5,59	42,0	67,5
			Nisan	2	7,8	0,08	7,6	8,0	8,4	0,13	8,0	8,6	63,9	5,51	56,0	80,0
			Mayıs	4	7,8	0,09	7,6	8,0	11,7	0,25	11,0	12,2	54,0	4,01	49,0	66,0
			Haziran	3	7,9	0,06	7,7	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	2	7,7	0,05	7,6	7,8	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,8	0,06	7,7	8,0	12,3	0,10	12,0	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	1	7,8	0,12	7,5	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,9	0,06	7,8	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,8	0,09	7,6	8,0	10,5	0,08	10,3	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2

Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

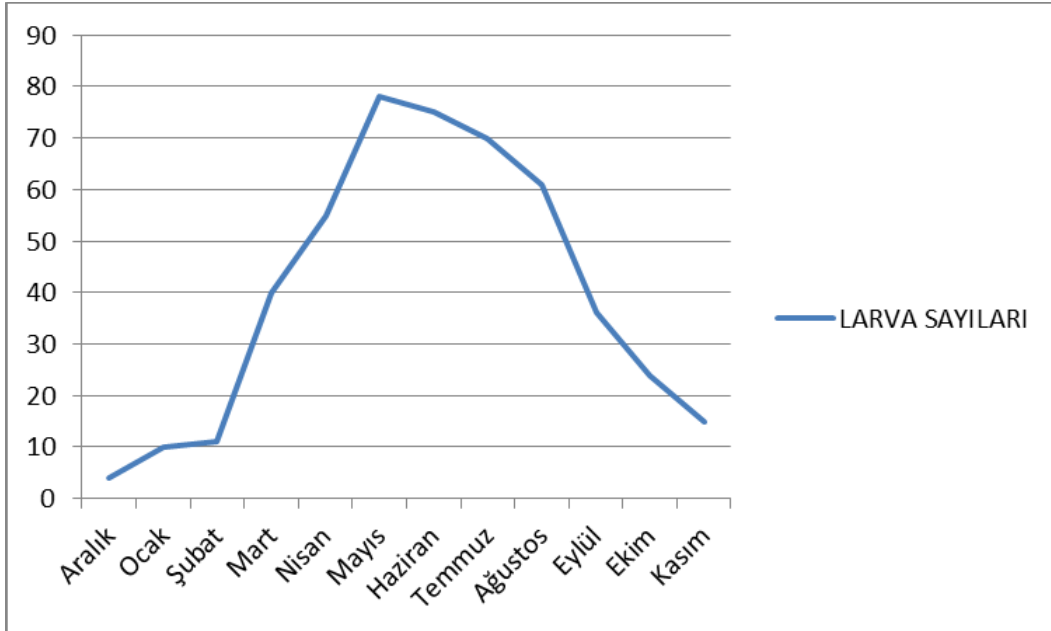
Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
M	38°43'55.67''K 34°53'48.96''D	Avanos	Aralık	0	7,8	0,09	7,6	8,0	6,2	0,14	5,9	6,5	74,0	3,08	65,0	78,0
			Ocak	0	7,7	0,04	7,6	7,8	6,4	0,10	6,2	6,6	69,9	2,72	62,3	75,0
			Şubat	0	7,8	0,04	7,7	7,9	6,7	0,06	6,5	6,8	55,2	4,26	45,0	65,0
			Mart	2	7,9	0,07	7,7	8,0	7,0	0,09	6,8	7,2	63,4	3,77	55,0	72,3
			Nisan	3	7,9	0,05	7,8	8,0	8,2	0,18	7,8	8,6	58,6	5,38	50,0	72,3
			Mayıs	5	7,8	0,08	7,7	8,0	11,6	0,20	11,0	11,9	60,8	6,58	45,3	77,1
			Haziran	3	8,0	0,05	7,8	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	4	7,8	0,09	7,6	8,0	12,0	0,02	12,0	12,1	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,7	0,07	7,5	7,8	12,3	0,10	12,0	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	2	7,8	0,09	7,6	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,9	0,05	7,8	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	0	7,7	0,10	7,4	7,9	10,5	0,08	10,3	10,7	76,7	3,21	68,1	83,2
N	38°45'10.83''K 34°42'56.72''D	Avanos	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,09	6,1	6,5	76,8	1,89	72,3	80,0
			Ocak	1	7,8	0,08	7,6	8,0	6,5	0,09	6,3	6,7	71,2	5,15	57,8	82,0
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,7	0,04	6,6	6,8	68,4	5,86	52,3	77,2
			Mart	1	7,9	0,07	7,7	8,0	7,2	0,07	7,0	7,3	66,2	3,80	55,2	72,3
			Nisan	3	7,8	0,08	7,6	8,0	8,4	0,15	8,0	8,7	66,1	5,89	52,3	80,0
			Mayıs	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,0	0,17	11,5	12,3	48,8	10,52	32,0	79,3
			Haziran	4	8,0	0,05	7,8	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	2	7,7	0,11	7,5	8,0	12,2	0,12	12,0	12,5	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	3	7,8	0,10	7,5	8,0	12,3	0,10	12,0	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	3	7,8	0,09	7,6	8,0	11,3	0,12	11,0	11,5	68,0	0,79	66,0	69,5
			Ekim	1	7,8	0,13	7,4	8,0	10,9	0,06	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,9	0,09	7,6	8,0	10,5	0,08	10,3	10,7	76,2	3,61	66,3	83,2
O	38°43'55.79''K 34°54'39.01''D	Avanos	Aralık	1	7,9	0,05	7,8	8,0	6,4	0,15	6,0	6,7	79,0	2,04	76,3	85,0
			Ocak	0	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,06	6,5	6,8	72,2	4,46	61,0	82,0
			Şubat	0	7,8	0,06	7,7	8,0	6,6	0,09	6,5	6,9	63,4	4,65	52,3	75,0
			Mart	0	7,8	0,08	7,7	8,0	6,9	0,09	6,8	7,2	62,1	2,24	57,0	67,9
			Nisan	3	7,9	0,06	7,8	8,0	8,1	0,17	7,9	8,6	58,3	6,66	45,0	76,0
			Mayıs	6	7,9	0,09	7,7	8,1	11,7	0,25	11,2	12,3	47,7	6,84	38,0	67,0
			Haziran	4	7,9	0,06	7,7	8,0	12,2	0,09	12,0	12,4	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	5	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,14	12,0	12,6	69,8	2,19	63,8	74,3
			Ağustos	3	7,7	0,13	7,4	8,0	12,4	0,17	12,0	12,8	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	2	7,9	0,09	7,7	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	2	7,8	0,06	7,7	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,9	0,06	7,7	8,0	10,4	0,08	10,2	10,5	76,9	3,01	69,0	83,2
P	38°43'58.52''K 34°55'10.66''D	Ürgüp	Aralık	0	8,0	0,06	7,9	8,2	6,1	0,22	5,7	6,5	73,1	5,23	58,0	82,0
			Ocak	1	7,7	0,05	7,6	7,8	6,4	0,11	6,1	6,6	74,4	0,89	72,0	76,0
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,7	0,02	6,7	6,8	62,9	5,10	52,2	76,0
			Mart	2	7,9	0,12	7,7	8,2	7,2	0,13	6,8	7,4	63,0	4,80	50,0	72,3
			Nisan	2	7,9	0,06	7,8	8,0	8,3	0,18	8,0	8,8	64,0	5,34	53,0	77,0
			Mayıs	4	7,9	0,09	7,7	8,1	12,0	0,11	11,8	12,3	62,1	4,69	49,0	71,2
			Haziran	3	8,0	0,03	7,9	8,0	12,2	0,05	12,1	12,3	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	4	7,8	0,08	7,6	8,0	12,2	0,12	12,0	12,5	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	6	7,9	0,08	7,7	8,0	12,5	0,18	12,2	13,0	61,4	4,10	52,1	68,6
			Eylül	1	7,9	0,12	7,7	8,2	11,3	0,11	11,0	11,5	67,7	0,84	66,0	70,0
			Ekim	1	7,8	0,06	7,7	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	0	7,8	0,08	7,7	8,0	10,6	0,08	10,5	10,8	76,9	3,01	69,0	83,2

Tablo 4.2. 2013 yılında toplanan simuliid larvalarının örnekleme istasyonu, koordinat verileri, bağlı olduğu merkez ve aylara göre dağılımları ile birlikte ölçülen pH, su sıcaklığı ve nem değerleri (Devamı)

Örnekleme İstasyonu	Koordinat	Bağlı Olduğu Merkez	Ay	Toplanan larva sayısı	pH				Su Sıcaklığı				Nem			
					Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max	Ort	Std. Hata	Min	Max
R	38°44'15.02''K 34°55'59.84''D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,1	0,13	5,8	6,4	73,6	2,72	67,0	80,0
			Ocak	0	7,8	0,08	7,6	8,0	6,5	0,11	6,3	6,8	70,6	1,04	68,2	73,2
			Şubat	1	7,9	0,05	7,8	8,0	6,7	0,13	6,4	7,0	60,5	3,51	54,0	68,0
			Mart	2	7,8	0,08	7,7	8,0	7,1	0,11	6,8	7,3	69,2	1,33	66,0	72,3
			Nisan	3	7,9	0,06	7,8	8,0	8,3	0,13	8,0	8,6	65,7	7,32	52,0	83,3
			Mayıs	5	7,9	0,09	7,7	8,1	11,7	0,28	11,0	12,3	55,2	6,25	37,7	66,0
			Haziran	4	7,8	0,13	7,4	8,0	12,2	0,09	12,0	12,4	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	3	7,8	0,10	7,6	8,0	12,2	0,14	12,0	12,6	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,9	0,06	7,8	8,0	12,4	0,17	12,0	12,8	62,9	3,23	55,5	68,6
			Eylül	2	7,9	0,07	7,7	8,0	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,8	0,13	7,4	8,0	10,8	0,06	10,6	10,9	62,9	2,72	56,3	69,0
			Kasım	1	7,8	0,11	7,5	8,0	10,5	0,05	10,3	10,5	76,9	3,01	69,0	83,2
S	38°44'39.24''K 34°56'23.15''D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,4	0,13	6,0	6,6	76,1	3,71	68,5	85,6
			Ocak	1	7,7	0,05	7,6	7,8	6,6	0,12	6,3	6,8	72,7	3,35	63,8	78,6
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,8	0,14	6,5	7,1	64,8	6,37	49,1	80,0
			Mart	2	7,8	0,11	7,5	8,0	6,9	0,15	6,5	7,2	63,7	5,78	52,0	78,1
			Nisan	3	7,9	0,06	7,8	8,0	8,1	0,17	7,9	8,6	62,2	7,42	45,0	79,0
			Mayıs	4	7,8	0,09	7,6	8,0	11,7	0,25	11,0	12,1	50,3	6,07	37,1	66,0
			Haziran	4	7,9	0,12	7,5	8,0	12,2	0,05	12,1	12,3	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	2	7,8	0,09	7,6	8,0	12,2	0,12	12,0	12,5	69,8	2,20	63,8	74,3
			Ağustos	2	7,9	0,06	7,7	8,0	12,4	0,11	12,2	12,7	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	2	7,8	0,15	7,5	8,2	11,3	0,11	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,9	0,06	7,8	8,0	11,0	0,11	10,8	11,3	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	7,9	0,07	7,7	8,0	10,7	0,12	10,5	11,0	76,9	3,01	69,0	83,2
T	38°44'15.74''K 34°56'22.41''D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,12	7,5	8,0	6,4	0,13	6,0	6,6	76,2	1,34	72,3	78,1
			Ocak	0	7,9	0,13	7,6	8,2	6,6	0,06	6,5	6,8	72,0	2,98	63,8	77,0
			Şubat	0	7,8	0,09	7,6	8,0	6,8	0,12	6,5	7,0	61,3	5,16	49,1	72,1
			Mart	1	7,8	0,08	7,7	8,0	7,2	0,16	6,8	7,5	56,3	5,21	44,0	67,5
			Nisan	2	7,9	0,06	7,8	8,0	8,4	0,13	8,0	8,6	60,1	7,37	45,0	79,0
			Mayıs	5	7,9	0,09	7,7	8,1	11,8	0,18	11,5	12,3	54,6	4,57	46,0	66,0
			Haziran	4	8,0	0,02	7,9	8,0	12,0	0,07	11,8	12,1	67,9	2,21	63,3	72,3
			Temmuz	2	8,0	0,10	7,8	8,2	12,0	0,02	12,0	12,1	68,6	2,29	63,8	74,3
			Ağustos	4	7,7	0,15	7,3	8,0	12,3	0,17	12,0	12,8	63,2	2,99	56,9	68,6
			Eylül	2	7,7	0,13	7,3	7,9	11,3	0,10	11,0	11,5	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	2	7,9	0,06	7,8	8,0	10,9	0,05	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	0	7,8	0,11	7,6	8,1	10,5	0,08	10,3	10,7	76,9	3,01	69,0	83,2
U	38°44'32.87''K 34°56'57.48''D	Ürgüp	Aralık	0	7,9	0,05	7,8	8,0	6,3	0,08	6,2	6,5	71,9	6,83	51,6	81,1
			Ocak	0	7,9	0,08	7,7	8,0	6,6	0,09	6,3	6,7	72,4	2,76	64,5	77,0
			Şubat	1	7,8	0,06	7,7	8,0	6,7	0,03	6,6	6,7	62,3	5,90	49,1	76,1
			Mart	2	8,0	0,13	7,7	8,3	7,2	0,14	6,8	7,4	64,9	5,45	52,0	78,1
			Nisan	3	7,8	0,04	7,7	7,9	8,4	0,07	8,3	8,6	65,7	7,62	45,0	79,0
			Mayıs	4	7,9	0,06	7,7	8,0	11,8	0,19	11,5	12,3	57,9	5,31	46,0	67,7
			Haziran	3	7,8	0,13	7,4	8,0	12,1	0,04	12,0	12,2	67,3	1,99	63,3	72,3
			Temmuz	2	7,8	0,10	7,5	8,0	12,1	0,06	12,0	12,3	69,1	2,17	63,8	74,3
			Ağustos	3	7,8	0,02	7,7	7,8	12,4	0,10	12,1	12,5	62,3	3,51	55,5	68,6
			Eylül	2	7,9	0,07	7,7	8,0	11,3	0,09	11,2	11,6	68,1	0,88	66,0	70,0
			Ekim	1	7,9	0,05	7,8	8,0	10,9	0,04	10,8	11,0	62,5	2,63	56,3	69,0
			Kasım	1	8,0	0,03	7,9	8,0	10,6	0,08	10,5	10,8	76,9	3,01	69,0	83,2



Şekil 4.1. 2012 yılında toplanan larva sayılarının aylara göre dağılımı



Şekil 4.2. 2013 yılında toplanan larva sayılarının aylara göre dağılımı

Tablo 4.3. 2012 yılı için aylık olarak ölçülen pH, su sıcaklığı ve nisbi nem değerleri ile larva sayıları arasındaki istatistiksel ilişki (Independent-Samples T Test)

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
pH	Equal variances assumed	.	.	-,405	63	,687	-,03594	,08864	-,21306	,14119
	Equal variances not assumed	.	.	.	.	.	-,03594	.	.	.
susicakligi	Equal variances assumed	.	.	-2,833	63	,006	-4,70312	1,66013	-8,02064	-1,38561
	Equal variances not assumed	.	.	.	.	.	-4,70312	.	.	.
nem	Equal variances assumed	.	.	,511	63	,611	4,15781	8,14363	-12,11592	20,43155
	Equal variances not assumed	.	.	.	.	.	4,15781	.	.	.

Tablo 4.4. 2013 yılı için aylık olarak ölçülen pH, su sıcaklığı ve nisbi nem değerleri ile larva sayıları arasındaki istatistiksel ilişki (Independent-Samples T Test)

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
pH	Equal variances assumed	5,859	,020	-,799	42	,429	-,05238	,06557	-,18471	,07995
	Equal variances not assumed	.	.	-3,702	41,000	,001	-,05238	,01415	-,08096	-,02381
susicakligi	Equal variances assumed	,637	,429	-4,874	42	,000	-5,07143	1,04061	-7,17146	-2,97140
	Equal variances not assumed	.	.	-11,061	1,722	,013	-5,07143	,45851	-7,38262	-2,76023
nem	Equal variances assumed	,779	,382	3,610	42	,001	15,66190	4,33813	6,90721	24,41660
	Equal variances not assumed	.	.	2,267	1,035	,258	15,66190	6,90972	-65,36227	96,68608

4.2. Morfolojik ve Kromozomal İdentifikasyon Sonuçları

4.2.1. Morfolojik analiz

Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik ve kromozomal identifikasyon sonuçları Tablo 4.5'de verilmiştir. Larvaların morfolojik incelemesinde; labral fanların varlığı (Şekil 4.3), vücutta tüberküllerin bulunmaması (Şekil 4.3), cephalic apotome'nin posterior bölümünde genişlemesi ve ecdysial çizginin belirgin çıkıntı göstermemesi (Şekil 4.4), ventral papilin yokluğu (Şekil 4.5), hypostoma'da santral ve lateral dişlerin iyi gelişmiş olması (Şekil 4.6), posterior çengel halkasının ventralde dorsaldeki bölümüne oranla daha geniş olması ve bir sırada 25'ten fazla çengelin

bulunması (Şekil 4.7) gibi morfolojik kriterlerle incelenen larvaların *S. Wilhelmsia* alt soyunda oldukları belirlenmiştir. *S. Wilhelmsia* alt soyundaki türlerin ayrımında diğer birçok *Simulium* türünde olduğu gibi solungaç histoblastının morfolojik özellikleri en önemli kriterdir. İncelenen larvalarda solungaç histoblastının median filamentlerinin lateraldekilere oranla daha dar olması ile (Şekil 4.8) örneklerin tür teşhisi *S. Wilhelmsia lineatum* veya *S. Wilhelmsia balcanicum*'a indirgenmiştir. Bu iki türün ayrımında ise solungaç histoblastının mediandaki iki filamentinin tabanda birleşip çatallanması ile *S. Wilhelmsia balcanicum* (Şekil 4.9), solungaç histoblastının tüm filamentlerinin birbirinden ayrı olması ile de *S. Wilhelmsia lineatum* (Şekil 4.10) teşhisleri konulmuştur.

Tablo 4.5. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik ve kromozomal identifikasyon sonuçları

Tür	Gölşehir		Avanos		Ürgüp		Toplam	
	MA	KA	MA	KA	MA	KA	MA	KA
<i>S. Wilhelmsia</i> spp.*	208	-	151	-	101	-	460	-
<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	150	178	94	130	85	111	329	419
<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	64	91	57	83	69	79	190	253
Toplam	422	256	302	206	255	184	979	672

MA: Morfolojik analiz; KA Kromozomal analiz

* Erken dönem larvalar. Gill histoblast gelişimi tamamlanmamış. Teşhis soy altı düzeyinde yapılmıştır. Bu gruptan 212 adet larva kromozomal analizlerle tür teşhisi yapılmıştır.



Şekil 4.3. *Simulium* larvası (Orijinal)



Şekil 4.4. Cephalic apotome'nin posterior bölümünde genişleme ve ecdysial çizgi (Orijinal)



Şekil 4.5. Ventral papil yokluğu (Orijinal)



Şekil 4.6. Hypostomdaki dişler (Orijinal)



Şekil 4.7. Posterior çengel halkası (Orijinal)



Şekil 4.8. Solungaç histoblastı (Orijinal)



Şekil 4.9. Solungaç histoblastı filamentleri (*S. Wilhelmsia balcanicum*) (Orijinal)



Şekil 4.10. Solungaç histoblastı filamentleri (*S. Wilhelmsia lineatum*) (Orijinal)

4.2.2. Kromozom analizi

Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılan kromozomal analizlerde *S. lineatum*'un larva başına heterozigot inversion ve polimorfizm oranının %0.25'den daha az olduğu ve incelenen larva örneklerinin 13 inversion gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca 1 dişi ve 2 erkek *S. lineatum* larvasında çekirdeğin yaklaşık %40'ında chromocenter'da B kromozomları bulunmuştur.

Simulium balcanicum larva örneklerinde ise polimorfizm ve heterozigot inversionların daha düşük olduğu ve sadece iki inversionun görüldüğü belirlenmiştir. *S. balcanicum* ve *S. lineatum*'da bütün nukleuslarda chromocenterin var olması bu iki türün aynı soy altındaki *S. equinum* ve *S. pseudequinum*'dan ayrımında belirgin bir marker olduğu saptanmıştır.

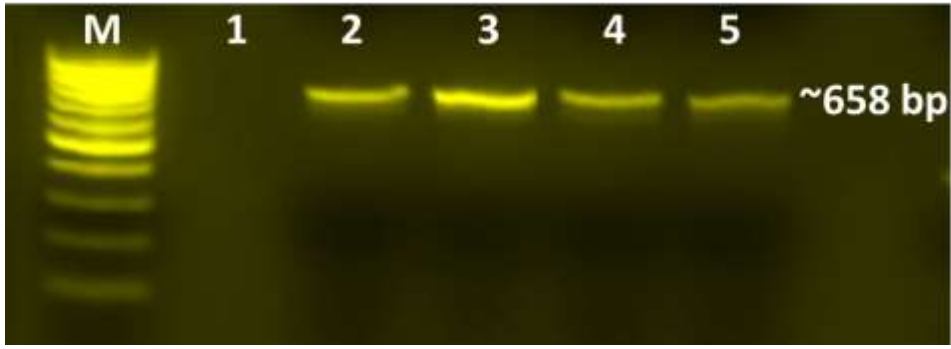
S. balcanicum'un *S. lineatum*'dan kromozomal olarak iki sabit (IS-4 ve IL-11), iki sabite yakın (sıklık > 0.92) inversionlar(IIIL-9 and IIIL-10) ve yaklaşık 100 unique polymorphismle ayırt edilebildiği ortaya konmuştur.

S. balcanicum'da polimorfizm düşük belirlenmiş ve farklı cytoformlarına rastlanılmamıştır. *S. lineatum*'da kromozomal polimorfizm yüksek saptanmış ve iki ayrı cytoformunun (A ve B) olduğu belirlenmiştir. Cytoform A'ya daha çok İngiltere ve Almanya izolatlarında rastlanırken, Cytoform B ise daha çok Türkiye izolatlarında bulunmuştur. Cytoform A'nın cytoform B'den daha yüksek polimorfizm göstermesi ve özellikle kromozomların yarısından fazlasında IS-4, IL-10, IL-11, IIL-9, ve IIIL-5 inverziyonların görülmesiyle ayrıldığı belirlenmiştir.

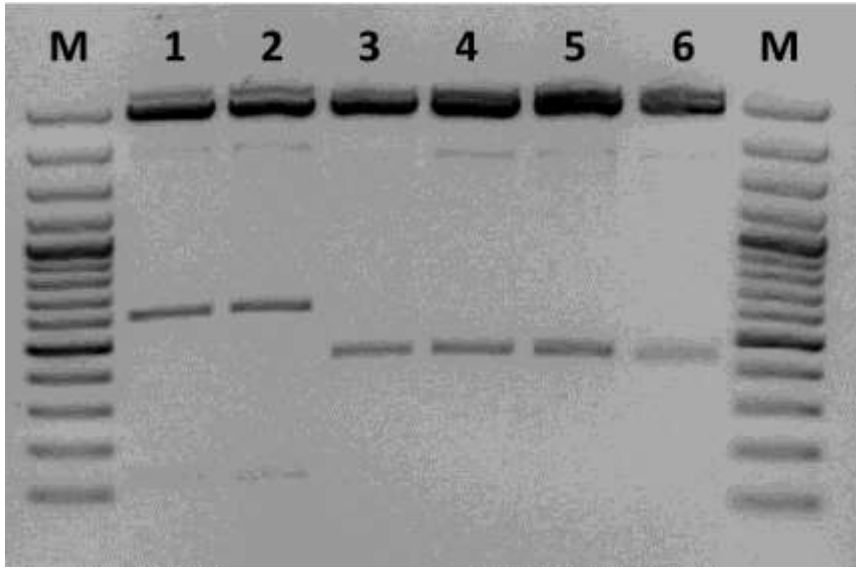
4.3. Simuliid larvalarının mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) ve nükleer internal transcript spacer 2 (ITS-2/28S) gen bölgelerinin sekans analizi ve moleküler Karakterizasyonu

4.3.1. Mt-COI gen bölgesi sekansları ve filogenetik analizi

Moleküler analizlere tabii tutulan larva örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktlarının spesifik primerler ile parsiyel amplifikasyonları sonucu agaroz jel üzerinde mt-COI gen bölgesi için yaklaşık 658 bp (Şekil 4.11), büyüklükte DNA bantları olduğu belirlenmiştir. Uygun konsantrasyondaki larva örneklerine ait ampikonlar jel pürifiye edilmiş ve sekanslanmıştır. Ayrıca bazı larva örnekleri full dizilimlerin elde edilmesi amacıyla klonlanmış ve plasmid eldesinden sonra sekanslanmışlardır. Bazı klonlanmış larva örneklerine ait plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile muamelesi sonrası insert hedef DNA bölgesinin jel üzerinde görünümü Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Simuliid larvalarının parsiyel mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu sonucu elde edilen ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1: No DNA; 2,3: *S. Wilhelmia lineatum*; 4,5: *S. Wilhelmia balcanicum*



Şekil 4.12. Simuliid larvalarının klonlanan ITS2/ 28S ve mt-COI gen bölgeleri plasmidlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası insertlerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1-2: *S. Wilhelmia lineatum* (mt-COI); 3,4: *S. Wilhelmia lineatum* (ITS-2/28S); 5,6: *S. Wilhelmia balcanicum*(ITS-2/28S)

Araştırma yöresinde morfolojik ve kromozomal analizlerle tür teşhisleri belirlenen mt-COI gen bölgesi için toplam 31 (NKS 1-31) izolatın ilgili gen bölgeleri yönünden sekans analizleri yapılmış ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizlere ayrıca Almanya orijinli Clemson Üniversitesinden gönderilen ve kromozom analizleri ile tür teşhisleri yapılmış bazı larva örnekleri de sekanslanarak dahil edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Araştırma yöresinde Mt-COI gen bölgesine göre filogenetik analizi yapılan izolatların dahil olduğu tür, izolasyon yeri, DNA izolasyon kaynakları ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	İzolasyon Yeri	DNA izolasyon orijini	Tür	Aksesyon No
NKS 1	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	JX441376
NKS 2	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	JX441377
NKS 3	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	JX441378
NKS 4	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	JX441379
NKS 5	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	JX441380
NKS 6	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	JX441381
NKS 7	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	JX441382
NKS 8	Gölşehir	Pupa	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	JX441383
NKS 9	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 10	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 11	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF155168
NKS 12	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF155168
NKS 13	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 14	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 15	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 16	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF155168
NKS 17	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF155168
NKS 18	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF155168
NKS 19	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990249
NKS 20	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990250
NKS 21	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990251
NKS 22	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990252
NKS 23	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990253
NKS 24	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990254
NKS 25	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990255
NKS 26	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990256
NKS 27	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990257
NKS 28	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990258
NKS 29	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990259
NKS 30	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990260
NKS 31	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990261

Germany1	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	JX444909
Germany2	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	JX444910
Germany3	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia equinum</i>	JX444911
Germany4	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990262
Germany5	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990263
Germany6*	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia equinum</i>	KF990264
Germany7	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia equinum</i>	KF990265

* Klonlanmış izolatlar

Araştırma yöresinde mt-COI gen bölgesi yönünden nükleotid dizileri ortaya konan *Simulium* izolatları ile Almanya'dan temin edilen izolatların nükleotid kompozisyonları Tablo 4.7'de, pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları ise Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Multiple alignmentları yapılan izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	G+C (%)	A+T (%)	Toplam nükleotid sayısı
NKS31	36,9	16,3	29,9	16,9	33,2	66,8	662,0
NKS30	38,4	15,8	29,2	16,7	32,4	67,6	558,0
NKS29	37,4	16,8	29,5	16,3	33,1	66,9	631,0
NKS28	36,8	16,6	29,3	17,3	33,9	66,1	655,0
NKS27	36,9	16,5	29,5	17,1	33,6	66,4	654,0
NKS26	37,7	16,3	29,0	17,0	33,3	66,7	682,0
NKS25	37,4	16,0	29,7	16,8	32,9	67,1	636,0
NKS24	37,5	16,3	28,8	17,4	33,7	66,3	674,0
NKS23	37,4	16,2	28,9	17,5	33,7	66,3	679,0
NKS22	37,9	16,1	29,0	17,0	33,1	66,9	665,0
NKS21	37,4	16,7	29,1	16,8	33,5	66,5	666,0
NKS20	37,0	16,9	28,9	17,2	34,1	65,9	662,0
NKS19	37,8	16,3	29,1	16,9	33,1	66,9	670,0
NKS18	37,6	16,2	29,3	16,9	33,1	66,9	692,0
NKS17	37,2	16,6	29,4	16,8	33,4	66,6	643,0
NKS16	37,1	16,1	29,4	17,4	33,5	66,5	690,0
NKS15	37,0	16,3	29,9	16,8	33,2	66,8	606,0
NKS14	37,6	16,2	29,6	16,6	32,8	67,2	631,0
NKS13	37,2	16,2	29,5	17,1	33,3	66,7	691,0
NKS12	36,7	17,0	29,5	16,8	33,8	66,2	654,0
NKS11	37,2	16,5	29,1	17,1	33,7	66,3	659,0
NKS10	37,8	15,9	29,1	17,2	33,1	66,9	674,0
NKS9	36,5	17,1	29,1	17,3	34,4	65,6	654,0
NKS8	35,7	17,0	29,3	18,0	35,0	65,0	294,0
NKS7	35,3	16,3	30,8	17,6	33,9	66,1	221,0
NKS6	37,6	16,2	29,2	17,0	33,2	66,8	672,0
NKS5	37,6	16,2	29,6	16,6	32,8	67,2	631,0

NKS4	37,2	16,6	29,4	16,8	33,4	66,6	643,0
NKS3	36,4	15,8	30,7	17,1	32,9	67,1	538,0
NKS2	37,5	16,2	29,5	16,8	32,9	67,1	674,0
NKS1	37,5	16,8	29,4	16,3	33,2	66,8	630,0
Germany7	34,8	20,0	27,7	17,5	37,5	62,5	520,0
Germany6	34,3	19,6	28,1	18,1	37,7	62,3	709,0
Germany5	36,9	16,9	29,5	16,6	33,5	66,5	650,0
Germany4	35,9	17,8	29,7	16,6	34,4	65,6	471,0
Germany3	35,7	19,2	27,3	17,9	37,0	63,0	532,0
Germany2	38,0	15,8	30,2	16,0	31,8	68,2	600,0
Germany1	38,4	15,9	29,6	16,1	31,9	68,1	554,0
Ortalama	37,1	16,6	29,3	17,0	33,6	66,4	616,5

Tablo 4.8. mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları

	MS31	MS30	MS29	MS28	MS27	MS26	MS25	MS24	MS23	MS22	MS21	MS20	MS19	MS18	MS17	MS16	MS15	MS14	MS13	MS12	MS11	MS10	MS9	MS8	MS7	MS6	MS5	MS4	MS3	MS2	MS1	Germany7	Germany6	Germany5	Germany4	Germany3	Germany2	Germany1	
MS31		97.9%	97.7%	98.7%	97.6%	98.7%	97.7%	97.8%	98.8%	98.1%	98.7%	97.6%	98.7%	98.7%	97.5%	98.8%	97.7%	97.7%	97.9%	98.7%	99.7%	98.2%	97.6%	99.3%	98.2%	98.0%	97.7%	97.5%	99.3%	99.4%	99.7%	97.4%	88.1%	99.7%	97.0%	88.9%	99.1%	96.9%	
MS30	97.9%		97.7%	97.7%	97.5%	97.7%	97.5%	98.8%	97.7%	98.6%	97.3%	98.8%	97.7%	97.7%	97.5%	97.7%	98.2%	97.5%	99.8%	97.3%	97.7%	99.6%	99.8%	97.3%	99.5%	99.8%	97.5%	97.5%	97.6%	97.7%	97.7%	88.1%	88.2%	98.2%	96.9%	88.4%	98.0%	96.7%	
MS29	97.7%	97.7%		97.5%	99.5%	97.5%	97.8%	97.3%	97.1%	97.4%	97.5%	97.3%	97.5%	97.5%	99.5%	97.1%	98.0%	97.8%	97.2%	97.5%	97.5%	97.4%	97.2%	97.3%	98.6%	97.3%	97.8%	99.5%	97.9%	97.4%	97.5%	88.4%	88.4%	97.9%	98.0%	88.9%	97.6%	97.3%	
MS28	98.7%	97.7%	97.5%		97.4%	100%	97.8%	97.5%	98.5%	97.8%	98.5%	97.4%	100%	100%	97.3%	98.5%	97.7%	97.8%	97.5%	98.5%	100%	97.8%	97.4%	99.3%	98.2%	97.7%	97.8%	97.3%	99.4%	99.2%	100%	88.0%	88.4%	99.4%	96.7%	88.9%	98.8%	96.5%	
MS27	97.6%	97.5%	98.5%	97.4%		97.4%	97.3%	97.2%	97.1%	97.3%	97.1%	96.9%	97.4%	97.4%	100%	97.1%	97.5%	97.3%	97.2%	97.1%	97.4%	97.3%	96.9%	96.9%	98.2%	97.2%	97.3%	100%	97.8%	97.3%	97.3%	88.4%	88.2%	97.7%	97.8%	88.5%	97.3%	96.9%	
MS26	98.7%	97.7%	97.5%	100%	97.4%		97.8%	97.6%	98.5%	97.8%	98.5%	97.4%	100%	100%	97.3%	98.5%	97.7%	97.8%	97.6%	98.5%	100%	97.9%	97.4%	99.3%	98.2%	97.8%	97.8%	97.3%	99.4%	99.3%	100%	88.1%	88.4%	99.4%	96.8%	88.9%	98.8%	96.5%	
MS25	97.7%	97.5%	97.8%	97.8%	97.3%	97.8%		97.3%	97.2%	97.6%	96.9%	97.8%	97.8%	97.8%	97.3%	97.2%	99.8%	100%	97.3%	96.9%	97.8%	97.6%	97.0%	97.3%	97.3%	97.3%	100%	97.3%	97.6%	97.5%	97.7%	87.3%	87.6%	97.8%	96.7%	88.3%	97.6%	96.5%	
MS24	97.8%	98.8%	97.3%	97.5%	97.2%	97.6%	97.3%		97.6%	98.4%	97.8%	98.5%	97.6%	97.6%	97.2%	97.6%	98.2%	97.3%	100%	96.9%	97.6%	99.4%	99.5%	96.9%	100%	99.9%	97.3%	97.2%	97.4%	97.6%	97.6%	88.4%	88.7%	98.0%	96.7%	88.9%	97.8%	96.5%	
MS23	98.8%	97.7%	97.1%	98.5%	97.1%	98.5%	97.2%	97.6%		97.8%	98.5%	97.4%	98.5%	98.5%	97.8%	100%	97.4%	97.1%	97.6%	98.5%	98.5%	97.8%	97.4%	98.0%	97.3%	97.8%	97.1%	97.0%	97.9%	99.1%	88.4%	87.4%	97.8%	98.8%	96.7%	88.0%	98.1%	96.1%	
MS22	98.1%	98.6%	97.4%	97.8%	97.3%	97.9%	97.6%	98.4%	97.9%		97.3%	98.2%	97.9%	97.9%	97.3%	97.9%	98.0%	97.6%	99.4%	97.2%	97.8%	100%	99.2%	96.9%	99.1%	99.5%	97.6%	97.3%	97.5%	97.9%	97.7%	87.6%	88.0%	88.1%	96.5%	88.5%	97.9%	96.7%	
MS21	98.7%	97.3%	97.5%	98.5%	97.1%	98.5%	96.9%	97.8%	98.5%	97.3%		97.4%	98.5%	98.5%	97.3%	98.5%	97.8%	97.1%	97.8%	100%	96.5%	97.3%	97.4%	98.0%	97.3%	97.1%	97.1%	97.3%	98.3%	99.1%	98.7%	87.9%	88.0%	98.9%	97.2%	88.5%	98.5%	96.5%	
MS20	97.6%	98.8%	97.3%	97.4%	96.9%	97.4%	97.8%	98.5%	97.4%	98.2%	97.4%		97.4%	97.4%	97.2%	97.4%	98.2%	97.3%	99.5%	97.4%	97.4%	99.2%	100%	96.9%	100%	99.7%	97.3%	97.2%	97.1%	97.4%	97.6%	88.4%	88.4%	97.8%	96.7%	88.9%	97.8%	96.5%	
MS19	98.7%	97.7%	97.5%	100%	97.4%	100%	97.8%	97.6%	98.5%	97.9%	98.5%	97.4%		100%	97.3%	98.5%	97.7%	97.8%	97.6%	98.5%	100%	97.9%	97.4%	99.3%	98.2%	97.7%	97.8%	97.3%	99.4%	99.2%	100%	88.0%	88.4%	99.4%	96.7%	88.9%	98.8%	96.5%	
MS18	98.7%	97.7%	97.5%	100%	97.4%	100%	97.8%	97.6%	98.5%	97.8%	98.5%	97.4%	100%		97.3%	98.5%	97.7%	97.8%	97.7%	98.5%	100%	97.9%	97.4%	99.3%	98.2%	97.8%	97.8%	97.3%	99.4%	99.3%	100%	88.1%	88.6%	99.4%	96.8%	88.9%	98.8%	96.5%	
MS17	97.5%	97.5%	98.5%	97.3%	100%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%		97.8%	97.5%	97.3%	97.2%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.2%	96.9%	98.2%	97.1%	97.3%	100%	97.8%	97.3%	97.3%	88.4%	88.2%	97.8%	97.8%	88.5%	97.3%	96.9%	
MS16	98.8%	97.7%	97.1%	98.5%	97.1%	98.5%	97.2%	97.6%	100%	97.9%	98.5%	97.4%	98.5%	98.5%	97.8%		97.4%	97.1%	97.7%	98.5%	98.5%	97.9%	97.4%	98.0%	97.3%	97.8%	97.1%	97.0%	98.0%	99.1%	88.4%	87.4%	88.0%	98.8%	96.7%	88.0%	98.1%	96.1%	
MS15	97.7%	98.2%	98.8%	97.7%	97.5%	97.7%	98.8%	98.2%	97.4%	98.8%	97.8%	98.2%	97.7%	97.7%	97.5%	97.4%		99.8%	98.2%	97.8%	97.7%	98.0%	98.2%	97.3%	100%	98.2%	99.0%	97.5%	97.5%	97.4%	97.7%	87.4%	87.6%	97.9%	96.4%	88.6%	97.6%	96.2%	
MS14	97.7%	97.5%	97.8%	97.3%	97.8%	100%	97.3%	97.1%	97.6%	97.1%	97.3%	97.8%	97.3%	97.1%	99.8%		97.3%	97.1%	97.8%	97.6%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	100%	97.3%	100%	97.5%	97.7%	87.3%	87.6%	97.9%	96.7%	88.3%	97.6%	96.5%		
MS13	97.9%	98.8%	97.3%	97.5%	97.2%	97.6%	97.3%	100%	97.6%	98.4%	97.8%	98.5%	97.6%	97.7%	97.2%	97.7%	98.2%	97.3%		96.8%	97.6%	99.4%	99.5%	96.9%	100%	99.9%	97.3%	97.2%	97.4%	97.6%	97.6%	88.4%	89.0%	98.0%	96.7%	88.9%	97.8%	96.5%	
MS12	98.7%	97.3%	97.5%	98.5%	97.1%	98.5%	96.9%	98.5%	97.3%	100%	97.4%	98.5%	98.5%	97.3%	98.5%	97.8%	97.1%	96.9%		98.5%	97.2%	97.4%	98.0%	97.3%	97.1%	97.1%	97.3%	98.2%	99.1%	98.7%	87.9%	87.9%	98.9%	97.2%	88.5%	98.5%	96.5%		
MS11	98.7%	97.7%	97.5%	100%	97.4%	100%	97.8%	97.6%	98.5%	97.8%	98.5%	97.4%	100%	100%	97.3%	98.5%	97.7%	97.8%	97.6%		97.8%	97.4%	99.3%	98.2%	97.7%	97.8%	97.3%	99.4%	99.2%	100%	88.0%	88.3%	99.4%	96.7%	88.9%	98.8%	96.5%		
MS10	98.2%	98.6%	97.4%	97.8%	97.3%	97.9%	97.6%	98.4%	97.9%	100%	97.3%	98.2%	97.9%	97.9%	97.3%	97.9%	98.0%	97.6%	99.4%	97.2%	97.8%		99.2%	96.9%	99.1%	99.6%	97.6%	97.3%	97.6%	97.9%	97.7%	87.6%	88.1%	88.1%	96.5%	88.5%	97.9%	96.7%	
MS9	97.6%	98.8%	97.3%	97.4%	96.9%	97.4%	97.8%	98.5%	97.4%	98.2%	97.4%	100%	97.4%	97.4%	97.2%	97.4%	98.2%	97.3%	99.5%	97.4%	97.4%	99.2%		96.9%	100%	99.7%	97.3%	97.2%	97.0%	97.4%	97.6%	88.4%	88.4%	97.8%	96.7%	88.9%	97.8%	96.5%	
MS8	98.3%	97.3%	97.3%	98.3%	96.9%	98.3%	97.3%	96.9%	98.3%	98.3%	96.9%	98.3%	98.3%	96.9%	98.3%	98.3%	96.9%	98.3%	98.3%	96.9%	98.3%	98.3%	96.9%		97.3%	96.9%	97.3%	96.9%	98.6%	99.0%	99.3%	87.0%	87.1%	99.3%	95.7%	87.4%	99.0%	96.9%	
MS7	98.2%	98.5%	98.6%	98.2%	98.2%	98.2%	97.3%	100%	97.3%	99.1%	97.3%	100%	98.2%	98.2%	98.2%	97.3%	100%	97.3%	98.2%	99.1%	100%	97.7%		100%	97.3%	98.2%	97.7%	97.7%	98.2%	99.3%	99.1%	98.2%	97.1%	99.6%	98.2%	97.3%			
MS6	98.8%	98.8%	97.3%	97.7%	97.2%	97.8%	97.3%	98.9%	97.8%	98.5%	97.1%	98.7%	97.7%	97.8%	97.1%	97.8%	98.2%	97.3%	99.9%	97.1%	97.7%	99.6%	99.7%	96.9%	100%		97.3%	97.1%	97.6%	97.8%	97.6%	88.2%	88.5%	98.0%	96.7%	88.9%	97.8%	96.5%	
MS5	97.7%	97.5%	97.8%	97.8%	97.3%	97.8%	100%	97.3%	97.1%	97.6%	97.1%	97.3%	97.8%	97.8%	97.3%	97.1%	99.8%	100%	97.3%	97.1%	97.8%	97.6%	97.3%	97.3%	97.3%		97.3%	97.6%	97.5%	97.7%	87.3%	87.6%	97.9%	96.7%	88.3%	97.6%	96.5%		
MS4	97.5%	97.5%	98.5%	97.3%	100%	97.3%	97.3%	97.2%	97.8%	97.3%	97.3%	97.2%	97.3%	97.3%	97.3%	100%	97.8%	97.5%	97.3%	97.2%	97.3%	97.3%	97.2%	96.9%	98.2%	97.1%	97.3%		97.8%	97.3%	97.3%	88.4%	88.2%	97.8%	97.8%	88.5%	97.3%	96.9%	
MS3	98.3%	97.6%	97.9%	98.4%	97.8%	98.4%	97.6%	97.4%	97.9%	97.5%	98.3%	97.1%	98.4%	98.4%	97.8%	98.8%	97.5%	97.6%	97.4%	98.2%	99.4%	97.6%	97.0%	98.6%	97.7%	97.6%	97.6%		88.9%	99.4%	89.0%	89.4%	99.0%	97.1%	89.6%	98.4%	97.0%		
MS2	98.4%	97.7%	97.4%	98.2%	97.3%	98.3%	97.5%	97.6%	98.1%	97.8%	98.1%	97.4%	98.2%	98.2%	97.3%	99.1%	97.4%	97.5%	97.6%	99.1%	99.2%	97.9%	97.4%	99.0%	97.7%	97.8%	97.5%	97.3%	88.9%		99.2%	87.6%	88.1%	99.4%	96.9%	88.7%	98.8%	96.5%	
MS1	98.7%	97.7%	97.5%	100%	97.3%	100%	97.6%	98.4%	97.7%	98.7%	98.4%	97.7%	98.7%	100%	100%	97.3%	98.4%	97.7%	97.7%	97.6%	98.7%	100%	97.7%	97.6%	99.3%	98.2%	97.6%	97.7%	97.6%	99.4%	99.2%		88.0%	88.4%	99.5%	96.7%	88.9%	98.8%	96.5%
Germany7	97.4%	88.1%	88.4%	88.4%	88.4%	88.1%	87.3%	88.4%	87.7%	87.9%	88.4%	88.8%	88.3%	88.4%	87.4%	87.4%	88.4%	88.0%	88.4%	88.0%	88.4%	88.0%	88.4%	88.4%	87.1%	89.1%	88.5%	87.6%	88.2%	89.4%	88.1%	88.4%	99.8%		88.5%	88.1%	98.9%	88.3%	88.3%
Germany6	88.1%	88.2%	88.4%	88.4%	88.2%	88.4%	87.6%	88.7%	87.8%	88.8%	88.8%	88.4%	88.4%	88.6%	88.2%	88.8%	87.6%	87.6%	89.8%	87.9%	88.3%	88.1%	88.4%	87.1%	89.1%	88.5%	87.6%	88.2%	89.4%	88.1%	88.4%	99.8%		88.5%	88.1%	98.9%	88.3%	88.3%	
Germany5	98.7%	98.2%	97.9%	98.4%	97.7%	98.4%	97.8%	98.8%	98.8%	98.1%	98.9%	97.8%	99.4%	99.4%	97.8%	98.8%	97.9%	97.9%	88.0%	88.9%	99.4%	88.1%	97.8%	99.3%	98.2%	88.0%	97.9%	97.8%	99.0%	99.4%	99.5%	88.3%	88.5%		87.4%	88.9%	99.3%	97.1%	
Germany4	97.8%	96.9%	98.8%	96.7%	97.8%	96.8%	96.7%	96.7%	96.7%	96.5%	97.2%	96.7%	96.7%	96.8%	97.8%	96.7%	96.4%	96.7%	97.2%	96.7%	96.5%																		

Araştırma yöresinde sekans analizi yapılan izolatlar ile Almanya *Simulium* izolatlarının, parsiyel mt-COI gen bölgelerinin multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



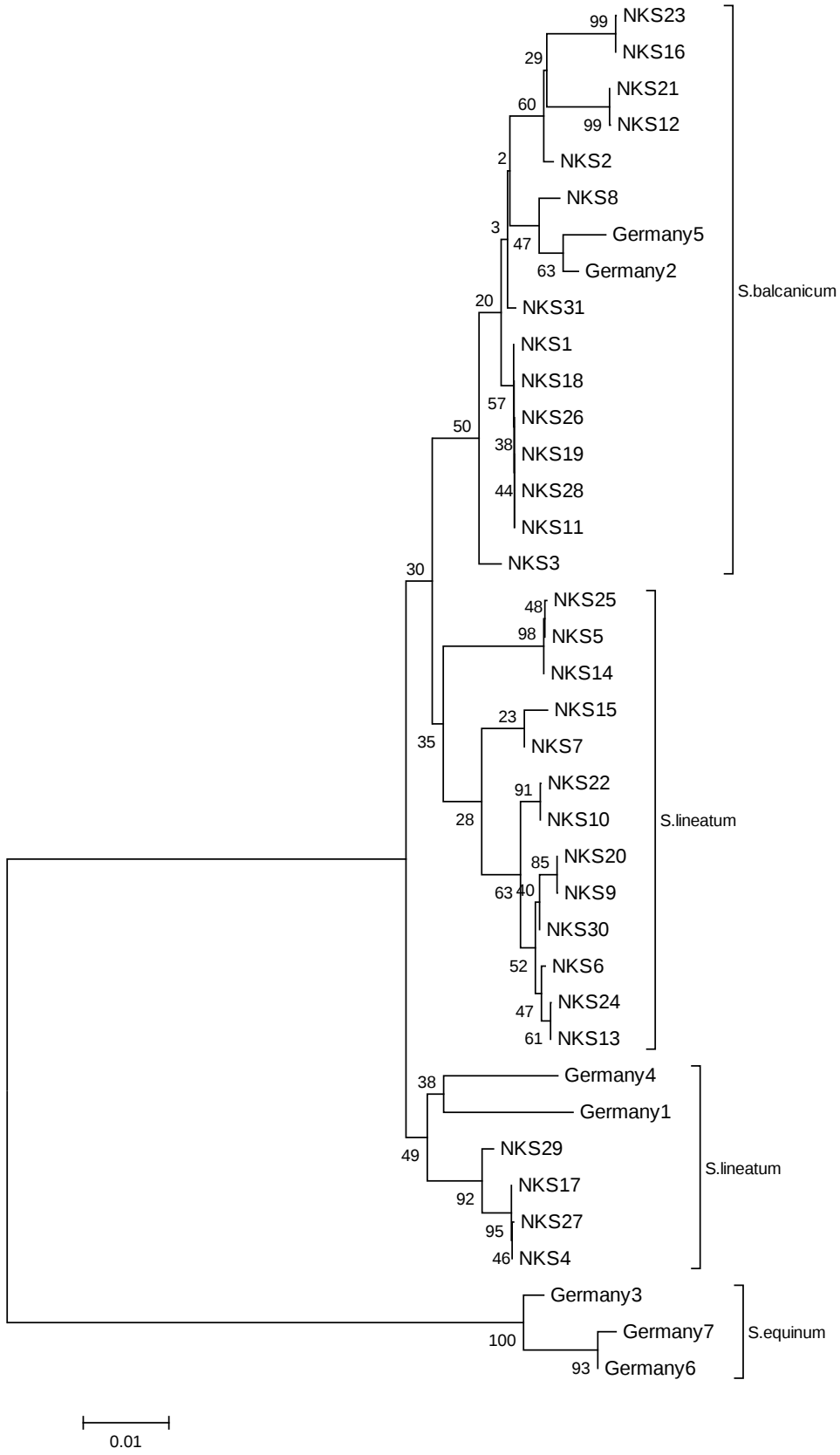
	248	250	260	270	280	290	300
D- 1. NKS31	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCA	TTC	CCCA	OGA	AATAA	TAAAGT
D- 2. NKS30	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 3. NKS29	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 4. NKS28	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCA	TTC	CCCA	OGA	AATAA	TAAAGT
D- 5. NKS27	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 6. NKS26	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCA	TTC	CCCA	OGA	AATAA	TAAAGT
D- 7. NKS25	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 8. NKS24	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 9. NKS23	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 10. NKS22	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 11. NKS21	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 12. NKS20	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 13. NKS19	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 14. NKS18	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 15. NKS17	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 16. NKS16	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 17. NKS15	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 18. NKS14	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 19. NKS13	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 20. NKS12	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 21. NKS11	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 22. NKS10	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 23. NKS9	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 24. NKS8	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 25. NKS7	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 26. NKS6	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 27. NKS5	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 28. NKS4	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 29. NKS3	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 30. NKS2	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 31. NKS1	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 32. Germany7	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 33. Germany6	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 34. Germany5	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 35. Germany4	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 36. Germany3	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 37. Germany2	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT
D- 38. Germany1	TAATATTAGGAGCCCCAGATAT	GCG	CAT	TCCC	OGAA	TAAAT	TAAAGT

	360	400	440	480	520	560	600	640	680
1. NKS31	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TGCA
2. NKS30	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
3. NKS29	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
4. NKS28	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TGCA
5. NKS27	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
6. NKS26	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
7. NKS25	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
8. NKS24	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
9. NKS23	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TGCA
10. NKS22	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
11. NKS21	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
12. NKS20	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
13. NKS19	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
14. NKS18	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
15. NKS17	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
16. NKS16	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
17. NKS15	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
18. NKS14	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
19. NKS13	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
20. NKS12	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
21. NKS11	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
22. NKS10	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
23. NKS9	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
24. NKS8	TGC	CATG	CAGG	C	GCAT	CAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT
25. NKS7									
26. NKS6	TGC	CCATG	C	GGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC
27. NKS5	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
28. NKS4	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
29. NKS3	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
30. NKS2	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
31. NKS1	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
32. Germany7	G	CCCCA	G	CAGG	G	C	CTC	G	TTTG
33. Germany6	G	CCCCA	G	CAGG	G	C	CTC	G	TTTG
34. Germany5	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
35. Germany4	TGC	CCATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
36. Germany3	G	CCCCA	G	CAGG	G	C	CTC	G	TTTG
37. Germany2	TGC	CATG	CAGGAG	CATCAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT	TTTCC	TT
38. Germany1	TGC	CCATG	CAGG	G	CAT	CAG	TTGAT	TTAGCA	ATTTT



Şekil 4.13. Sekans analizi yapılan *Simulium* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları

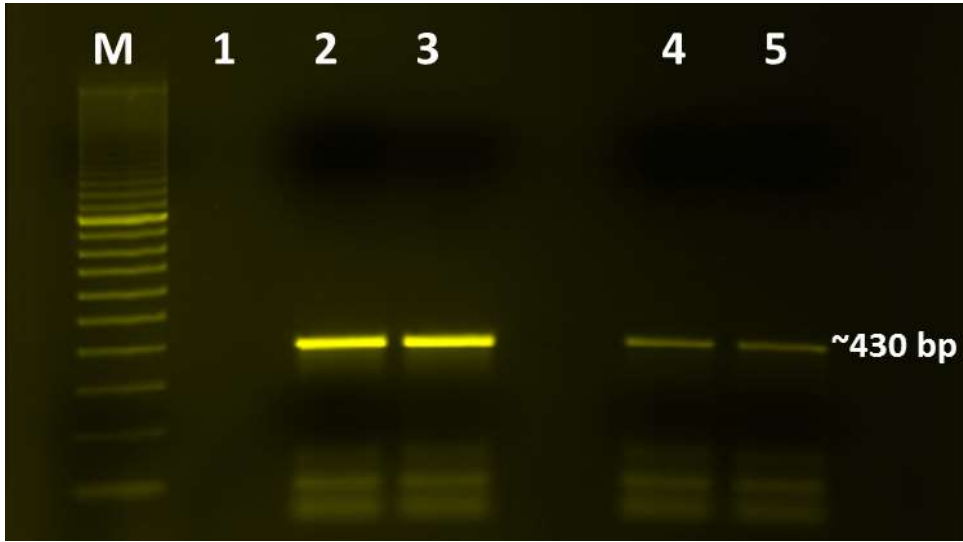
Şekil 4.13'de görüleceği üzere mt-COI gen bölgesine göre *Simulium Wilhelmsia* altsoyundaki türlere ait izolatlar arasında korunmuş bölgelerle birlikte (Bkz. 66-94; 141-169; 264-295; 461-490; 534-568 nükleotidler) türler arasında ve tür içinde çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Mt-COI gen bölgesi filogenetik analiz sonuçlarıyla, morfolojik ve kromozom analizi ile tür tayini yapılan larvalar değerlendirilerek konfirmasyonları yapılmıştır. İzolatların mt-COI gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.14'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta gösterildiği gibi *S. balcanicum* ve *S. equinum* izolatları tek bir clusterda, *S. lineatum* izolatları ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki clusterda yer almışlardır. Bu sonuçlara göre *Simulium Wilhelmsia* alt soyundaki türlere ait izolatların mt-COI gen bölgesine göre grup içi ve gruplar arası farklılıklarında; *S. Wilhelmsia balcanicum* izolatları arasında $1,1 \pm 0,2$, *S. Wilhelmsia lineatum* izolatları arasında $2,1 \pm 0,4$; *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında ise $0,9 \pm 0,3$, farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında grup farklılıkları incelendiğinde *S. Wilhelmsia balcanicum* ve *S. Wilhelmsia lineatum* izolatları arasında $2,6 \pm 0,5$, *S. Wilhelmsia balcanicum* ve *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında $13,0 \pm 1,5$, *S. Wilhelmsia lineatum* ve *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında ise $12,8 \pm 1,5$ genetik farklılık belirlenmiştir.



Şekil 4.14. *Simulium* Wilhelmsi altsoyundaki izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining-Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.3.2. ITS-2/28S gen bölgesi sekansları ve filogenetik analizi

Simuliid larvalarından izole edilen genomik DNA'ların ribozomal ITS2/28S gen bölgesi için spesifik primerler ile parsiyel amplifikasyonları sonucu agaroz jel üzerinde de yaklaşık 430 bp (Şekil 4.15) büyüklükte DNA bantları oluştuğu belirlenmiştir. Uygun konsantrasyondaki larva örneklerine ait ampliconlar jel pürifiye edilmiş ve sekanslanmıştır. Ayrıca bazı larva örnekleri full dizilimlerin elde edilmesi amacıyla klonlanmış ve plasmid eldesinden sonra sekanslanmışlardır. Bazı klonlanmış larva örneklerine ait plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile muamelesi sonrası insert hedef DNA bölgesinin jel üzerinde görünümü Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Simuliid larvalarının complete ITS2 ve parsiyel 28S ribozomal gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası bazı örneklerin jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1: No DNA; 2,3: *S. Wilhelmsia lineatum*; 4,5: *S. Wilhelmsia balcanicum*

Complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesi için toplam 32 izolatın (NKS 1-32) ilgili sekans analizleri yapılmış ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizlere ayrıca Almanya, İngiltere ve İran orijinli Clemson Üniversitesinden gönderilen ve kromozom analizleri ile tür teşhisleri yapılmış bazı larva örnekleri de sekanslanarak dahil edilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Araştırma yöresinde ITS2-28S gen bölgesine göre filogenetik analizi yapılan izolatların dahil olduğu tür, izolasyon yeri, DNA izolasyon kaynakları ile GenBank aksesyon numaraları

İzolat	İzolasyon Yeri	DNA izolasyon orijini	Tür	Aksesyon No
NKS 1	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163418
NKS 2	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163419
NKS 3	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163420
NKS 4	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163421
NKS 5	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163422
NKS 6	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163423
NKS 7	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163424
NKS 8	Gölşehir	Pupa	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163425
NKS 9	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163426
NKS 10	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163427
NKS 11	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163428
NKS 12	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163429
NKS 13	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163430
NKS 14	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163431
NKS 15	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163432
NKS 16	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163433
NKS 17	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163434
NKS 18	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163435
NKS 19	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990266
NKS 20	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990267
NKS 21	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990268
NKS 22	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990269
NKS 23	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990270
NKS 24	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990271
NKS 25	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990272
NKS 26	Ürgüp	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990273
NKS 27	Avanos	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990274
NKS 28	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990275
NKS 29*	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990276
NKS 30*	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990277
NKS 31*	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990278

NKS 32*	Gölşehir	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990279
Germany1	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF163436
Germany2	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF163437
Germany4*	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	KF990280
Germany5	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia balcanicum</i>	KF990281
Germany6*	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia equinum</i>	KF990282
Germany7*	Almanya	Larva	<i>S. Wilhelmsia equinum</i>	KF990283
England1	İngiltere	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	-
Iranian1*	İran	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	-
Iranian2*	İran	Larva	<i>S. Wilhelmsia lineatum</i>	-

* Klonlanmış izolatlar

Complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesi yönünden nükleotid dizileri belirlenen *Simulium* izolatları ile Almanya, İngiltere ve İran'dan temin edilen izolatların nükleotid kompozisyonları Tablo 4.10'da, pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları ise Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Multiple alignmentları yapılan izolatların complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid kompozisyonları

İzolat	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	G+C (%)	A+T (%)	Toplam nükleotid sayısı
NKS32	36,4	15,0	33,2	15,5	30,5	69,5	407,0
NKS31	36,4	15,0	33,2	15,5	30,5	69,5	407,0
NKS30	36,1	14,7	33,4	15,7	30,5	69,5	407,0
NKS29	36,1	14,7	33,4	15,7	30,5	69,5	407,0
NKS28	36,1	14,1	34,3	15,4	29,6	70,4	382,0
NKS27	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS26	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS25	35,9	13,9	34,8	15,4	29,3	70,7	382,0
NKS24	35,9	13,9	34,8	15,4	29,3	70,7	382,0
NKS23	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS22	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS21	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS20	36,4	13,6	34,5	15,5	29,1	70,9	354,0
NKS19	36,1	14,1	34,3	15,4	29,6	70,4	382,0
NKS18	36,1	14,1	34,3	15,4	29,6	70,4	382,0
NKS17	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS16	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS15	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS14	36,0	13,9	34,6	15,5	29,4	70,6	381,0
NKS13	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS12	36,1	14,1	34,3	15,4	29,6	70,4	382,0

NKS11	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS10	35,9	13,9	34,8	15,4	29,3	70,7	382,0
NKS9	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS8	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
NKS7	35,8	13,8	35,0	15,4	29,2	70,8	383,0
NKS6	36,0	13,9	34,6	15,5	29,4	70,6	381,0
NKS5	35,7	13,8	35,2	15,4	29,2	70,8	384,0
NKS4	35,9	13,9	34,8	15,4	29,3	70,7	382,0
NKS3	36,0	14,1	34,5	15,4	29,5	70,5	383,0
NKS2	36,2	14,2	34,1	15,5	29,7	70,3	381,0
NKS1	35,9	14,1	34,6	15,4	29,4	70,6	384,0
Iranian2	36,1	14,7	33,7	15,5	30,2	69,8	407,0
Iranian1	36,1	14,7	33,9	15,2	30,0	70,0	407,0
Germany7	35,9	14,7	34,2	15,2	30,0	70,0	407,0
Germany6	36,1	14,5	34,2	15,2	29,7	70,3	407,0
Germany5	35,0	14,7	34,4	15,8	30,6	69,4	360,0
Germany4	36,5	14,8	33,3	15,5	30,3	69,7	406,0
Germany2	36,1	14,1	34,3	15,4	29,6	70,4	382,0
Germany1	36,4	13,6	34,5	15,5	29,1	70,9	354,0
England1	36,2	13,7	34,3	15,9	29,5	70,5	315,0
Ortalama	36,4	15,0	33,2	15,5	29,6	70,4	384,4

	1	10	20	30	40	50	60
D= 1. NKS32		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 2. NKS31		T TGAACG	GCATATC	GCAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 3. NKS30		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 4. NKS29		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 5. NKS28		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 6. NKS27						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 7. NKS26						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 8. NKS25						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 9. NKS24						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 10. NKS23						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 11. NKS22						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 12. NKS21						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 13. NKS20						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 14. NKS19						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 15. NKS18						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 16. NKS17						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 17. NKS16						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 18. NKS15						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 19. NKS14						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 20. NKS13						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 21. NKS12						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 22. NKS11						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 23. NKS10						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 24. NKS9						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 25. NKS8						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 26. NKS7						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 27. NKS6						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 28. NKS5						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 29. NKS4						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 30. NKS3						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 31. NKS2						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 32. NKS1						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 33. Iranian2		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 34. Iranian1		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 35. Germany7		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 36. Germany6		T TGAACG	CATATCG	CAC TTC	T TGC TTT	T TAT TCT	ATTTAGT
D= 37. Germany5						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 38. Germany4						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 39. Germany2						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 40. Germany1						T TAT TCT	ATTTAGT
D= 41. England1						T TAT TCT	ATTTAGT

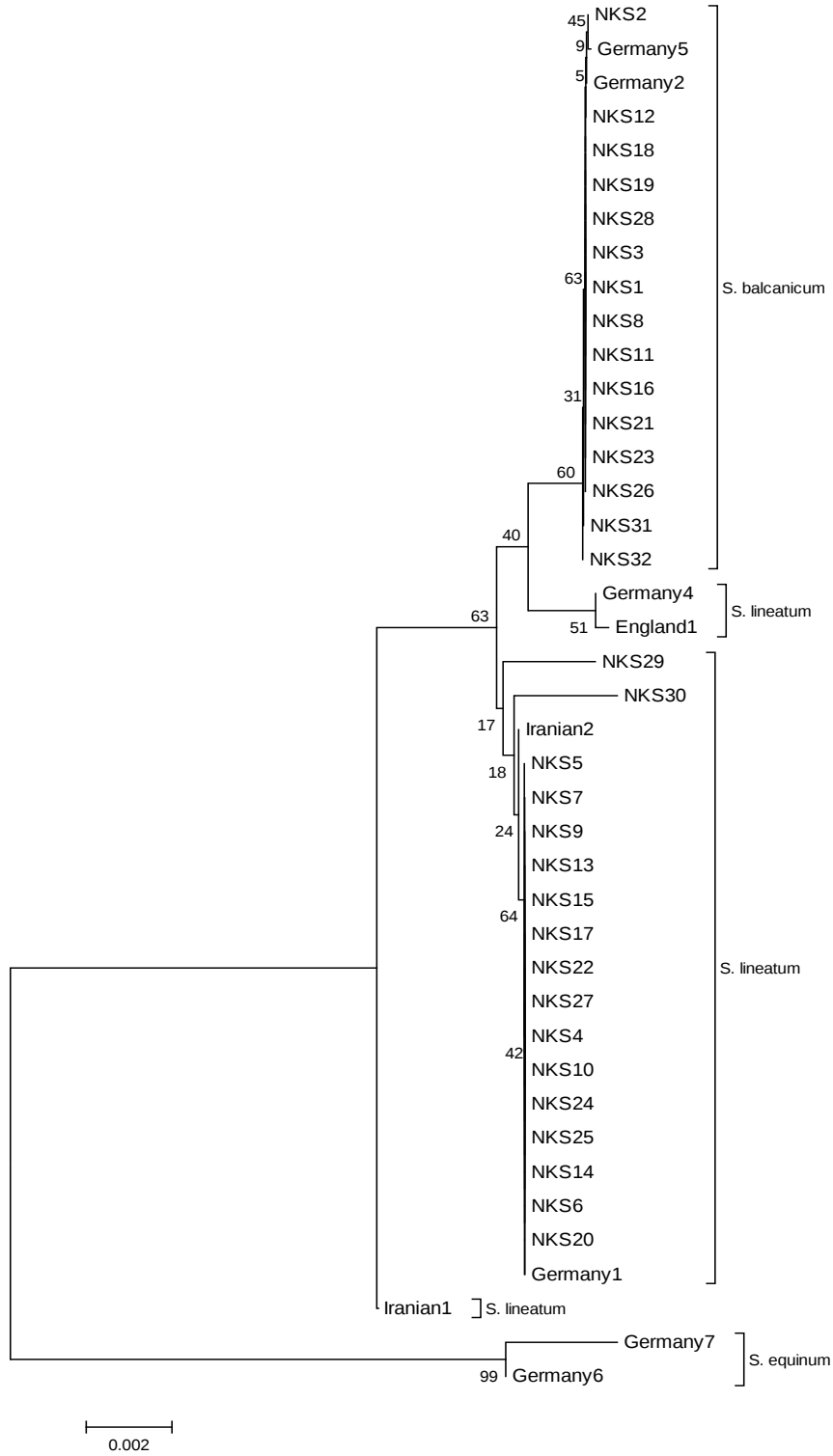
	TE	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600	630	660	690	720	750	780	810	840	870	900	930	960	990	1020	1050	1080	1110	1140	1170	1200	1230	1260	1290	1320	1350	1380	1410	1440	1470	1500	1530	1560	1590	1620	1650	1680	1710	1740	1770	1800	1830	1860	1890	1920	1950	1980	2010	2040	2070	2100	2130	2160	2190	2220	2250	2280	2310	2340	2370	2400	2430	2460	2490	2520	2550	2580	2610	2640	2670	2700	2730	2760	2790	2820	2850	2880	2910	2940	2970	3000	3030	3060	3090	3120	3150	3180	3210	3240	3270	3300	3330	3360	3390	3420	3450	3480	3510	3540	3570	3600	3630	3660	3690	3720	3750	3780	3810	3840	3870	3900	3930	3960	3990	4020	4050	4080	4110	4140	4170	4200	4230	4260	4290	4320	4350	4380	4410	4440	4470	4500	4530	4560	4590	4620	4650	4680	4710	4740	4770	4800	4830	4860	4890	4920	4950	4980	5010	5040	5070	5100	5130	5160	5190	5220	5250	5280	5310	5340	5370	5400	5430	5460	5490	5520	5550	5580	5610	5640	5670	5700	5730	5760	5790	5820	5850	5880	5910	5940	5970	6000	6030	6060	6090	6120	6150	6180	6210	6240	6270	6300	6330	6360	6390	6420	6450	6480	6510	6540	6570	6600	6630	6660	6690	6720	6750	6780	6810	6840	6870	6900	6930	6960	6990	7020	7050	7080	7110	7140	7170	7200	7230	7260	7290	7320	7350	7380	7410	7440	7470	7500	7530	7560	7590	7620	7650	7680	7710	7740	7770	7800	7830	7860	7890	7920	7950	7980	8010	8040	8070	8100	8130	8160	8190	8220	8250	8280	8310	8340	8370	8400	8430	8460	8490	8520	8550	8580	8610	8640	8670	8700	8730	8760	8790	8820	8850	8880	8910	8940	8970	9000	9030	9060	9090	9120	9150	9180	9210	9240	9270	9300	9330	9360	9390	9420	9450	9480	9510	9540	9570	9600	9630	9660	9690	9720	9750	9780	9810	9840	9870	9900	9930	9960	9990	10020	10050	10080	10110	10140	10170	10200	10230	10260	10290	10320	10350	10380	10410	10440	10470	10500	10530	10560	10590	10620	10650	10680	10710	10740	10770	10800	10830	10860	10890	10920	10950	10980	11010	11040	11070	11100	11130	11160	11190	11220	11250	11280	11310	11340	11370	11400	11430	11460	11490	11520	11550	11580	11610	11640	11670	11700	11730	11760	11790	11820	11850	11880	11910	11940	11970	12000	12030	12060	12090	12120	12150	12180	12210	12240	12270	12300	12330	12360	12390	12420	12450	12480	12510	12540	12570	12600	12630	12660	12690	12720	12750	12780	12810	12840	12870	12900	12930	12960	12990	13020	13050	13080	13110	13140	13170	13200	13230	13260	13290	13320	13350	13380	13410	13440	13470	13500	13530	13560	13590	13620	13650	13680	13710	13740	13770	13800	13830	13860	13890	13920	13950	13980	14010	14040	14070	14100	14130	14160	14190	14220	14250	14280	14310	14340	14370	14400	14430	14460	14490	14520	14550	14580	14610	14640	14670	14700	14730	14760	14790	14820	14850	14880	14910	14940	14970	15000																																																																																																																						
D= 1. NK832		TTGAGTGC	TATAA	TTTATCA	ATAGAA	CTG	TTCT	TT	TCGCA	AGAAAGAC	GTAC	GTG	TCA	ACTAT	GTAG																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</

148 150 160 170 180 194
 1. NK532 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 2. NK531 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 3. NK530 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 4. NK529 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 5. NK528 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 6. NK527 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 7. NK526 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 8. NK525 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 9. NK524 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 10. NK523 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 11. NK522 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 12. NK521 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 13. NK520 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 14. NK519 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 15. NK518 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 16. NK517 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 17. NK516 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 18. NK515 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 19. NK514 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 20. NK513 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 21. NK512 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 22. NK511 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 23. NK510 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 24. NK59 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 25. NK58 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 26. NK57 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 27. NK56 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 28. NK55 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 29. NK54 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 30. NK53 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 31. NK52 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 32. NK51 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 33. Iranian2 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 34. Iranian1 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 35. Germany7 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 36. Germany6 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 37. Germany5 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 38. Germany4 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 39. Germany2 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 40. Germany1 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC
 41. Enoland1 ACTTGTGCAATCAACGGCCAAAGACTCATATTTGATTAAATCACGAGATATGACTCAATCAAATAC

1. NKS32	T A A G C A T A T T A A T A A G G
2. NKS31	T A A G C A T A T T A A T A A G G
3. NKS30	T A A G C A T A T T A A T A A G G
4. NKS29	T A A G C A T A T T A A T A A G G
5. NKS28	T A A G C A T A T T A A T A A G G
6. NKS27	T A A G C A T A T T A A T A A G G
7. NKS26	T A A G C A T A T T A A T A A G G
8. NKS25	T A A G C A T A T T A A T A A G G
9. NKS24	T A A G C A T A T T A A T A A G G
10. NKS23	T A A G C A T A T T A A T A A G G
11. NKS22	T A A G C A T A T T A A T A A G G
12. NKS21	T A A G C A T A T T A A T A A G G
13. NKS20	T A A G C A T A T T A A T A A G G
14. NKS19	T A A G C A T A T T A A T A A G G
15. NKS18	T A A G C A T A T T A A T A A G G
16. NKS17	T A A G C A T A T T A A T A A G G
17. NKS16	T A A G C A T A T T A A T A A G G
18. NKS15	T A A G C A T A T T A A T A A G G
19. NKS14	T A A G C A T A T T A A T A A G G
20. NKS13	T A A G C A T A T T A A T A A G G
21. NKS12	T A A G C A T A T T A A T A A G G
22. NKS11	T A A G C A T A T T A A T A A G G
23. NKS10	T A A G C A T A T T A A T A A G G
24. NKS9	T A A G C A T A T T A A T A A G G
25. NKS8	T A A G C A T A T T A A T A A G G
26. NKS7	T A A G C A T A T T A A T A A G G
27. NKS6	T A A G C A T A T T A A T A A G G
28. NKS5	T A A G C A T A T T A A T A A G G
29. NKS4	T A A G C A T A T T A A T A A G G
30. NKS3	T A A G C A T A T T A A T A A G G
31. NKS2	T A A G C A T A T T A A T A A G G
32. NKS1	T A A G C A T A T T A A T A A G G
33. Iranian2	T A A G C A T A T T A A T A A G G
34. Iranian1	T A A G C A T A T T A A T A A G G
35. Germany7	T A A G C A T A T T A A T A A G G
36. Germany6	T A A G C A T A T T A A T A A G G
37. Germany5	T A A G C A T A T T A A T A A G G
38. Germany4	T A A G C A T A T T A A T A A G G
39. Germany2	T A A G C A T A T T A A T A A G G
40. Germany1	T A A G C A T A T T A A T A A G G
41. England1	T A A G C A T A T T A A T A A G G

Şekil 4.16. Sekans analizi yapılan *Simulium* izolatlarının complete ITS2/parsiyel 28S gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları

Şekil 4.16'da görüleceği üzere complete ITS-2 gen bölgesine göre *Simulium Wilhelmsia* altsoyundaki türlere ait izolatların özellikle tür içinde olma üzere homolojilerinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında türler arasında nükleotid varyasyonlarının en yüksek 267-311. bazlar arasında görüldüğü saptanmıştır. *S. balcanicum* izolatlarında 267. nükleotidde thymine insertü, 300. bazda adenine delesyonu ve 311. nükleotidde cytosine değişimi; *S. lineatum* NKS30 izolatında 230. bazda guanine, Iranian1 izolatında 128. bazda adenine değişimi, Germany4 ve England1 izolatlarında 311. bazda thymine değişimi; *S. equinum* izolatlarında 128., 270., 277., 302. bazlarda adenine, 142., 156., 301 bazlarda thymine, 287. bazda guanine ve 307. bazda cytosine değişimi belirlenmiştir. Ayrıca *S. equinum* Germany7 izolatının 95. bazında cytosine varyasyonu görülmüştür. İncelenen izolatların ITS-2 gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.17'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta gösterildiği gibi *S. balcanicum* ve *S. equinum* izolatları tek bir clusterda, *S. lineatum* izolatları ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere üç clusterda yer almışlardır. Almanya ve İngiltere'den analizlere dahil edilen Germany4 ve England1 izolatları ilgili gen bölgesine göre *S. balcanicum* izolatlarına yakın bulunurken, NKS *S. lineatum* izolatlarının tümü 2. clusterda, Iranian 1 izolatının ise diğer *S. lineatum* izolatlarına daha uzak 3. clusterda yerleşim gösterdiği belirlenmiştir.

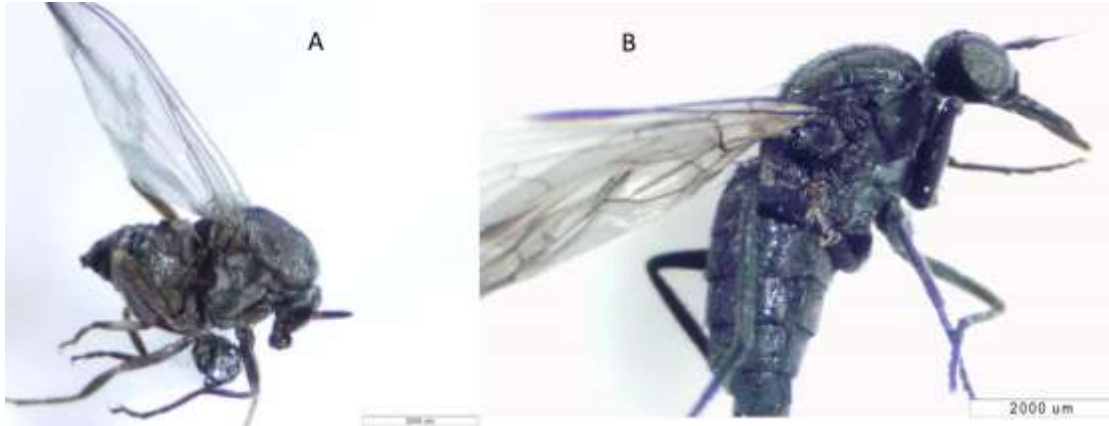


Şekil 4.17. *Simulium* izolatlarının complete ITS2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

Bu sonuçlara göre *Simulium Wilhelmsia* alt soyundaki türlere ait izolatların ITS-2 gen bölgesine göre grup içi ve gruplar arası farklılıklarında; *S. Wilhelmsia balcanicum* izolatlarının %100 homoloji gösterdiği, *S. Wilhelmsia lineatum* izolatları arasında $0,1 \pm 0,1$, *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında ise $0,2 \pm 0,2$, farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında grup farklılıkları incelendiğinde *S. Wilhelmsia balcanicum* ve *S. Wilhelmsia lineatum* izolatları arasında $0,3 \pm 0,3$, *S. Wilhelmsia balcanicum* ve *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında $2,5 \pm 0,8$, *S. Wilhelmsia lineatum* ve *S. Wilhelmsia equinum* izolatları arasında ise $2,6 \pm 0,8$ genetik farklılık belirlenmiştir.

4.3.3. Ergin dişi simuliid örneklerinin beslenme eğilimlerinde konak spekturumu ve türleri

Toplanan ergin *Simulium* örneklerinin mikroskopik incelemesinde soya özgü tipik morfolojik yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.18). Cinsiyet ayrımı primer olarak göz yapısına göre belirlenmiştir. Dişilerde tek tek elementlerden oluşmuş (ommatidia) olan gözler küçük ve antenlerin dorsalinde ayrı olarak yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Ergin dişi *Simulium* sp. (Orijinal)

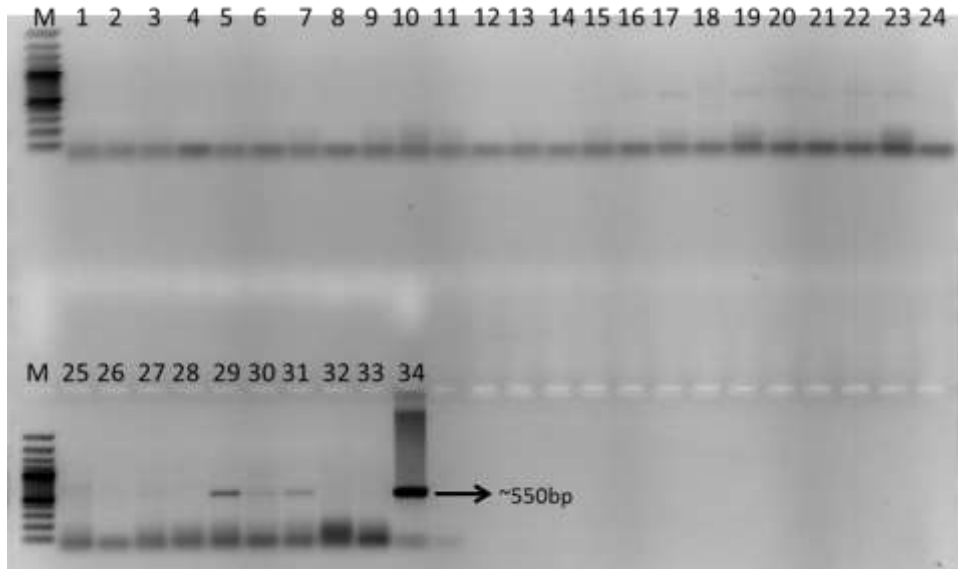


Şekil 4.19. Ergin dişi *Simulium* sp. göz yapısı (Orijinal)

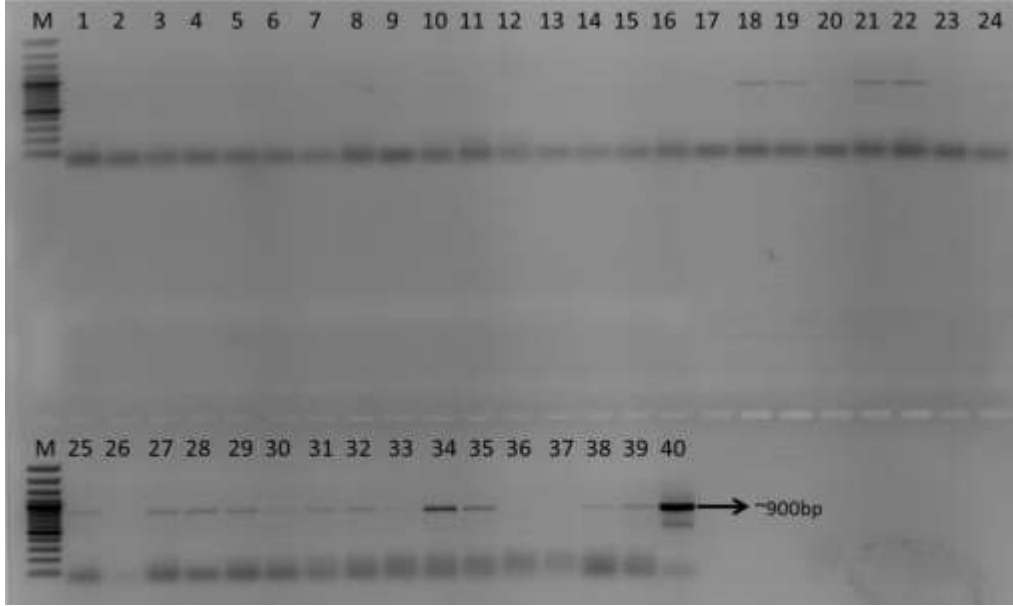
Ergin dişi simuliidlerden bireysel olarak elde edilen genomik DNA ekstraktlarının mitokondrial cyt b gen bölgesinden dizayn edilen kanatlı ve memeli spesifik primerler ile moleküler analiz sonuçları Tablo 4.12'de verilmiştir. Tablo 4.12'de görüleceği üzere 51 pozitif örneğin toplam 23'ü yalnızca memeli, 11'i ise yalnızca kanatlı kanı pozitif belirlenmiştir. Pozitif örneklerin 17'si ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Beslenme eğilimlerinin istatistiksel analizinde hem *S. lineatum* ($\chi^2=7,355$, $p<0,05$) ve hem de *S. balcanicum* ($\chi^2=10,050$, $p<0,05$) için memeli tercihi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Mitokondrial cyt b gen bölgesi için kanatlı ve memeli kanı pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünüşleri sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. Pozitif belirlenen bireysel simuliid örneklerinin tür teşhisleri mt-COI ve ITS-2 sekansları elde edildikten sonra larval dönemlerden elde edilen DNA dizileriyle alignmentları yapılarak konulmuştur. Bazı pozitif ergin örneklerin (ES1-ES8) tür teşhisleri amacıyla larval mt-COI ve ITS-2 sekansları ile alignmentları sonucu elde edilen sonuçlar mt-COI gen bölgesi için Şekil 4.22, ITS-2 gen bölgesi için de Şekil 4.23'de filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Bireysel olarak incelenen ergin dişi simuliidlerin memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitiflikleri

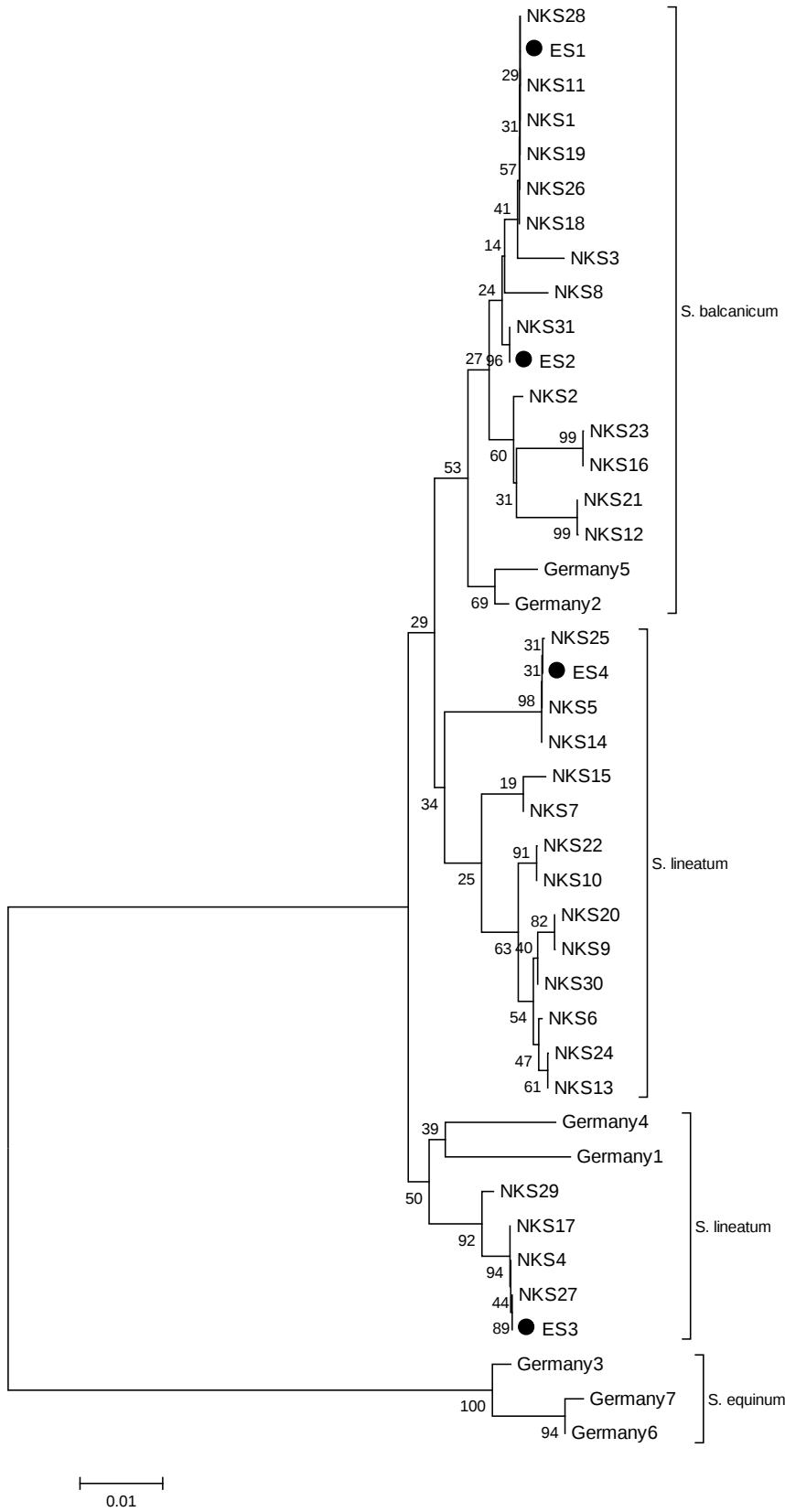
İncelenen dişi simuliid sayısı	Konak kanı yönünden pozitiflik						
	Kanatlı		Memeli		Kanatlı+Memeli		Toplam
	S. lineatum	S. balcanicum	S. lineatum	S. balcanicum	S. lineatum	S. balcanicum	
150	5	3	15	12	11	5	51



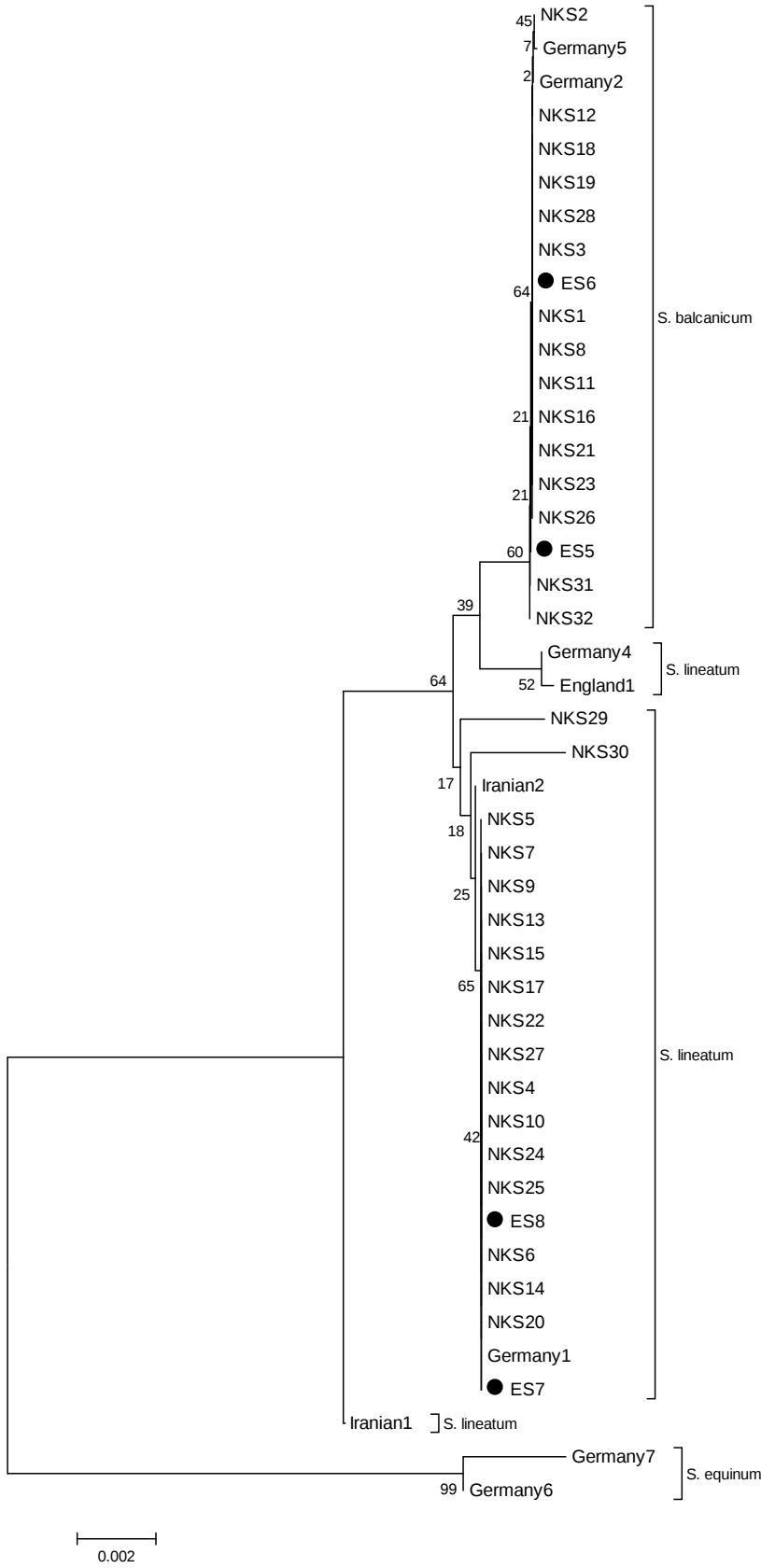
Şekil 4.20. Ergin dişi simuliidlerde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 17,19-23,25,27,29-31: Pozitif örnekler, 33: No DNA; 34: Pozitif kontrol (Kanatlı DNA'sı).



Şekil 4.21. Ergin dişi simuliidlerde memeli mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucunun jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 18,19,21,22,25,27-35,38,39: Pozitif örnekler, 33: No DNA; 34: Pozitif kontrol (sığır DNA'sı)



Şekil 4.22. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen bazı ergin dişi simuliidlerin (ES1-ES4) larval mt-COI sekansları baz alınarak tür tayinlerinin filoegentik ağaç üzerinde görünümü

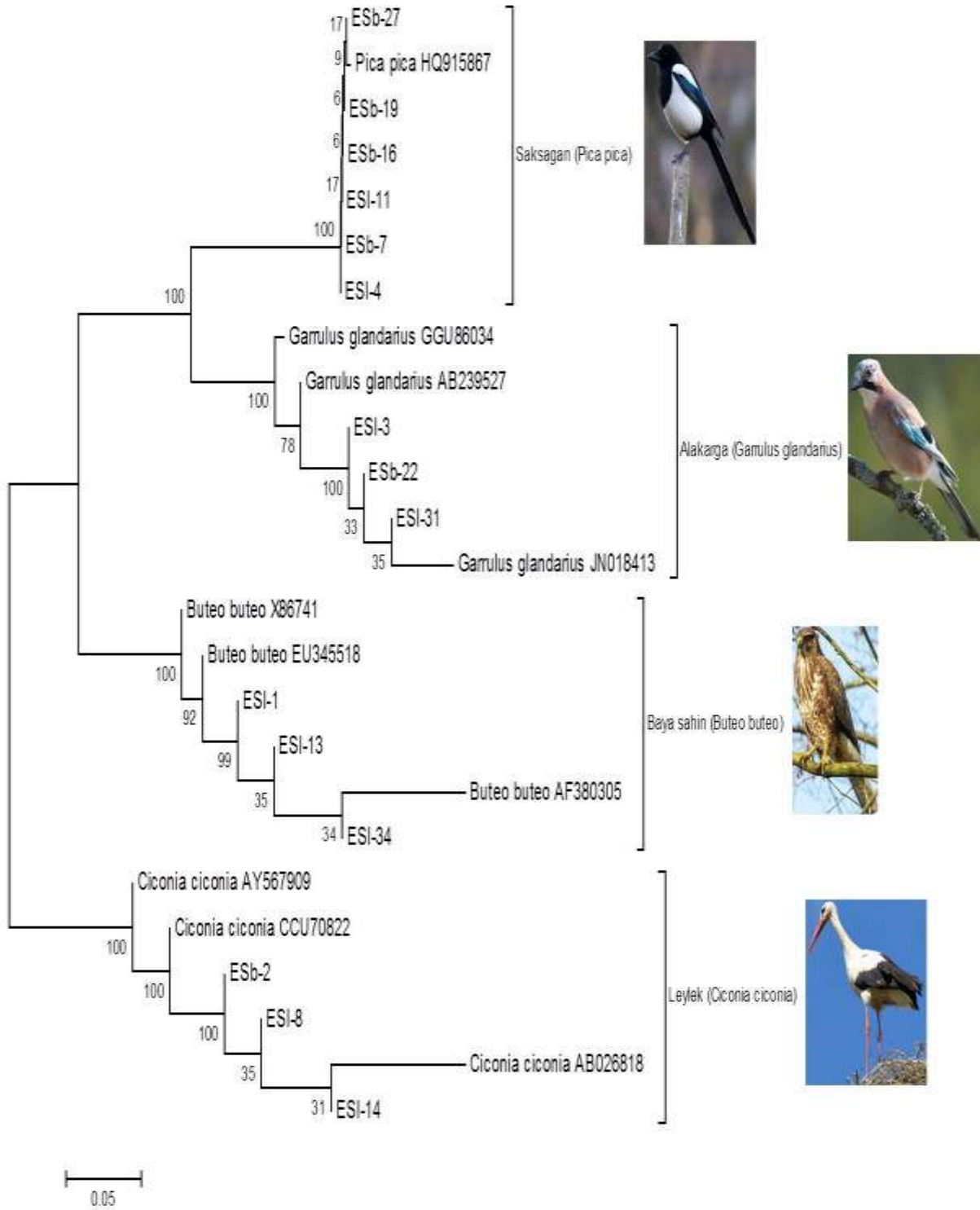


Şekil 4.23. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen bazı ergin dişi simuliidlerin (ES5-ES8) ITS-2 sekansları baz alınarak tür tayinlerinin filoegentik ağaç üzerinde görünümü

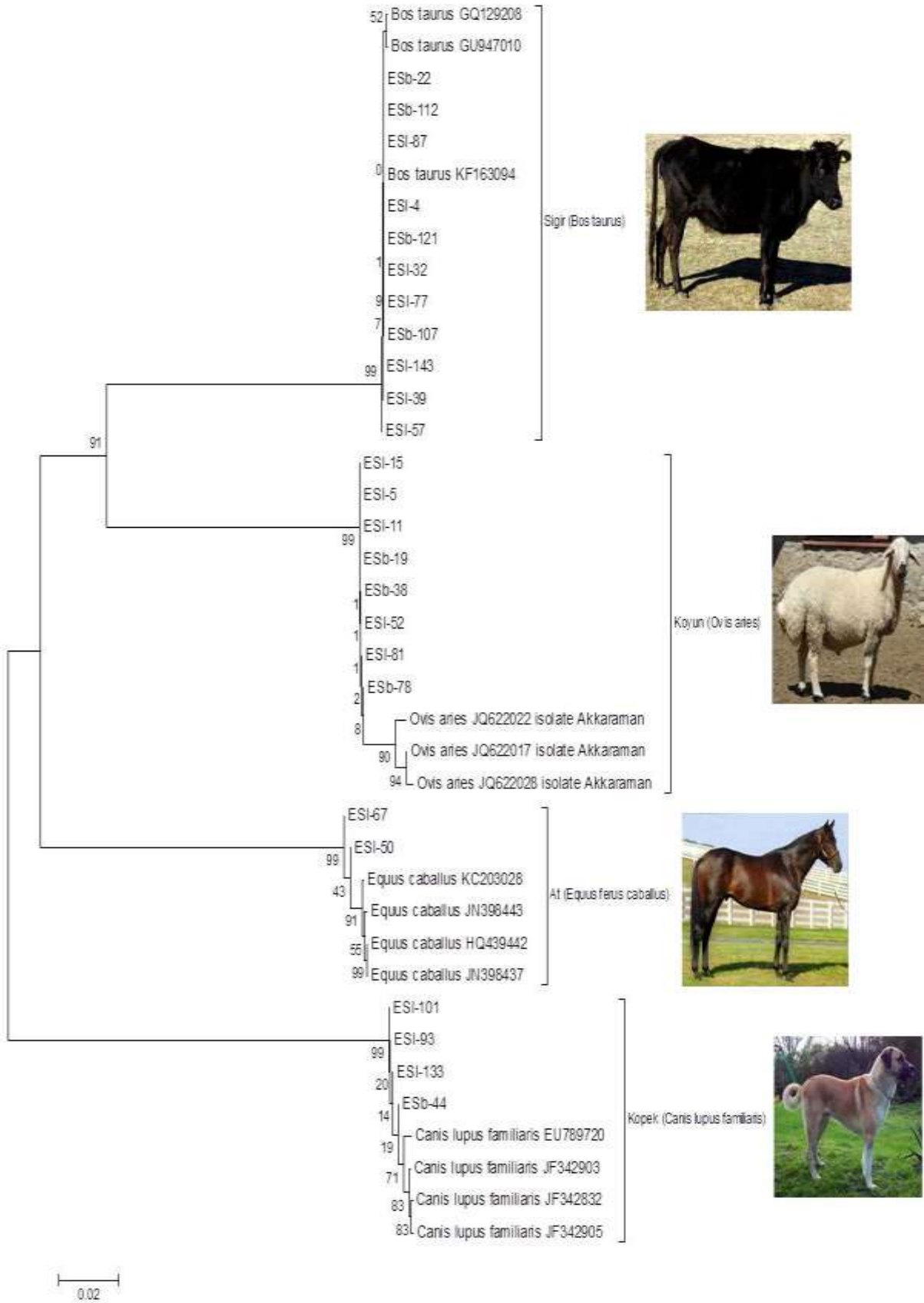
Konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden kanatlı için 15, memeli için ise 25 izolat klonlandıktan sonra konak türü tayini için elde edilen plasmidler sekans analizine tabii tutulmuştur. Plasmidlerden elde edilen mt-cyt b sekanslarının GenBank'ta blastn analizleri sonucu konak türü identifikasyonları yapılmış ve *Simulid* türlerine göre belirlenen konak türlerinin dağılımı Tablo 4.13'de verilmiştir. Konak türü belirlenen izolatların ayrıca mt-cyt b gen bölgesine göre filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri kanatlı için Şekil 4.24, memeli için de Şekil 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.13. Memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerin *Simulid* türlerine göre konak türü dağılımı

Konak türü		Konak kanı yönünden pozitiflik		TOPLAM
		<i>S. lineatum</i>	<i>S. balcanicum</i>	
KANATLI	Alakarga (<i>Garrulus glandarius</i>)	2	1	3
	Saksağan (<i>Pica pica</i>)	2	4	6
	BayağıŞahin (<i>Buteo buteo</i>)	3	-	3
	Leylek (<i>Ciconia ciconia</i>)	2	1	3
MEMELİ	At (<i>Equus ferus caballus</i>)	2	-	2
	Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)	3	1	4
	Koyun (<i>Ovis aries</i>)	5	3	8
	Siğır (<i>Bos taurus</i>)	7	4	11
TOPLAM		26	14	40



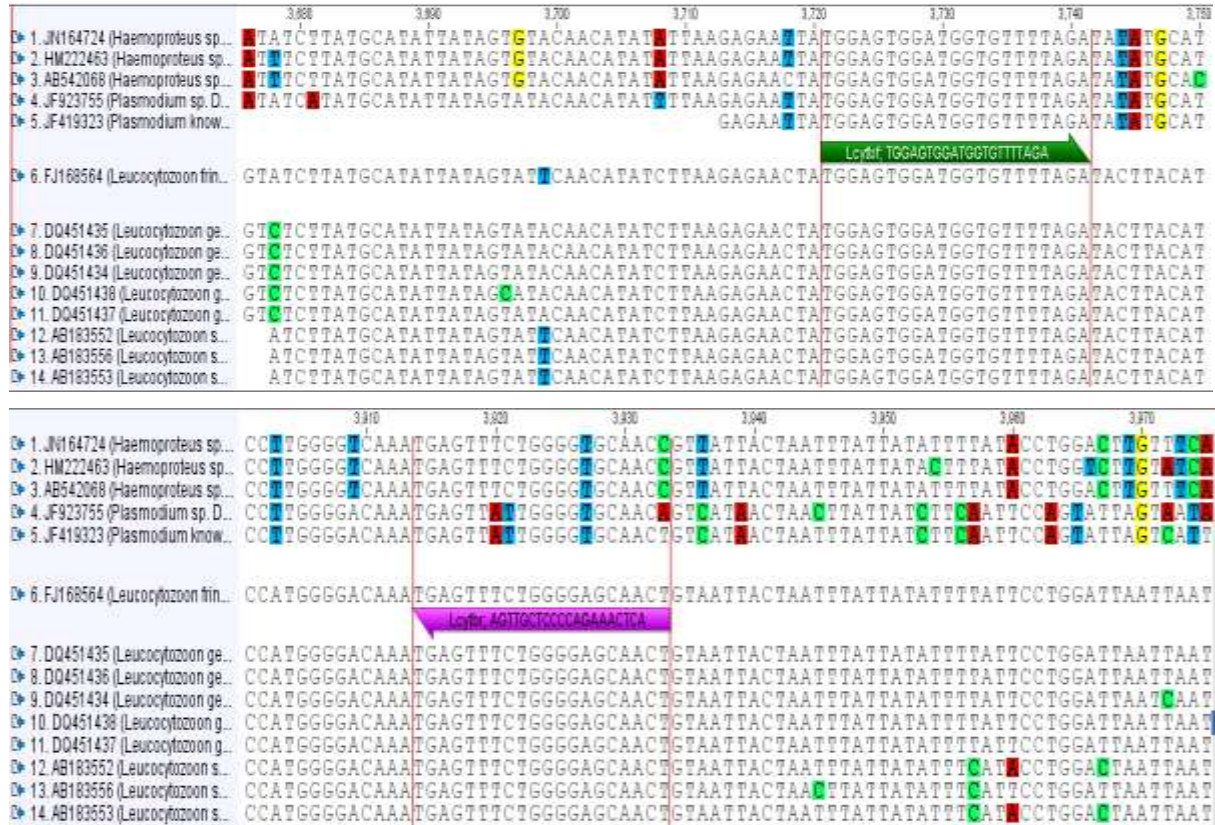
Şekil 4.24. Kanatlı konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri (ESI: Ergin *S. lineatum*; ESb: Ergin *S. balcanicum*)



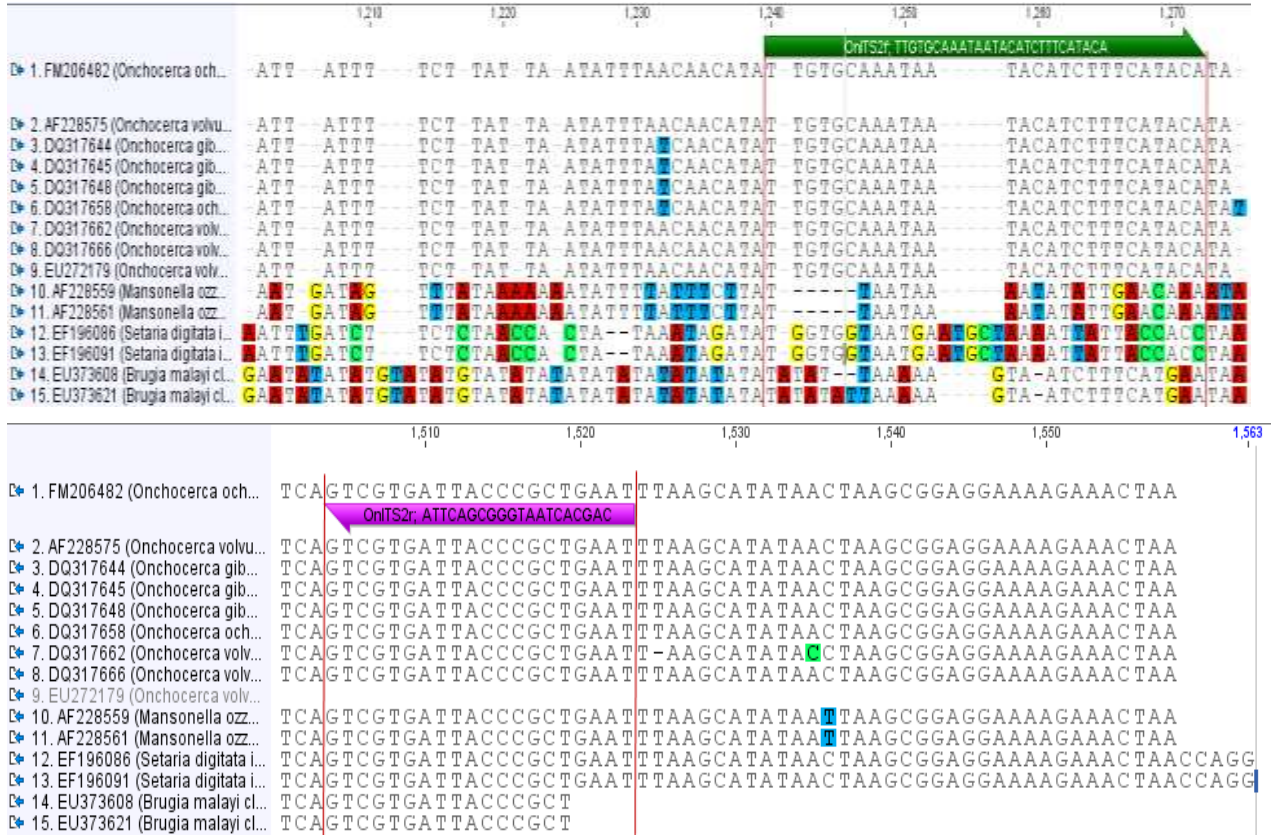
Şekil 4.25. Memeli konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri (ESI: Ergin *S. lineatum*; ESb: Ergin *S. balcanicum*)

4.3.4. Ergin dişi simuliid örneklerinde belirlenen patojenler ve filogenetik analizleri

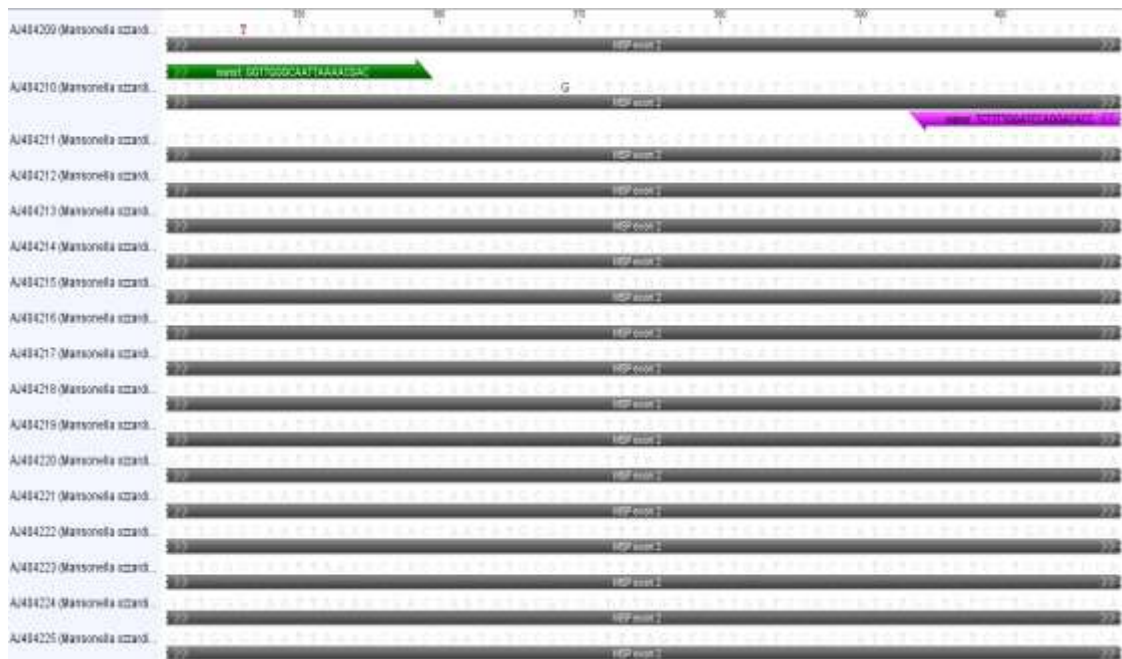
Ergin dişi simuliidlerde patojenlerin sybergreen tabanlı Real Time PCR ile araştırılmasında, GenBank'ta mevcut *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* türlerinin çeşitli gen bölgeleri analiz edilmiş ve Real Time PCR spesifik orijinal primer dizaynı yapılmıştır. *Leucocytozoon* için mitokondriyal cytochrome b (cytb), *Onchocerca* için ITS-2 ve *Mansonella* için MSP (major sperm protein) gen bölgelerini hedef alan primer dizilerinin söz konusu türlere ait izolatların ilgili gen bölgesi sekansları ile alignmentları sırasıyla Şekil 4.26- 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.26'de görüldüğü gibi, forward primer Lcytbf'in *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* ve *Plasmodium* türleri için genel primer olmasına karşın revers primer Lcytbr'nin sadece *Leucocytozoon* türleri için spesifik olduğu, Şekil 4.27'da görüldüğü üzere, revers primer OnITS2r'nin Filarioidea üst ailesindeki diğer nematod türleri için genel primer olmasına karşın forward primer OnITS2f'in sadece *Onchocerca* türleri için spesifik olduğu ve Şekil 4.28'de de mansf ve mansr primerlerinin *M. ozzardi* için spesifik olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.26. *Leucocytozoon* türlerinin mitokondriyal cytochrome b (cytb) gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (Lcytbf ve Lcytbr) çeşitli *Leucocytozoon*, *Plasmodium* ve *Haemoproteus* izolatlarına ait sekans dizileri ile alignmentları



Şekil 4.27. *Onchocerca* türlerinin ITS2 gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (OnITS2f, OnITS2r) Filarioidea üst ailesindeki çeşitli türlere ait izolatların sekans dizileri ile alignmentları



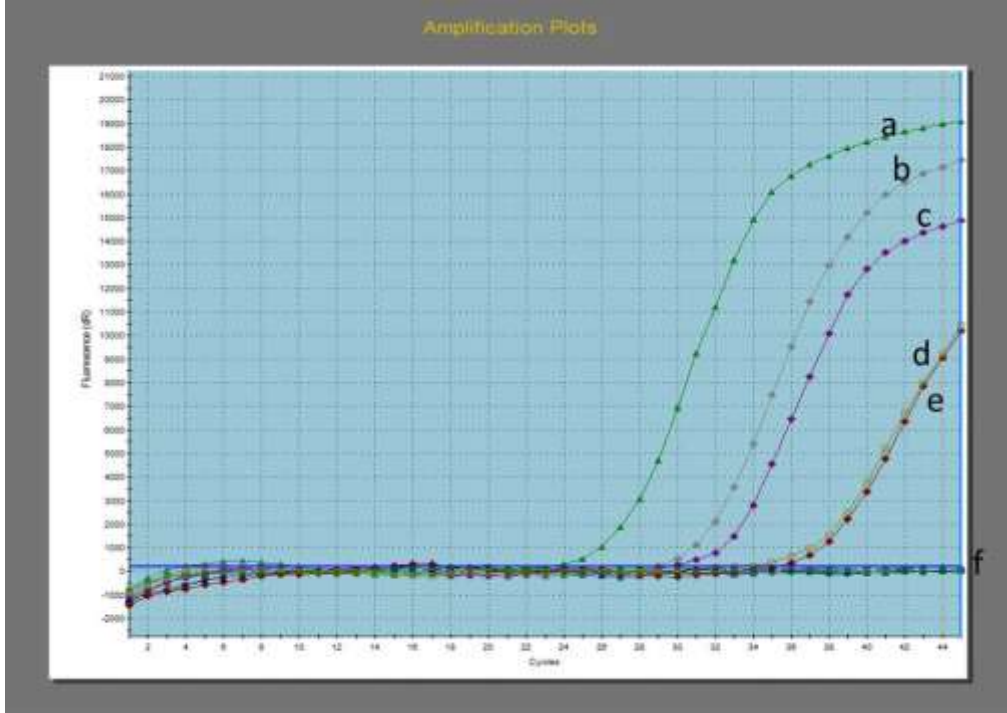
Şekil 4.28. *M. ozzardi* MSP gen bölgesini hedef alan Real Time PCR spesifik orijinal primerlerin (mansf ve mansr) çeşitli izolatlara ait sekans dizileri ile alignmentları

Dizayn edilen bu primerler ile referans izolatlar üzerinde yapılan Syber Green tabanlı Real Time PCR analizinde pozitif izolatların amplifikasyon gösterdiği ve melting curve analizinde tür bazlı benzer Tm değerini verdiği saptanmıştır.

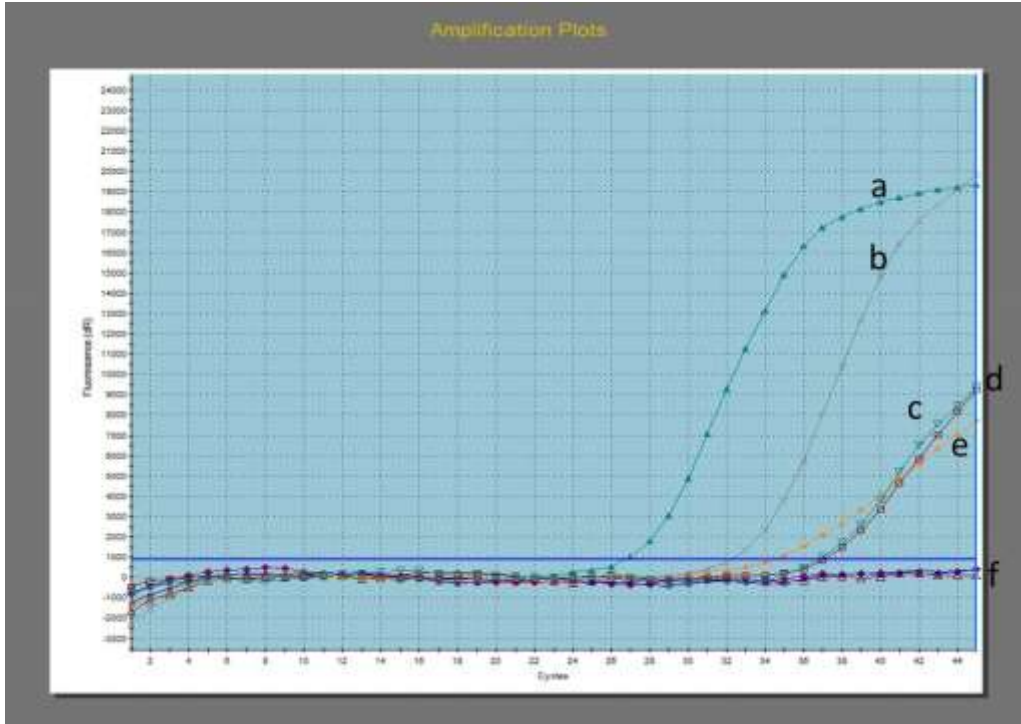
Standardizasyon basamaklarından sonra Real Time PCR analizleri yapılan 150 adet bireysel örneğin 1'inde *Leucocytozoon* sp., 46 havuzun (10 örnek/havuz) 3'ünde *Leucocytozoon* sp. ve 4'ünde *Onchocerca* sp. pozitifliği belirlenirken örneklerin hiçbirinde *Mansonella* sp.'ye rastlanılmamıştır (Tablo 4.14). Real Time PCR analizlerinde *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* sp. yönünden belirlenen amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.29-4.31'de gösterilmiştir. Ergin dişi simuliidlerde *Leucocytozoon* ve *Onchocerca* sp. için belirlenen minimum enfeksiyon (MIRs) ve beklenen enfeksiyon (P) oranları da Tablo 4.14'de gösterilmiştir. *Leucocytozoon* sp. ve *Onchocerca* sp. için MIRs/P, sırasıyla 0,65/0,67 ve 0.87/0,90 belirlenmiştir.

Tablo 4.14. Ergin dişi simuliid örneklerinde Real Time PCR ile belirlenen patojen türleri

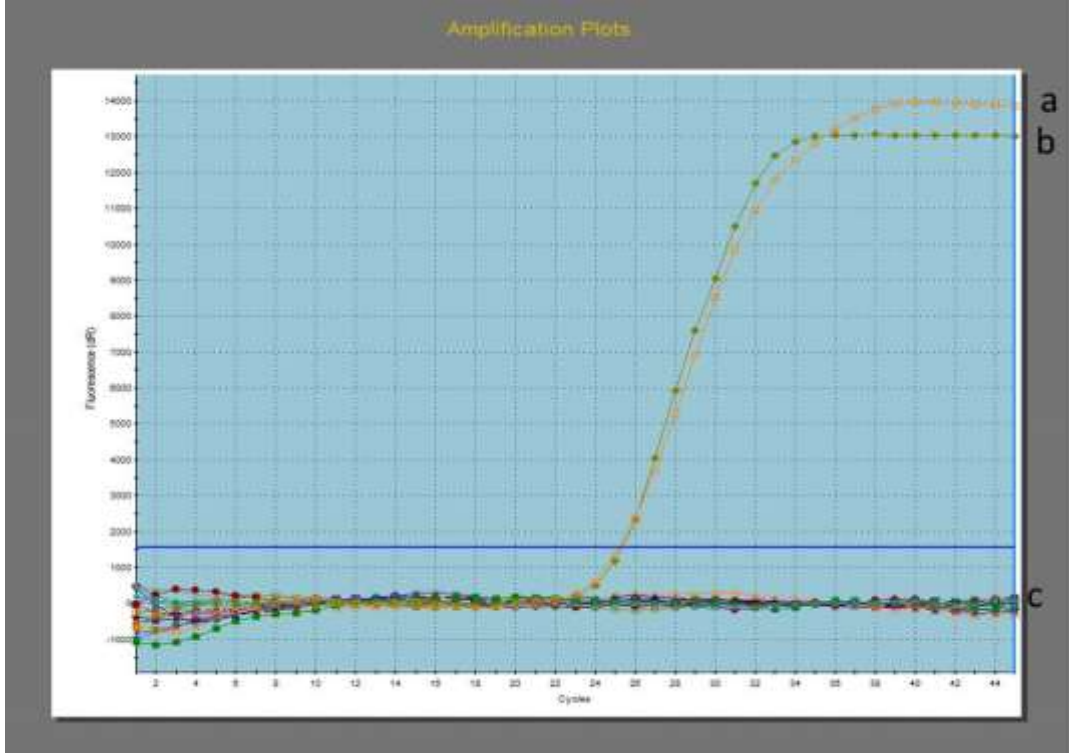
Patojen	Ergin dişi simuliid sayısı				TOPLAM	Enfeksiyon oranları	
	Bireysel		Havuz (10 örnek/havuz)			MIRS	P
	İncelenen	Pozitif	İncelenen	Pozitif			
<i>Leucocytozoon</i> sp.	150	1	46	3	4	0,65	0,67
<i>Onchocerca</i> sp.	150	-	46	4	4	0,87	0,90
<i>Mansonella</i> sp.	150	-	46	-	-	-	-
TOPLAM	150	1	46	7	8		



Şekil 4.29. Ergin dişi simuliidlere ait DNA örneklerinin *Leucocytozoon* spp. yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları. a: Pozitif kontrol; b,c,d,e: Pozitif örnekler; f: Negatif örnekler ve No DNA

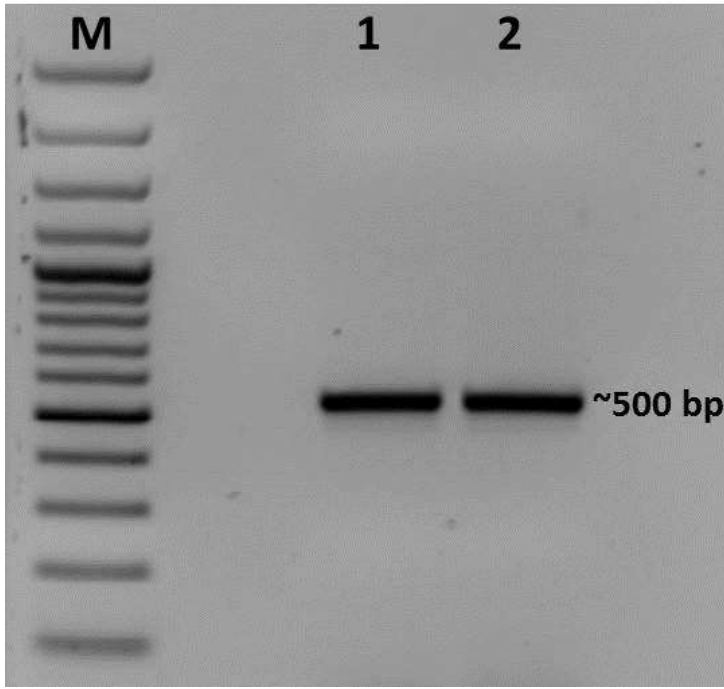


Şekil 4.30. Ergin dişi simuliidlere ait DNA örneklerinin *Onchocerca* spp. yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları

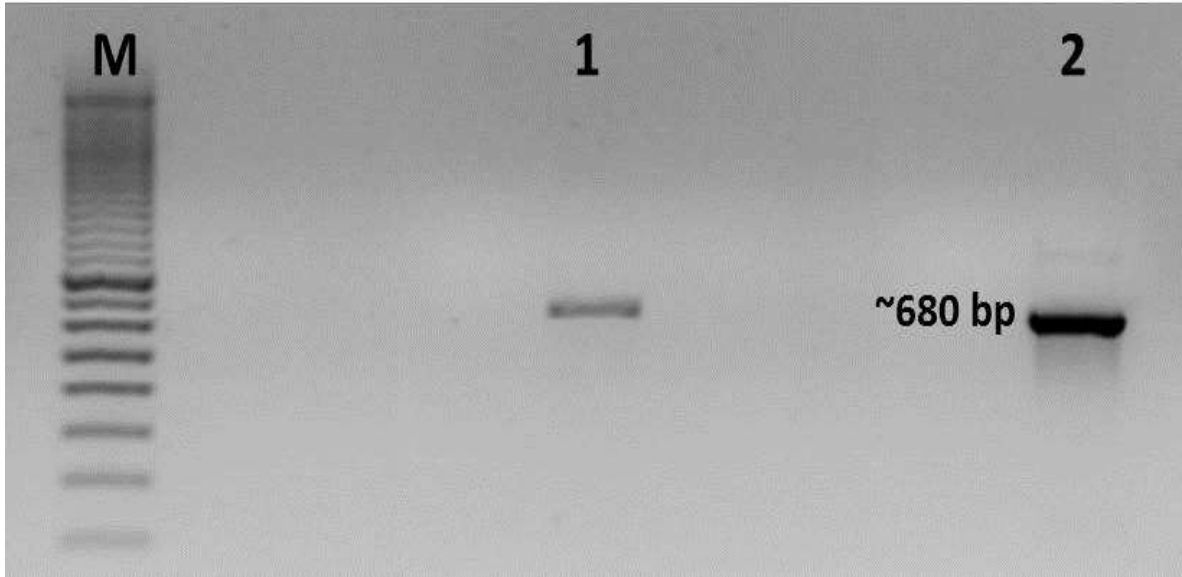


Şekil 4.31. İncelemesi yapılan ergin sineklere ait genomik DNA'ların *M. ozzardi* yönünden SyberGreen Real Time PCR analiz sonuçları. a, b: Arjantin referans izolatları; c: No DNA ve negatif örnekler

Real Time PCR analizleri sonucu pozitif belirlenen iki *Leucocytozoon* sp. (1 bireysel örnek (ESI1) + 1 havuz pozitif) ve bir *Onchocerca* sp. izolatının sırasıyla partial mt-cytb ve cytochrome oxidase subunit I (coxI) gen bölgeleri Nested PCR ve PCR ile amplifiye edilerek elde edilen amplikonlar üzerine sekans ve filogenetik analizler yapılmıştır. *Leucocytozoon* sp. ve *Onchocerca* sp. izolatlarının sırasıyla mt-cytb ve mt-coxI gen bölgelerinin amplifikasyonu sonucu ürünlerin agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de verilmiştir.



Şekil 4.32. *Leucocytozoon* sp. izolatlarının mt-cytb gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1: TrNSL1 izolatı, 2: TrNSL2 izolatı



Şekil 4.33. *Onchocerca* sp. izolatının mt-cox1 gen bölgesinin amplifikasyonu sonrası jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1: TrOnchSim1 izolatı, 2: Pozitif kontrol DNA

Mt-cytb sekansları belirlenen *Leucocytozoon* sp. izolatları (TrNSL1, TrNSL2) ile filogenetik analizlere GenBank veri tabanından alınarak dahil edilen diğer *Leucocytozoon* sp. izolatları GenBank Aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.15'de gösterilmiştir.

Tablo 4.15. Filogenetik analizi yapılan *Leucocytozoon* izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon yeri, izolasyon konağı ile GenBank aksesyon numaraları

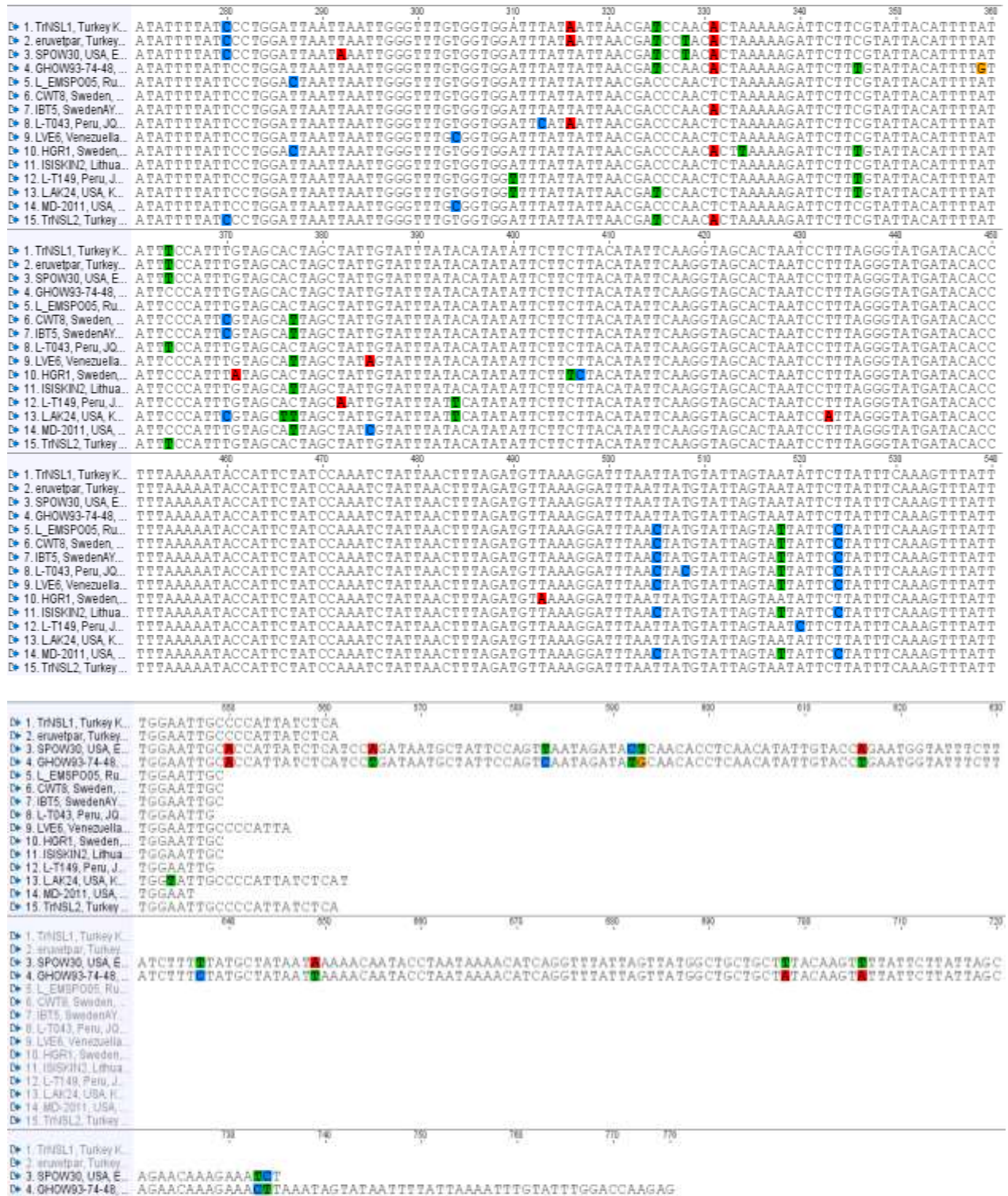
İzolat	Gen Bölgesi	İzolasyon Yeri	Konak	Aksesyon No
TrNSL1	Mt-cytb	Türkiye	<i>S. lineatum</i>	KF184646
TrNSL2	Mt-cytb	Türkiye	<i>Simulium</i> sp. (Genomik DNA Havuzlarından)	KF999649
eruvetpar	Mt-cytb	Türkiye	Avian; <i>Strix aluco</i>	KC876042
SPOW30	Mt-cytb	Amerika	Avian; <i>Strix occidentalis occidentalis</i>	EU627806
GHOW93-74-48	Mt-cytb	Amerika	Avian; <i>Bubo virginianus</i>	EU627821
L_EMSP005	Mt-cytb	Rusya	Avian; <i>Emberiza spodocephala</i>	EU676193
CWT8	Mt-cytb	İsveç	Avian	DQ847214
IBT5	Mt-cytb	İsveç	Avian; <i>Luscinia svecica</i>	AY393798
L-T043	Mt-cytb	Peru	Avian; <i>Geotrygon frenata</i>	JQ988708
LVE6	Mt-cytb	Venezuela	Avian; <i>Seiurus noveboracensis</i>	JQ764623
HGR1	Mt-cytb	İsveç	Avian	DQ847256
ISISKIN2	Mt-cytb	Litvanya	Avian; <i>Carduelis spinus</i>	AY393796
L-T149	Mt-cytb	Peru	Avian; <i>Arremon assimilis</i>	JQ988639
L.AK24	Mt-cytb	Amerika	Avian	KF314797
MD-2011	Mt-cytb	Amerika	Avian; <i>Catharus ustulatus</i>	JN792137

Parsiyel mt-cytb gen bölgesi yönünden nükleotid dizileri belirlenen *Leucocytozoon* izolatları (TrNSL1, TrNSL2) ile GenBank'ta mevcut alignmentta dahil edilen diğer *Leucocytozoon* izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları Tablo 4.16'da, multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.34'de gösterilmiştir.

Tablo 4.16. *Leucocytozoon* izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları

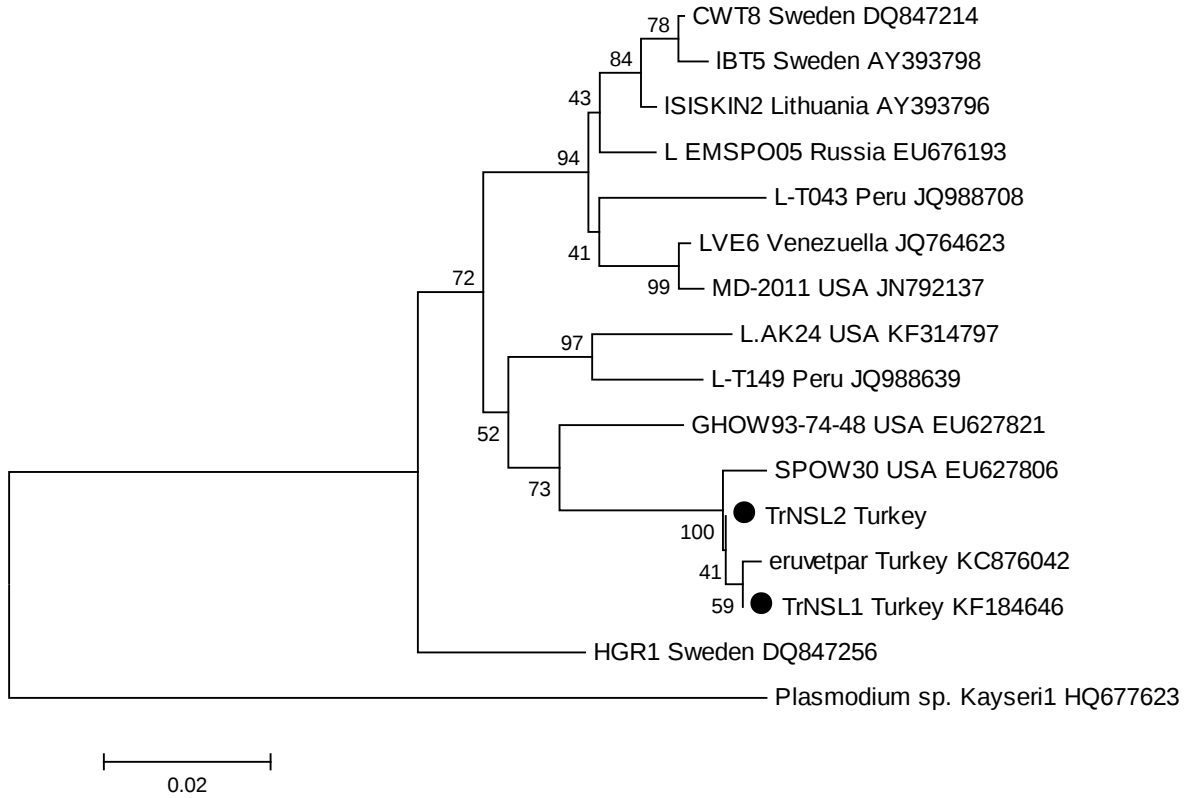
	TrNSL1, Turk...	eruevpar, T...	SPOW30, US...	GHOW93-74...	L_EMSPO05...	CW78, Swed...	IBT5, Swede...	L-T043, Peru...	LVE6, Venez...	HGR1, Swed...	ISISKIN2, Lit...	L-T149, Peru...	LAK24, USA...	MD-2011, U...	TrNSL2, Turkey
TrNSL1, Turkey/KF194646		99.8%	99.2%	96.6%	94.8%	94.8%	94.8%	94.8%	94.7%	94.6%	94.6%	94.5%	94.4%	94.3%	99.8%
eruevpar, Turkey/KC376042	99.8%		99.2%	96.2%	94.6%	94.6%	94.6%	94.5%	94.5%	94.4%	94.4%	94.3%	94.0%	94.1%	99.6%
SPOW30, USA, EU627805	99.2%	99.2%		96.0%	94.6%	94.6%	94.6%	94.1%	94.3%	94.4%	94.4%	94.3%	94.1%	94.1%	99.4%
GHOW93-74-48, USA, EU6...	96.6%	96.2%	96.0%		95.4%	95.4%	95.4%	94.5%	94.9%	95.0%	95.2%	96.2%	95.7%	94.7%	96.8%
L_EMSPO05, Russia, EU67...	94.8%	94.6%	94.6%	95.4%		98.3%	97.9%	97.1%	98.1%	95.6%	98.7%	95.2%	94.8%	97.6%	95.0%
CW78, Sweden/DQ847214	94.8%	94.6%	94.6%	95.4%	98.3%		98.6%	96.6%	97.8%	94.8%	99.2%	95.4%	95.6%	97.7%	95.0%
IBT5, Sweden/H1393798	94.8%	94.6%	94.6%	95.4%	97.9%	98.6%		96.2%	97.4%	94.8%	99.2%	95.0%	95.2%	97.3%	95.0%
L-T043, Peru, JQ388708	94.8%	94.5%	94.1%	94.5%	97.1%	96.6%	96.2%		97.8%	94.1%	97.1%	94.5%	93.7%	95.8%	94.5%
LVE6, Venezuela, JQ764623	94.7%	94.5%	94.3%	94.9%	98.1%	97.8%	97.4%	97.0%		94.6%	98.3%	95.8%	94.9%	99.6%	94.9%
HGR1, Sweden/DQ847256	94.6%	94.4%	94.4%	95.8%	95.6%	94.8%	94.8%	94.1%	94.6%		95.2%	95.8%	94.6%	94.3%	94.8%
ISISKIN2, Lithuania, AY193...	94.6%	94.4%	94.4%	95.2%	98.7%	99.2%	99.2%	97.1%	98.3%	95.2%		95.2%	95.2%	98.1%	94.8%
L-T149, Peru, JQ388639	94.5%	94.3%	94.2%	96.2%	95.2%	95.4%	95.0%	94.5%	95.8%	95.0%	95.2%		97.1%	94.7%	94.8%
LAK24, USA, KF314797	94.4%	94.0%	94.1%	95.7%	94.8%	95.6%	95.2%	93.7%	94.9%	94.6%	95.2%	97.1%		94.3%	94.6%
MD-2011, USA, JN792137	94.3%	94.1%	94.1%	94.7%	97.9%	97.7%	97.3%	96.8%	99.6%	94.3%	98.1%	94.7%	94.3%		94.5%
TrNSL2, Turkey	99.8%	99.6%	99.4%	96.8%	95.0%	95.0%	95.0%	94.5%	94.9%	94.8%	94.8%	94.8%	94.6%	94.5%	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1. TrNSL1, Turkey K...							GATACCTTACATTCAACAGGTGCATCTTTTGT			
2. eruevpar, Turkey...							GATACCTTACATTCAACAGGTGCATCTTTTGT			
3. SPOW30, USA, E...						TTATGGAGTGGATGGTGT	TTATGGAGTGGATGGTGT	TTATGGAGTGGATGGTGT		
4. GHOW93-74-48...	TTATGCATATTATAGTATACAACATATCTTAAGAGAATTAATGGAGTGGATGGTGT						TTATGGAGTGGATGGTGT	TTATGGAGTGGATGGTGT		
5. L_EMSPO05, Ru...							TTACATTCAACAGGTGCATCTTTTGT			
6. CW78, Sweden...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
7. IBT5, SwedenAY...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
8. L-T043, Peru, JQ...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
9. LVE6, Venezuela...							CAACAGGTGCATCTTTTGT			
10. HGR1, Sweden...							TTTGT			
11. ISISKIN2, Lithua...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
12. L-T149, Peru, J...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
13. LAK24, USA, K...							CAACAGGTGCATCTTTTGT			
14. MD-2011, USA...							TTTAGATACTTACATTCAACAGGTGCATCTTTTGT			
15. TrNSL2, Turkey...							TCAACAGGTGCATCTTTTGT			
							GATACCTTACATTCAACAGGTGCATCTTTTGT			
1. TrNSL1, Turkey K...	ATTATATTAAC	TATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT				
2. eruevpar, Turkey...	ATTATATTAAC	TATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT				
3. SPOW30, USA, E...	ATTATATTAAC	TATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT				
4. GHOW93-74-48...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
5. L_EMSPO05, Ru...	ATTATATTAACATAT	TACATATATTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
6. CW78, Sweden...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
7. IBT5, SwedenAY...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
8. L-T043, Peru, JQ...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
9. LVE6, Venezuela...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
10. HGR1, Sweden...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
11. ISISKIN2, Lithua...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
12. L-T149, Peru, J...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
13. LAK24, USA, K...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
14. MD-2011, USA...	ATTATATTAACATATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT					
15. TrNSL2, Turkey...	ATTATATTAAC	TATTTACATAT	TTAAGAGGATTAAATTAATTC	TTCTCTTACTTACCTTTATCATGG	TTAGTGGT	TTAGTAATAT				
1. TrNSL1, Turkey K...	TAATAATTTATTTGTAACGCTTTTAT	GGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
2. eruevpar, Turkey...	TAATAATTTATTTGTAACGCTTTTAT	GGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
3. SPOW30, USA, E...	TAATAATTTATTTGTAACGCTTTTAT	GGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
4. GHOW93-74-48...	TAATAATTTATTTGTAACGCTTTTAT	GGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
5. L_EMSPO05, Ru...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
6. CW78, Sweden...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
7. IBT5, SwedenAY...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
8. L-T043, Peru, JQ...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
9. LVE6, Venezuela...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
10. HGR1, Sweden...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
11. ISISKIN2, Lithua...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
12. L-T149, Peru, J...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
13. LAK24, USA, K...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
14. MD-2011, USA...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						
15. TrNSL2, Turkey...	CTTAATATTTATTTGTAACGCTTTTAT	TGGGGTATGCTTTACCATGGGGTCAAATGAGTTTC	TGGGGAGC	ACTGTTATTACTAATTTAT						



Şekil 4.34. Sekans analizi yapılan *Leucocytozoon* izolatlarının parsiyel mt-cytb gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları

Şekil 4.34’de görüldüğü üzere incelemesi yapılan *Leucocytozoon* lineage’leri arasında çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Multible alignment sonuçlarına göre TrNSL1 ve TrNSL2 izolatları arasında identikliğin yüksek olduğu (%99,8) ve her iki izolatın da en yüksek identikliği sırasıyla %99,8 ve %99,6 ile Nevşehir yöresinden bir baykuştan (*Strix aluco*) izole edilen “eruvetpar” izolatı (GenBank: KC876042) ile gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda her iki izolatın Amerika Birleşik Devletleri’nde diğer bir baykuş türünden (*Strix occidentalis*) izole edilmiş “SPOW30” izolatı (GenBank: EU627806) ile de yüksek identiklik (%99,2 ve %99,4) gösterdiği saptanmıştır. İncelenen izolatların mt-cytb gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.35’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta görüldüğü gibi TrNSL1 ve TrNSL2 izolatları baykuş türlerinden izole edilmiş eruvetpar ve SPOW30 izolatları ile aynı cluster’da yer almıştır. TrNSL1 izolatının saptandığı bireysel örneklerden *S. lineatum*’a ait bir dişide (ES11 bkz. Şekil 4.23) aynı zamanda kanatlı kanı pozitifliği belirlenmiş ve sekans analizleri sonucu kanatlı türü bayağı şahin (*Buteo buteo*) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.35. *Leucocytozoon* sp. izolatlarının parsiyel mt-ctb gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Plasmodium sp. Kayseri 1 izolatı (HQ677623) dış grup olarak kullanılmıştır.

Mt-cox1 sekanı belirlenen *Onchocerca* TrOnchSim1 izolatu ile filogenetik analizlere GenBank veri tabanından alınarak dahil edilen diğeri *Onchocerca* sp. izolatları GenBank Aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.17’de gösterilmiştir.

Tablo 4.17. Mt-cox1 gen bölgesi filogenetik analizi yapılan *Onchocerca* izolatlarının dahil olduğu tür, izolasyon yeri, izolasyon konağı ile GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür	İzolasyon Yeri	Konak	Aksesyon No
TrOnchSim1	<i>Onchocerca</i> sp.	Türkiye	<i>Simulium</i> sp. (Genomik DNA Havuzlarından)	KF999650
Eisenbarth Sii1	<i>Onchocerca</i> sp.	Kamerun	<i>Simulium damnosum</i>	KC167352
Eisenbarth Sii3	<i>Onchocerca</i> sp.	Kamerun	<i>Simulium damnosum</i>	KC167354
Eisenbarth Sii2	<i>Onchocerca</i> sp.	Kamerun	<i>Simulium damnosum</i>	KC167353
Eisenbarth Oo1	<i>Onchocerca ochengi</i>	Kamerun	<i>Simulium damnosum</i>	KC167350
Eisenbarth Oo2	<i>Onchocerca ochengi</i>	Kamerun	<i>Simulium damnosum</i>	KC167358
M3	<i>Onchocerca volvulus</i>	İtalya	İnsan	AM749284
M4	<i>Onchocerca volvulus</i>	İtalya	İnsan	AM749285
Onc.gib	<i>Onchocerca gibsoni</i>	Avustralya	Sığır	AJ271616
Onc.gut	<i>Onchocerca gutturosa</i>	Kamerun	Sığır	AJ271617
Onc.fas	<i>Onchocerca fasciata</i>	Çin	Deve	JQ316672
S51_9	<i>Onchocerca eberhardi</i>	Japonya	Geyik	AM749268

Parsiyel mt-cox1 gen bölgesi yönünden nükleotid dizileri belirlenen *Onchocerca* TrOnchSim1 izolatu ile GenBank’ta mevcut alignmentta dahil edilen diğeri *Onchocerca* izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları Tablo 4.18’de, multiple alingmentları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.36’da gösterilmiştir.

Tablo 4.18. *Onchocerca* izolatlarının pairwise alignmentları sonucu identiklik oranları

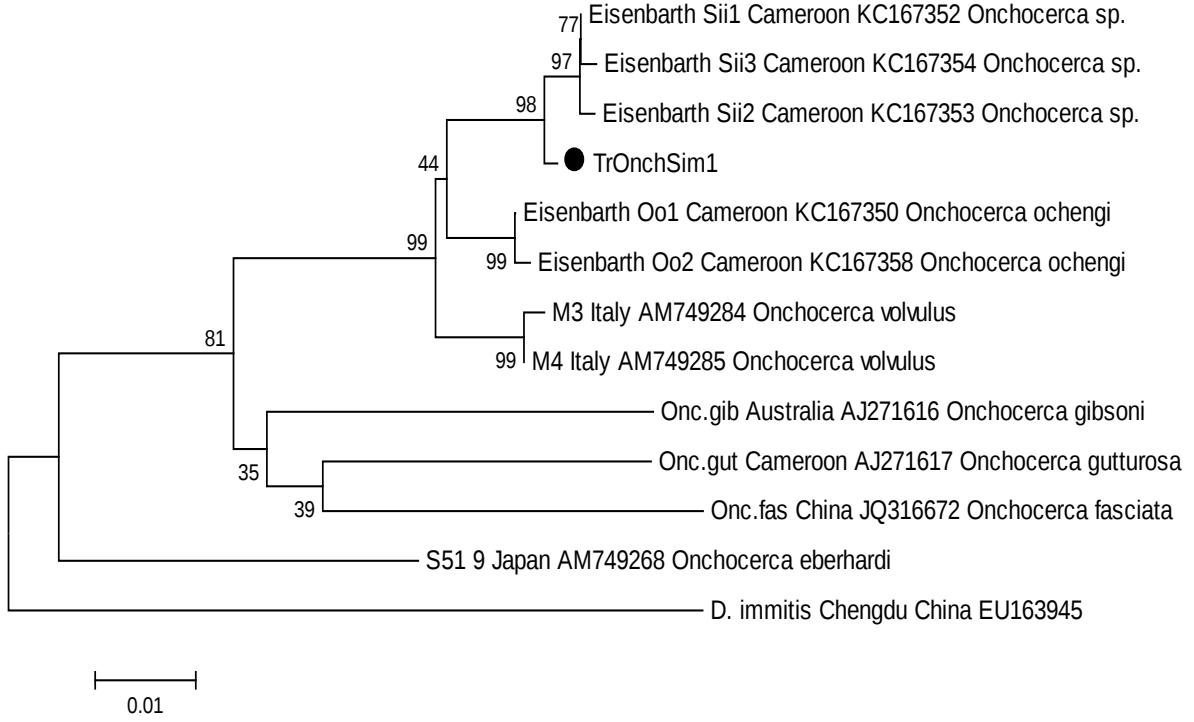
	Eisenbarth Si...	Eisenbarth Si...	Eisenbarth Si...	Eisenbarth O...	Eisenbarth O...	M3, Italy, A...	M4, Italy, A...	Onc.gib, Aus...	Onc.gut Ca...	Onc.fas Chin...	S51_9, Japa...	TrOncSim1
Eisenbarth Si1, Cameroon,...		99.8%	99.8%	98.0%	97.8%	97.6%	97.8%	93.2%	92.5%	92.6%	91.8%	99.5%
Eisenbarth Si3, Cameroon,...	99.8%		99.7%	97.8%	97.7%	97.4%	97.6%	93.1%	92.4%	92.4%	91.6%	99.4%
Eisenbarth Si2, Cameroon,...	99.8%	99.7%		97.8%	97.7%	97.4%	97.6%	93.4%	92.4%	92.4%	91.8%	99.4%
Eisenbarth Oo1, Cameroon...	98.0%	97.8%	97.8%		99.8%	98.3%	98.6%	93.1%	92.8%	92.9%	92.6%	98.4%
Eisenbarth Oo2, Cameroon...	97.8%	97.7%	97.7%	99.8%		98.1%	98.4%	92.9%	92.7%	93.1%	92.6%	98.2%
M3, Italy, AM749284	97.6%	97.4%	97.4%	98.3%	98.1%		99.8%	92.6%	93.8%	92.4%	92.6%	97.6%
M4, Italy, AM749285	97.8%	97.6%	97.6%	98.6%	98.4%	99.8%		92.8%	94.0%	92.6%	92.9%	97.8%
Onc.gib, Australia, AJ271616	93.2%	93.1%	93.4%	93.1%	92.9%	92.6%	92.8%		93.6%	91.5%	90.5%	93.5%
Onc.gut Cameroon, AJ271...	92.5%	92.4%	92.4%	92.8%	92.7%	93.8%	94.0%	93.6%		93.3%	91.0%	92.9%
Onc.fas China, JQ316672	92.6%	92.4%	92.4%	92.9%	93.1%	92.4%	92.6%	91.5%	93.3%		90.0%	92.7%
S51_9, Japan, AM749268	91.8%	91.6%	91.8%	92.6%	92.6%	92.6%	92.9%	90.5%	91.0%	90.0%		92.1%
TrOncSim1	99.5%	99.4%	99.4%	98.4%	98.2%	97.6%	97.8%	93.5%	92.9%	92.7%	92.1%	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1. Eisenbarth Si1, Cameroon,...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
2. Eisenbarth Si3, Cameroon,...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
3. Eisenbarth Si2, Cameroon,...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
4. Eisenbarth Oo1, Cameroon...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
5. Eisenbarth Oo2, Cameroon...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
6. M3, Italy, AM749284				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
7. M4, Italy, AM749285				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
8. Onc.gib, Australia, AJ271616				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
9. Onc.gut Cameroon, AJ271616				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
10. Onc.fas China, JQ316672				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
11. S51_9, Japan, AM749268				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						
12. TrOncSim1 (A...				TGGGATGTTGCCCTTTGATGTTAGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGGGTAAATGCTTTTGTCTTTTGTGATTTACTTTT						

	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
1. Eisenbarth Sii1...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
2. Eisenbarth Sii3...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
3. Eisenbarth Sii2...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
4. Eisenbarth Oot1...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
5. Eisenbarth Oot2...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
6. M3, Italy, AM749...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
7. M4, Italy, AM749...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
8. Onc.gib, Australi...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
9. Onc.gut Camero...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
10. Onc.fas China...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
11. S51_9, Japan...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
12. TrOnchSim1 (A...	TTATTGTTT	TGTTGTTG	TGGATCG	TAATTTT	AAATACTT	CTTTTAT	GATACTA	AGAGGGGG	TAATCCT	TTGTTG
	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590
1. Eisenbarth Sii1...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
2. Eisenbarth Sii3...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
3. Eisenbarth Sii2...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
4. Eisenbarth Oot1...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
5. Eisenbarth Oot2...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
6. M3, Italy, AM749...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
7. M4, Italy, AM749...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
8. Onc.gib, Australi...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
9. Onc.gut Camero...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
10. Onc.fas China...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
11. S51_9, Japan...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
12. TrOnchSim1 (A...	TGGTCATCC	TGAGGTG	TATGTTA	TATTTT	TACCTG	TTTTT	TGGTATT	TATTAGG	GAAGCG	GTTTT
	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690
1. Eisenbarth Sii1...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
2. Eisenbarth Sii3...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
3. Eisenbarth Sii2...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
4. Eisenbarth Oot1...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
5. Eisenbarth Oot2...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
6. M3, Italy, AM749...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
7. M4, Italy, AM749...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
8. Onc.gib, Australi...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
9. Onc.gut Camero...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
10. Onc.fas China...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
11. S51_9, Japan...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC
12. TrOnchSim1 (A...	CTAGGATG	ACTTTTG	CCTTCTA	TTTGG	ATTGCTG	TTTTAGG	ACTTCTG	TGTGAGG	TCATCAT	TGTATAC

Şekil 4.36. Sekans analizi yapılan *Onchocerca* izolatlarının parsiyel mt-cox1 gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin multiple alignmentları

Şekil 4.36’da görüldüğü üzere incelemesi yapılan *Onchocerca* tür ve izolatları arasında çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Multible alignment sonuçlarına göre TrOnchSim1 izolatı en yüksek identikliği %99,5 ile Kamerun’da *Simulium damnosum*’dan izole edilmiş “Eisenbarth Sii1” izolatı (GenBank: KC167352) ile göstermiştir. Ayrıca TrOnchSim1 izolatının aynı ülke ve aynı *Simulium* türünden (*S. damnosum*) izole edilmiş “Eisenbarth Sii2” (GenBank: KC167353) ve “Eisenbarth Sii3” (GenBank: KC167354) izolatları ile de yüksek identiklik (%99,4) gösterdiği belirlenmiştir. İncelenen izolatların mt-cox1 gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.37’de verilmiştir. Filogenetik ağaçta görüldüğü gibi TrOnchSim1 izolatı *Simulium damnosum*’dan izole edilmiş “Eisenbarth Sii1-Sii3” izolatları ile aynı cluster’da yer almıştır.



Şekil 4.37. *Onchocerca* sp. TrOnchSim1 izolatının parsiyel mt-ctb gen bölgesine göre diğer *Onchocerca* tür ve izolatlarıyla filogenetik ilişkisi (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. *Dirofilaria immitis* Chengdu China izolatı (EU163945) dış grup olarak kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diptera dizisi Nematocera dizi bölümünde yer alan ve dünyanın her bölgesinde görülen Simuliidae (Blackflies, Kara sinekler) ailesinde bugüne kadar 2101'i yaşayan, 12'si ortadan kalkmış (fosil) toplam 2113 tür tarif edilmiştir. Bunların 1697'si *Simulium* soyunun 36 alt soyunda yer almıştır (Adler ve Crosskey, 2011). Simuliidlerin immatür gelişme dönemleri akuatik insekt topluluklarının dominant üyeleri olup akarsulardaki diğer bazı canlılar (detritivore) için besin zincirinin önemli bir halkasını oluştururlar (Cummins, 1987). Karasinekler ayrıca insektlerden zengin akarsularda biodiversitenin ölçümünde yaygın kullanılan ideal bir organizma grubunu oluştururlar (Hamada ve Grillet, 2001). Simulid popülasyonu uygun çevresel koşullarda çok yüksek yoğunluğa ulaşabilir. Akarsularda besin zincirinin önemli bir ayağını oluşturan simuliid larvaları beslenmelerindeki filtre sistemleri ile sudaki organik maddelerin uzaklaştırılmasında da önemli rol oynarlar ve bu sayede akarsuların temizliğini sağlayarak ekosistemde indikatör görevi görürler (Currie ve Adler, 2008). Günümüze kadar Palearctic bölgede Simuliidae ailesinde 660'ın üzerinde türün varlığı rapor edilmiştir. Aynı bölgede yer alan Türkiye'de ise morfometrik analizlere göre bildirilen tür sayısı 63 ile sınırlı kalmıştır (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990; Clergue-Gazeau ve Kazancı, 1992; Özbek vd., 1995; Balık vd., 2002; Şirin ve Şahin, 2005; Crosskey ve Zwick, 2007; Zwick, 2007; Yılmaz vd., 2007; Kazancı ve Ertunç, 2008a,b; Ertunç vd., 2008; Ertunç, 2009; Kazancı ve Ertunç, 2010). Öte yandan Türkiye'de günümüze kadar simuliidler üzerine sito-kromozomal ve moleküler tabanlı identifikasyon ve klasifikasyon çalışmalarının yapılmadığı dikkati çekmiştir. Bu çalışma ile Türkiye'de Orta Kızılırmak Havzasında yayılış gösteren ve soruna yol açan simuliid türleri morfometrik analizlerin yanında kromozomal ve moleküler analizlerle araştırılmıştır. İncelenen örnekler arasında *S. Wilhelmsia* alt soyunda iki tür identifiye edilmiş olup *S. Wilhelmsia lineatum*'un primer yaygın tür olduğu, *S. Wilhelmsia balcanicum*'un ise daha sınırlı yayılış gösterdiği saptanmıştır. Morfometrik analizlerle *S. Wilhelmsia lineatum* Türkiye'de Büyük Menderes, Çoruh, Kızılırmak, Yeşilirmak, Sakarya Irmağı ve Köyceğiz'de (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990; Yılmaz vd., 2007; Kazancı ve Ertunç, 2008a,b; Gazyağcı, 2011); *S. Wilhelmsia balcanicum*'a Büyük Menderes, Kızılırmak, Sakarya Irmağı ve Yeşil Irmak (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990; Kazancı ve Ertunç, 2008a,b) havzalarında rapor edilmiştir. Türkiye'nin değişik akarsularında varlığı bildirilmiş (Kazancı ve Clergue-Gazeau, 1990; Kazancı ve Ertunç, 2008a,b) olan *Wilhelmsia* alt soyundaki *S. W. equinum*, *S. W. pseudoequinum*, *S. W. paraequinum*, *S.W. veltistshevi* ve *S. W. turgaicum* türlerine bu çalışmanın yürütüldüğü araştırma sahasında rastlanmamıştır.

Simuliidlerin biyoekolojisi ve larval gelişimlerinde akarsu coğrafik yapısı, vejetasyonu, debisi ve su sıcaklığı gibi çeşitli çevresel faktörlerin önemli olduğu kaydedilmektedir (Crosskey, 1990; Adler vd., 2010). Ayrıca akarsu yataklarına inşaa edilen hidroelektrik santrallerinin de

simulium popülasyonlarının artmasında önemli bir dinamik faktör olduğu bildirilmektedir (Adler vd., 2010). Nitekim proje çalışmasının yürütülmüş olduğu Orta Kızılırmak Havzasında Yamula Barajı Hidroelektrik santralinin 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte *Simulium* spp. popülasyonunda afet boyutunda büyük bir artış meydana gelmiştir (Yılmaz vd., 2007; Yeşilöz, 2011). Takip eden süreçte larvicid (BTI) uygulamalarıyla yürütülen kapsamlı bir mücadele programı başlatılmış olup yörede simuliid popülasyonu kontrol edilebilir seviyeye düşürülmüştür. Bunun yanında, araştırma yöresinde son dönemde Avanos-Gülşehir arasında kurulan 3 adet ve Bayram Hacılı-Gülşehir arasında kurulan 2 adet mikro hidroelektrik santrallerinin (HES) inşa edilmesine bağlı olarak, santraller arasında kalan nehir yatağının neredeyse bir kanal haline dönüştüğü, bir santralden bırakılan suyun yaklaşık 1 km bir akış gösterdikten sonra diğer santrale yaklaştıkça gölet haline geldiği, derinliğinin arttığı ve buna bağlı olarak suyun akışkanlığının çok yavaşladığı gözlenmiştir. Dolayısıyla özellikle kanal haline dönüştürülen nehir yatağında vejetasyonun bozulduğu, çoğu alanda nehrin göletler oluşturduğu ve sudaki oksijen miktarında azalmaya yol açtığı görülmüştür. Tüm bu faktörler gelişiminde temiz ve oksijeni bol akışkan suya ihtiyaç gösteren *Simulium* gelişme dönemleri üzerine olumsuz etki göstermiş ve araştırma bölgesinde *Simulium* popülasyonunun oldukça azaldığı dikkati çekmiştir. Araştırma süresince yapılan pH, su sıcaklığı ve ortalama nisbi nem ölçümleri ile simuliid larva popülasyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel analizinde, su sıcaklığı ile pozitif yönlü önemli bir ilişki ($p < 0,05$) saptanırken, pH ve ortalama nisbi nem değerleri arasında ise önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonucun bazı araştırmacıların bulguları ile (Ross ve Merritt 1978; De Moor, 1982; Crosskey, 1990) uyumlu olduğu görülmüştür.

Sitogenetik çalışmalar simuliidlerin popülasyon genetikleri ile evrimlerinin anlaşılmasının yanısıra biyolojilerindeki naklettikleri hastalıkların epidemiyolojisindeki rolleri gibi bir çok faktörün ortaya çıkarılmasında anahtar rol üstlenmiştir (Adler vd., 2010). Simuliidler yapısal homojeniteleri ile bilinirler. Larval dönemlerin tükrük bezlerindeki kromozomların sitolojik analizleri, morfolojik olarak sınıflandırılan taksonların sıklıkla kromozomal olarak farklı kardeş (sibling) türleri ihtiva ettiğini göstermiştir. Kromozomlar nükleer genomun kalıtsal elementleri olup içlerindeki değişimler mutasyonun bağımsız birimlerini ortaya koyar (Dobigny vd., 2004). Bu özelliklerinden dolayı kromozomal inversiyonlar simuliidlerde taksonomik ve filogenetik indikatörler olarak kabul edilmektedirler (Rothfels, 1979, 1981, 1989). Sitogenetik çalışmalarla simuliidlerde birçok tür kompleksleri keşfedilmiştir (Shields ve Procunier, 1982; Adler vd., 2004). Günümüze kadar *Wilhelmia* alt soyunda altı türün kromozomları tarif edilmiştir (Grinchuk ve Chubareva, 1974; Petrova vd., 2003, Chubareva ve Petrova, 2006). Ancak türler arasında bant profil kıyaslaması yapılan yalnız bir çalışma (Weber ve Grunewald, 1989) mevcut olup bu çalışmada güneybatı Almanya'dan elde edilen *S. equinum*

ve *S. lineatum* türlerinin polytenleri karşılaştırılmıştır. Mevcut araştırmamızda, sitogenetik analizler için görev alan Prof. Dr. Peter Adler tarafından yapılan kromozomal analizler sonucunda *S. lineatum* ve *S. balcanicum* Türkiye izolatlarının ilk kez sitogenetik analizleri ve kromozom bant farklılıkları ortaya konulmuş olup elde edilen sonuçlar projenin diğer bir çıktısı olarak bilimsel makaleye dönüştürülmek üzeredir. Yapılan sitogenetik analizlerde *S. balcanicum* ve *S. lineatum*'da bütün nukleuslarda chromocenterin var olmasının bu iki türün aynı soy altındaki *S. equinum* ve *S. pseudequinum*'dan ayrımında belirgin bir marker olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında *S. balcanicum*'un kromozomal olarak *S. lineatum*'dan iki sabit (fixed) (IS-4 ve IL-11), iki sabite yakın (nearly fixed) (sıklık > 0.92) inversionlar (IIIL-9 ve IIIL-10) ve yaklaşık 100 unique polimorfizmle ayırt edilebildiği ortaya konmuştur. *S. balcanicum*'da polimorfizm düşük belirlenmiş ve farklı cytoformlarına rastlanılmamıştır. Elde edilen sonuçlar *S. balcanicum*'un tek bir tür kompleksi olduğuna ve sibling türler bulunmadığına dair veriler ortaya koymuştur. Buna karşın *S. lineatum*'da kromozomal polimorfizm daha yüksek saptanmış ve iki ayrı cytoformunun (A ve B) olduğu belirlenmiştir. Cytoform A'ya daha çok İngiltere ve Almanya izolatlarında rastlanırken, Cytoform B'ye ise daha çok Türkiye izolatlarında rastlanmıştır. Cytoform A'nın cytoform B'den daha yüksek polimorfizm göstermesi ve özellikle kromozomların yarısından fazlasında IS-4, IL-10, IL-11, IIL-9, ve IIIL-5 inverzyonların görülmesiyle ayrıldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular *S. lineatum* içerisinde kardeş (sibling) türlerin olabileceğine dair veriler sağlamıştır.

Kromozomal, moleküler ve morfolojik karakterlerin birlikte uygulanması ile birçok simuliid nesilleri (major lineages, örneğin, alt aileler ve soylar) arasındaki evrimsel ilişki açıklığa kavuşturulmuştur (Rothfels, 1979; Moulton, 2000; Adler vd., 2004). Morfolojinin evrimsel analizi, çevresel faktörlerden etkilenebildiği için genellikle zordur. Bunun yanında kendi gerçeği içinde morfolojik analiz direkt olarak uygulanabilirliği yönünden önem arz etmektedir. Örneğin tarsal tırnağın şekli, konak derisine tutunmada bir adaptasyon olarak nitelenmektedir (Gryaznov, 1992). Kromozomal varyasyonlar direkt uygulanabilir karakterde değildir. Ancak kullanışlı genetik markerları sağlarlar. Sitogenetik varyasyonun uygulanabilirliği sınırlı olup, tüm genetik varyasyonları yansıtmamaktadır. Bu açıdan kromozomal varyasyonlarla ilişkili olmayan kardeş (sibling) türlerin çeşitliliği henüz netliğe kavuşmamıştır. Moleküler biyolojik teknikler simuliid türlerinin analizi için daha çok özelliğin incelenmesine imkan sağlamıştır. Bu teknikler genel olarak nükleik asitler (genellikle DNA), proteinler (enzimler ve yapısal proteinler) ve ikincil metabolitler (örn; lipitler ve karbonhidratlar) olarak üç gruba ayrılmaktadır. DNA varyasyonu genettir. Bunların ekspresyonu morfolojik evrimsel analizlerin aksine çevresel faktörlerden etkilenmemektedirler. İlgili genin kodon sekansını yansıtan protein varyasyonu, amino asit dizilimlerindeki değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte protein

varyasyonu, post-translasyonel modifikasyondan da etkilenebilir. Böylece bu varyasyonlar, her zaman genetik olarak saptanamayabilir (Pasteur vd., 1988). İkincil metabolitler ise enzimatik faaliyetler sonucu ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bunlar, genetik temelden bir adım daha uzakta bulunurlar. Sitogenetik, morfolojik (Grenier ve Rageau, 1960; Currie, 1988) ve moleküler (Moulton, 2000) çalışmalar, Simuliinae alt ailesinin holoarctic Prosimuliini ve tüm dünyada yaygın olan Simuliini olmak üzere iki üst soya (Şekil 2.1) ayrıldığını ortaya koymuştur.

Simuliid türlerinin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri çalışılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 16S ve 18S small subunit, 5.8S ve 28S gibi large subunit, ITS-1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri; mitokondriyal gen bölgeleri için ise NAD4 ve COI gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (Tang ve Unnascgh, 1995; Tang vd., 1995; Higazi vd., 2001; Thanwisai vd., 2006; Kruger ve Hennings, 2006; LaRue vd., 2009; Rivera ve Currie, 2009; Pramual vd., 2011). Cytochrome c oxidase enzimi, bakteri ve mitokondrilerde bulunan geniş transmembran protein kompleksidir. Mitokondrinin membranında yer alan elektron transport zincirindeki en son enzimidir. Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (Khalimonchuk ve Rödel, 2005). Simuliid türler üzerine GenBank'ta mt-COI gen bölgesinin araştırıldığı farklı ülkelerden çeşitli kayıtlar bulunmaktadır. Pramual vd., (2011), *Gomphostilbia* altsoyundaki 13 türden oriental karasinek (Oriental black fly) mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin farklılıkları üzerine yaptıkları filogenetik araştırmada, intraspesifik genetik farklılığı, ortalama %2,75 (%0-9.28) interspesifik genetik farklılığı ise %11,41 (%0,34-18.84) olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar (Pramual vd., 2011) mt-COI gen bölgesine göre DNA barkodlamasının cryptik biyo farklılığı (biodiversity) belirlemede ve geleneksel taksonomiye kolaylaştırmada önemli olduğunu kaydetmişler, morfolojik kriterlere göre belirlenen *Gomphostilbia* altsoyundaki tür gruplarının monophyletic olmadığını ve bu soydaki klasifikasyonun tekrar değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Pramual ve Kuvangkadilok (2012), *S. angulistylum*'un diversitesini araştırmak amacıyla sitogenetik, mt-COI sekans ve ekolojik analizleri bir arada kullanmışlar ve fixed kromozom inverziyonları ile karakterize olan üç cytoformun (A, B ve C) varlığını ortaya koymuşlardır. Bu cytoformlardan A ve B olanları ekolojik olarak düşük rakımlı habitatlarda, C olanı ise yüksek rakımlı habitatlarda görüldüğünü belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar (Pramual ve Kuvangkadilok, 2012) mt-COI DNA sekans analizleriyle bu cytoformlar arasında önemli genetik farklılıklar tespit etmişler, ayrıca cytoformların içinde de gizli diversiteyi gösteren farklı nesillerin varlığını ortaya koymuşlardır. Rivera vd. (2009), Nearctic simuliid türleri içerisinde

morfolojik olarak farklı 65 tür ve kardeş tür içeren tür kompleksinde genetik varyasyonu, mt-COI gen bölgesine göre araştırmışlar, benzer türler arasında genetik varyasyonu ortalama %14,93 (%2,83-15,33) olarak saptarken morfolojik farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise ortalama %0.72 (%0-3,84) olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar (Rivera vd., 2009) mt-COI gen bölgesi DNA barkodlamasının simuliidlerdeki cryptic çeşitliliğin araştırılmasında ve tür identifikasyonunda etkili bir yöntem olduğunu kaydetmişlerdir. Mevcut araştırmamızda *Wilhelmia* alt soyunda yer alan *S. lineatum*, *S. balcanicum* ve *S. equinum* türleri Dünyada ilk kez morfolojik, kromozomal ve moleküler yöntemlerle analiz edilmiş ve farklılıkları araştırılmıştır. Mt-COI gen bölgesine göre Almanya'dan analizlere dahil edilen izolatlarla birlikte toplam 38 izolat analiz edilmiş, *Simulium Wilhelmia* altsoyundaki türlere ait izolatlar arasında korunmuş bölgelerle birlikte türler arasında ve tür içinde intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. *Simulium Wilhelmia* alt soyundaki türlere ait izolatların mt-COI gen bölgesine göre filogenetik analizinde; *S. Wilhelmia balcanicum* izolatlarının filogenetik ağaç üzerinde tek bir clusterda yer aldığı görülmüş ve genetik farklılığın, *S. Wilhelmia lineatum* izolatlarına göre yarıyariya düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuç kromozomal analiz sonuçları ile paralel şekilde polimorfizmin *S. balcanicum*'da daha düşük olduğunu ortaya koymuş ve bu türün tek bir tür kompleksi olabileceği hipotezini güçlendirmiştir. *S. Wilhelmia lineatum* izolatlarının ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki ayrı clusterda yer aldığı görülmüş ve mt-COI gen bölgesine göre genetik farklılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar da kromozomal analiz sonuçlarına paralel şekilde *S. lineatum*'da farklı cytoformlar olduğunu ve tür altında kardeş (sibling) türlerin varlığı hipotezini güçlendiren veriler sağlamıştır. Ayrıca elde edilen mt-COI filogenetik analiz sonuçları Pramual ve Kuvangkadilok (2012),'in bulgularına paralel olarak *S. lineatum* cytoformlarının içinde de farklı nesillerin varlığına dair veriler sağlanmıştır. Mt-COI filogenetik analizlerine göre grup farklılıkları incelendiğinde *S. Wilhelmia balcanicum* ve *S. Wilhelmia lineatum* izolatları birbirine yakın bulunurken aynı altsoydaki *S. Wilhelmia equinum*'un bu iki türden yüksek genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda Litvanya'dan *S. Wilhelmia lineatum* ve *S. Wilhelmia equinum* olarak GenBank kayıtları girilen, Türkiye dahil Avrupa'nın çeşitli ülkelerinden bir şekilde elde edilmiş çeşitli izolatların tür identifikasyonlarının hatalı olduğu da ortaya konmuş ve gerekli doğrulama ve düzeltmenin yapılması yönünde 5th International Simuliidae Symposium'unda ilgili araştırmacıya gerekli uyarılarda bulunulmuştur.

Insektlerdeki ribozomal DNA diğer ökaryotlarda olduğu gibi birbirinden önceden “nontranscribed spacers (NTS)” olarak bilinen intergenik spacerlar (IGS) ile ayrılmış birbirini takip eden ünitelerden oluşmuştur. Her ünite; sırasıyla 18S, 5.8S, ve 28S ribosomal RNA'yı kodlayan genler ile spacerlardan [external transcribed spacer (ETS) ve internal transcribed

spacers 1 (ITS1) ve 2 (ITS2)] oluşur (Hillis ve Dixon, 1991). Kodlanmayan bölgeler ITS-1 ve ITS-2, kodlanan 18S, 5.8S, ve 28S rDNA genleri arasında yer alır. ITS-1, küçük subunit 18S ve 5.8S subunitleri birbirinden ayırırken, ITS-2, büyük subunit 5.8S ve 28S gen bölgelerini ayırır. 18S, 5.8S, ve 28S kodlanan gen bölgeleri, yüksek düzeyde korunmuş olup üst düzey filogenilerin inşasında yaygın olarak kullanılır (Nirmala vd., 2001; Shi vd., 2005). Bunun aksine kodlanmayan gen bölgeleri ITS-1 ve ITS-2 yüksek düzeyde değişkenlik gösterir ve kodlanan bölgelere göre daha hızlı oranda değişim gösterir (Schlotterer vd., 1994). Nükleer rDNA'da bulunan intergenik spacer ITS-2, birçok simuliid türünde tek bir kromozom üzerinde yerleşmiş (Rothfels, 1979) bir gen bölgesi olup, birçok organizmanın filogenetik çalışmalarında moleküler araçlara büyük bir katkısı olmuştur. ITS-2 sekans kıyaslamaları birbirine yakın türlerin ayırımında (Tang vd., 1996; Walton vd., 1999; Malafronte vd., 1999; Hackett vd., 2000), popülasyon farklılıklarında (Fritz vd., 1994; Marrellin vd., 1999) ve evrimsel ilişkilerin yeniden oluşturulmasında (Malafronte vd., 1999; Depaquit vd., 2000; Weekers vd., 2001; Oliverio vd., 2002; Toma vd., 2002; Young ve Coleman, 2004; Thanwisai vd., 2006; LaRue vd., 2009) oldukça kullanışlı olmuştur. *Simulium* soyunda yer alan çeşitli türler üzerine ITS-2 gen bölgesi yönünden karakterizasyon çalışmaları ve GenBank kayıtları yapılmış olmasına karşın günümüze kadar *Wilhelmia* alt soyundaki türlerin ITS-2 sekans analizleri ve karakterizasyonları üzerine her hangi bir çalışma ve GenBank kaydı yapılmamıştır. Bu açıdan bu çalışma ile elde edilen nükleer ribozomal ITS-2 sekans ve karakterizasyon sonuçları bu alanda Dünya'da bir ilki oluşturmuş olup önemli bir bilimsel veri açığını da kapatmıştır. ITS-2 gen bölgesi filogenetik analizlerine göre *Simulium Wilhelmia* altsoyundaki türlere ait izolatların özellikle tür içinde olmak üzere homolojilerinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında farklı canlı ve türler üzerinde çalışmış bazı araştırmacıların (Tang vd., 1996; Walton vd., 1999; Marrellin vd., 1999; Hackett vd., 2000) bulgularına paralel olarak birbirine yakın olan *Wilhelmia* alt soyundaki türler arasında da tür spesifik nükleotid varyasyonlarının varlığı ortaya konmuş ve filogenetik ağaçta mt-COI gen bölgesine paralel olarak *S. balcanicum* ve *S. equinum* izolatlarının ayrı ayrı tek bir clusterda, *S. lineatum* izolatlarının ise üç clusterda yer aldığı görülmüştür. ITS-2 gen bölgesine göre tür içi genetik homolojinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ortaya konan bu özelliği ile pest kontrolünde ve tür bazlı identifikasyon çalışmalarında konfirmasyon aracı olarak ITS-2 gen bölgesinin mt-COI gen bölgesine göre daha ideal bir genetik marker olduğu saptanmıştır.

Kan ile beslenen (haematophagous) artropodların beslenme yapıları ve konak tercihleri, birçok patojenin çoğalması ve omurgalı konaklara bulaşması açısından oldukça önemlidir (Dye ve Hasibeder, 1986; Munoz vd., 2011). Vektörlerde beslenme yapılarının ve konak tercihlerinin belirlenmesi, vektör-borne hastalıklarla etkili mücadele stratejilerinin ve

politikalarının oluşturulmasına, salgın risklerinin azalmasına ve hem insan hem de hayvanlarda bu hastalıkların ekoepidemiolojilerinin daha iyi anlaşılmasına oldukça önemli katkısı vardır (Dye ve Hasibeder, 1986). Ergin dişi simuliidlerin kan ile beslenmesinde konak tercihlerinin belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Simmons vd. (1989), Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli bölgelerden topladıkları simuliid türlerinde konak kanı identifikasyonu amacıyla serolojik olarak modifiye kapillar presipitasyon tekniğini kullanmışlar ve identifiye ettikleri *P. magnum*, *P. mixtum*, *St. mutata*, *S. gouldingi*, *S. verum*, *S. aureum*, *S. croxtoni*, *S. jenningsi*, *S. tuberosum*, *S. verecundum*, *S. venustum* ve *S. vittatum* türlerinde konak kanı pozitifliğinin dağılımını %31 equide, %25 sığır, %19 rakun, %13 sınıflandırılmamış memeli ve %5 kanatlı olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmada (Simmons vd., 1989) pozitiflerin %7'si ise birden fazla konak kanı ile pozitif bulunmuş ve ayrıca bir *Prosimulium mixtum/fuscum* örneğinde köpek ve bir *S. verum* örneğinde ise insan kanı pozitifliği saptanmıştır. Hellgren vd. (2008), İsveç'te değişik bölgelerden topladıkları ve identifiye ettikleri *S. transiens*, *M. lyra*, *S. usovae*, *S. annulus* ve *S. silvestre* türlerine ait örneklerden DNA izolasyonunu takiben örnekleri omurgalı mt- cytb gen bölgesini amplifiye eden primerlerle moleküler olarak analiz etmişlerdir. Aynı araştırmacılar (Hellgren vd., 2008), sekans analizleri sonucu kanatlı pozitif belirlenen örneklerin konak kanı identifikasyonlarını moleküler olarak *Galliformes* spp., *Anas* spp., *Grus grus*, *Turdus* spp., *Numenius arquata* ve *Passeriformes* spp. olarak belirlemişler, *Leucocytozoon* enfeksiyonları yönünden risk faktörleri arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Imura vd. (2010), Japonya'nın alpine bölgesinde topladıkları *S. japonicum*, *P. hirtipes*, *P. yezoense*, *Cnephia mutata* ve *P. novum* türlerine ait 144 dişi simuliid örneğinin 34'ünde (%23,6) moleküler olarak kanatlı kanı pozitifliği belirlemişler, memeli kanı pozitifliğine ise rastlamamışlardır. Aynı araştırmacılar (Imura vd., 2010), kanatlı mt-cytb gen bölgesi sekanslarına göre kanatlı türlerini; *Lagopus mutus* (en yaygın), *Syrnaticus soemmerringii*, *Phasianus versicolor*, *Phasianus colchicus*, *Coturnix japonica*, *Bambusicola thoracica*, *Picoides majör*, *Picoides leucotos*, *Milvus migrans*, *Buteo buteo*, *Accipiter nisus*, *Accipiter gentilis*, *Aquila chrysaetos*, *Spizaetus nipalensis*, *Treron sieboldii*, *Streptopelia orientalis*, *Hirundapus caudacutus*, *Falco tinnunculus* ve *Cuculus fugax* olarak belirlemişlerdir. Günümüze kadar araştırmamızda belirlediğimiz *S. lineatum* ve *S. balcanicum* türlerinin kan beslenme eğilimleri üzerine dünyada herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda konak kanı belirlenmesi amacıyla memeli ve kanatlı spesifik mt-cytb geni amplifikasyonu ve sekans analizi uygulanmıştır. Simuliid örneklerin birden fazla konaktan kan emme potansiyelleri göz önüne alınarak moleküler analizlerde belirlenen ampikonlar tek bir türü ortaya koyabilmek amacıyla klonlanmış ve insertlere ait plasmidler sekanslanarak konak türü tayini yapılmıştır. İncelenen 150 dişi simuliid örneğinden 51'i (%34,0) konak kanı (memeli+kanatlı) yönünden pozitif belirlenmiştir. Pozitif örneklerin 23'ü

(%45,1) yalnızca memeli, 11'i (%21,6) yalnızca kanatlı, 17'si (%33,3) ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Hem *S. lineatum* hem de *S. balcanicum* için beslenme eğilimlerinde memeli tercihi istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup elde edilen bu sonuç Simmons vd. (1989)'nın bulguları ile paralellik göstermiştir. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden klonlama sonrası kanatlı için 15, memeli için ise 25 plasmid konak türü tayini için mt-cytb gen bölgesi sekans analizine tabii tutulmuştur. Sekans ve alignment analizleri sonucu her iki tür için kanatlı türlerinden Alakarga (*Garrulus glandarius*), Saksakağan (*Pica pica*) ve Leylek (*Ciconia ciconia*) türleri identifiye edilirken; *S. lineatum* için ayrıca 3 örnekte Bayağı Şahin (*Buteo buteo*) pozitifliği tespit edilmiştir. Kanatlı kanı pozitif örnekler arasında en yüksek oranı Saksakağan (*Pica pica*) türü göstermiştir. Memeli pozitif örneklerde analizler sonucu her iki tür için köpek (*Canis lupus familiaris*), koyun (*Ovis aries*) ve Sığır (*Bos taurus*) türleri identifiye edilirken *S. lineatum*'da ayrıca 2 örnekte at (*Equus ferus caballus*) pozitifliği saptanmıştır. Memeli kanı pozitif örnekler arasında en yüksek oranı sığır göstermiştir. Çalışmamızda yapılan moleküler analizlerde ergin dişi simuliidlerde insan (*Homo sapiens*) kanı pozitifliğine rastlanmamıştır. Buna karşılık, aynı araştırma yöresinde simuliid popülasyonunun yükseldiği ve salgın boyutuna ulaştığı dönemde yapılan saha gözlemlerinde simuliidlerin insanlardan kan emdiği rapor edilmiştir (Yeşilöz vd., 2011). Mevcut çalışmada, Orta Kızılırmak Havzasında saptanan simuliid türleri ile bunların beslenme eğilimlerinin moleküler identifikasyonu, evcil memeli ve yabani kanatlı türlerine vektör-borne çeşitli patojenlerin nakilleri açısından önemli risk faktörleri oluşturduklarını ortaya koymuştur. Bu sonuç literatüre katkı bakımından Dünyada elde edilmiş ilk verilerdir.

Dünyada 2101 nominal simuliid türünün %98'inin omurgalı (memeli+kanatlı) kanı ile beslendiği ve muhtemelen bunların birçoğunun kan kaynaklı (blood-borne) patojenleri naklettiği bilinmektedir (Adler, 2009; Adler ve Crosskey, 2011). Günümüzde tanımlanmış yaklaşık 28 omurgalı patojen ve paraziti simuliidlerde dökümante edilmiş (Adler ve McCreadie, 2009) olmakla birlikte moleküler çalışmalar diversitenin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Hellgren vd., 2008). Bunun yanında birçok simuliid türü patojenler açısından yeni yeni incelenmeye başlanmıştır. Bu patojenlerin yol açtığı hastalıklar arasında onchocerciasis ve mansonellosis insanlar için simuliid-borne önemli filarial parazitler hastalıklarındandır. Nehir körlüğü olarak bilinen insan onchocerciasis'i önemli hastalık tablosuna yol açmakta olup dünyada körlüğe yol açan enfeksiyözler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada özellikle Afrika ülkeleri başta olmak üzere yaklaşık 40 milyon insanın enfekte olduğu ve bunlarından yaklaşık çeyrek milyonunun körlükle sonuçlandığı ve hastalığa bağlı kayıpların çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (World Health Organization, 1995; Remme vd., 2006). *Mansonella ozzardi* tarafından oluşturulan mansonellosis insanlarda daha hafif seyirli olup parazitler genellikle vücut boşluklarında ve mezenterde

yerleşim gösterirler. Genellikle klinik tablo hafif olmakla birlikte ateş, eklem ağrıları, bacaklarda soğukluk, akciğer bozuklukları, lymphadenitis, adenopathy ve hepatomegaly gibi semptomlar ortaya çıkabilir (Klion ve Nutman, 1999). Simuliid vektörlerde *O. volvulus* başta olmak üzere *Onchocerca* türlerinin araştırılmasına yönelik çeşitli moleküler çalışmaların (Katholi vd., 1995; Adeleke vd., 2010; Gopal vd., 2012) yapıldığı ve GenBank'ta çeşitli izolatra ait kayıtların girildiği görülmektedir. Türkiye'de onchocerciosis üzerine kayıtlar sınırlıdır (İnci vd., 2013). İnsanlarda *O. volvulus* enfeksiyonuna dair Suudi Arabistan'dan Türkiye'ye gelen bir kişide import vakası rapor edilmiştir (Özkara vd., 2003) bulunmaktadır. Ayrıca canine onchocerciasis etkeni *O. lupi*'nin yol açtığı insan oküler onchocerciasis olguları da Türkiye'den rapor edilmiştir (Otranto vd., 2011, 2012; İlhan vd., 2013). Öte yandan Türkiye'de hayvanlarda (sığır) *O. armillata*'nın yol açtığı onchocerciasis olguları da bildirilmiştir (Alibaşoğlu vd., 1969; Beytut vd., 2005; Özyıldız vd., 2013). Mevcut çalışmamızda potansiyel vektör simuliid türlerinde *Onchocerca* türlerinin araştırılmasında nükleer ribozomal ITS-2 gen bölgesinden dizayn ettiğimiz orijinal primerlerle kantitasyona olanak sağlayan sybergreen tabanlı Real Time PCR tekniği Dünya'da ilk kez kullanılmış olup dizayn edilen primerlerin GenBank blast analizleri ve referans izolatlarla yapılan incelemelerinde spesifik olduğu saptanmıştır. Real time PCR analizlerinde bireysel örneklenen simuliidlerde pozitiflik saptanmazken genomik DNA havuzlarının 4'ünde *Onchocerca* sp. pozitifliği tespit edilmiş ve gözlenen minimum enfeksiyon oranı (MIRs) 0,87, beklenen enfeksiyon oranı (*P*) ise 0,9 olarak belirlenmiştir. Beklenen enfeksiyon oranının minimum enfeksiyon oranı ile uyum göstermesi saptanan prevalans oranını doğrulamıştır. Araştırmamızda *Onchocerca* sp. pozitif belirlenen izolatlardan biri (TrOnchSim1, GenBank aksesyon: KF999650) filogenetik analizler için mt-COX1 gen bölgesi yönünden sekans analizine tabii tutulmuştur. GenBank nükleotid veri tabanında kayıtlı *Onchocerca* tür ve izolatlarıyla yapılan multible alignment sonuçlarına göre TrOnchSim1 izolatu en yüksek identikliği %99,5 ile Kamerun'da *S. damnosum*'dan izole edilmiş *Onchocerca* sp. "Eisenbarth Sii1" izolatu (GenBank: KC167352) ile göstermiştir. Ayrıca TrOnchSim1 izolatının aynı ülke ve aynı *Simulium* türünden (*S. damnosum*) izole edilmiş *Onchocerca* sp. "Eisenbarth Sii2" (GenBank: KC167353) ve *Onchocerca* sp. "Eisenbarth Sii3" (GenBank: KC167354) izolatları ile de yüksek identiklik (%99,4) gösterdiği belirlenmiştir. İlgili gen bölgesine göre TrOnchSim1 izolatu, GenBank'ta kayıtlı bazı *O. volvulus* ve ruminant *Onchocerca* türlerine ait izolatlardan ise genetik olarak daha uzak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, *Onchocerca* türleri arasında genetik diversitenin yüksek olduğunu işaret etmektedir. Bu sonuca göre araştırma yöresinde onchocerciasis'in moleküler epidemiyolojisi üzerine çalışmalara ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır. Mevcut çalışmada ergin dişi simuliid sineklerde *Mansonella* türlerinin araştırılmasında major sperm protein (MSP) bölgesinden dizayn ettiğimiz orijinal primerlerle

kantitasyona olanak sağlayan sybergreen tabanlı Real Time PCR tekniği de Dünya'da ilk kez kullanılmış olup dizayn edilen primerlerin GenBank blast analizleri ve referans izolatlarla yapılan incelemelerinde spesifik olduğu saptanmıştır. Real time PCR analizlerinde bireysel örneklenen simuliidlerde ve genomik DNA havuzlarında pozitiflik saptanmamıştır. Nitekim Türkiye'de günümüze kadar mansonellosis insan veya hayvanlardan rapor edilmemiştir.

Leucocytozoonosis, hem temporal hem de tropik bölgelerde evcil ve vahşi kanatlıların yaygın simuliid-borne kan hastalıklarından birisidir (Beadell vd., 2004; Valkiūnas, 2005; Ishtiaq vd., 2006; Hellgren vd., 2007). *Leucocytozoon* soyundaki parazit nesillerinde (lineage) polimorfizm yüksek oranda görülmekte olup bu nesillerin konak özgüllüğü yönündeki tartışmalar öteden beri süregelmektedir. Parazitin hayat siklusunu tamamlayabilmesi için hem omurgalı son konağa hem de omurgasız ara konağa (vektör) ihtiyaç vardır. Parazit nesillerinin coğrafik dağılımı, konak, vektör gibi biotik, iklim ve su rejimi gibi abiotik değişkenlere bağlı olarak şekillenir (Hellgren, 2005). Konak spesifitesi derecesinin, tek bir kuş türünde görülen bir nesilden, taksonomik olarak farklı kuş türlerinde biyolojik döngüsünü tamamlayabilen nesillere kadar değişkenlik gösterebildiği kaydedilmiştir (Waldenström vd., 2002; Ricklefs vd. 2004; Hellgren, 2005; Valkiūnas, 2005; Križanauskiene vd., 2006; Hellgren vd., 2007). Hastalıktan sorumlu vektör simuliid türünün kan ile beslenmesinde konak türü için bir tercihi bulunmadığı durumda parazitler, farklı konak türleri arasında transmisyonu fırsat bulurlar. Dolayısıyla konak türlerinde *Leucocytozoon* nesillerinin dağılımını, bir parazit neslinin yalnızca tek bir konak türünü enfekte etme yeteneğinde olması veya farklı konak gruplarını enfekte edebilmesi belirler (Hellgren ve ark, 2008). *Leucocytozoon* soyundaki parazitler dünya çapında yaygın olup, en az morfolojik olarak identifiye edilmiş 35 türü bulunmaktadır (Valkiūnas, 2005). Moleküler identifikasyonla gözlenen diversite, tür sayısının çok daha yüksek olduğunu işaret etmektedir. Moleküler olarak belirlenmiş birçok *Leucocytozoon* neslinin gelişimlerini farklı ailelere bağlı konak türlerinde tamamlayabildiğini göstermektedir (Hellgren, 2005; Hellgren vd., 2007). Ayrıca *Leucocytozoon* türlerinin birçok simuliid vektör türünde başarılı bir şekilde gelişebildikleri de ortaya konmuştur (Valkiūnas, 2005). *Leucocytozoon* nesillerinin kanatlı konak ve vektör simuliid popülasyonlarında moleküler olarak araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Bensch vd., 2000; Ricklefs ve Fallon, 2002; Valkiūnas ve Ashford 2002; Waldenström vd., 2002; Ricklefs vd., 2004; Hellgren, 2005; Valkiūnas, 2005; Križanauskiene vd., 2006; Hellgren vd., 2007; Hellgren vd., 2008). Türkiye'de ise leucocytozoonosis üzerine moleküler çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Araştırma ekibimiz tarafından yürütülen çalışmalarda (Yildirim vd., 2013a; Yıldirim vd., 2013b), Kayseri yöresinde iki şahin türü (*Buteo rufinus*, *Buteo buteo*) ve bir alaca baykuşta (*Strix aluco*) mt-cytb gen bölgesi PCR ve sekans analizleriyle üç *Leucocytozoon* nesli (eruvetpar, KC876042, *Strix aluco*; eruvetpar1, KC962151, *Buteo rufinus*; eruvetpar2,

KC962152, *Buteo buteo*) identifiye edilmiş ve *Buteo buteo* ve *Strix aluco* için Türkiye’den; *Buteo rufinus* için de dünyadan ilk kayıtlar olarak GenBank aksesyonları sağlanmıştır. Mevcut çalışma, Türkiye’de vektörlük potansiyelleri açısından simuliid türlerinde *Leucocytozoon* tür ve nesillerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca mevcut çalışmada mt-cytb gen bölgesinden dizayn edilen spesifik primerlerle sybergreen tabanlı Real Time PCR tekniği de Dünya’da ilk kez kullanılmış olup dizayn edilen primerlerin GenBank blast analizleri ve referans izolatlarla yapılan karşılaştırmalarda spesifik olduğu saptanmıştır. Araştırmamızda moleküler incelemesi yapılan 150 adet bireysel örneğin birinde, 46 genomik DNA havuzunun ise üçünde *Leucocytozoon* sp. pozitifliği tespit edilmiştir. Ergin dişi simuliidlerde *Leucocytozoon* sp. için belirlenen MIRs 0,65, *P* ise 0,67 olarak saptanmış olup beklenen enfeksiyon oranının minimum enfeksiyon oranı ile uyum göstermesi, saptanan prevalans oranını doğrulamıştır. Çalışmamızda bireysel simuliid örneklerinden *Leucocytozoon* sp. pozitif bulunan ve moleküler karakterizasyonu yapılan *S. lineatum*’a ait örneğin aynı zamanda kanatlı kanı yönünden de pozitif olduğu dikkati çekmiştir. Söz konusu kanatlı türü mt-cytb gen sekans analizleri sonuçlarına göre bayağı şahin (*Buteo buteo*) olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, kanatlı kanının bir *Leucocytozoon* nesli ile enfekte olma durumunu ve/veya söz konusu simulid türünün potansiyel bir vektör olabileceğini de işaret edebilir. Sekans ve filogenetik analiz sonuçlarına göre TrNSL1 ve TrNSL2 izolatlarının yüksek oranda identik olduğu (%99,8), aynı zamanda her iki izolatın GenBank kayıtlarında yapılan alignmentlar sonucu araştırma ekibimiz tarafından (Yıldırım vd., 2013b) Nevşehir yöresindeki bir baykuştan (*Strix aluco*) izole edilen “eruvetpar” izolatı (GenBank: KC876042) ile en yüksek identikliği (%99,8 ve %99,6) gösterdiği belirlenmiştir. TrNSL1 ve TrNSL2 izolatlarının aynı zamanda Amerika Birleşik Devletleri’nde diğer bir baykuş türünden (*Strix occidentalis occidentalis*) izole edilmiş “SPOW30” izolatı (GenBank: EU627806) ile de yüksek oranda (%99,2 ve %99,4) benzer olduğu dikkati çekmiştir. TrNSL1 *Leucocytozoon* sp. izolatının saptandığı *S. lineatum* örneğinde bayağı şahin (*Buteo buteo*) kanı pozitifliğinin de belirlenmiş olması, söz konusu kanatlı türünün belirlenen *Leucocytozoon* nesli (lineage) ile enfekte olabileceğini göstermiştir. Bu öngörü göz önüne alındığında, karakterize edilen *Leucocytozoon* sp. TrNSL1 izolatıyla yüksek identiklik gösteren diğer bazı nesillerin çeşitli baykuş türlerinden rapor edilmesi, çalışmamızda belirlenen *Leucocytozoon* nesillerinde konak özgüllüğünün bulunmadığı (host generalist) hipotez edilebilir. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda (Hellgren, 2005; Valkiūnas, 2005; Križanauskiene vd., 2006; Hellgren vd., 2007) çeşitli *Leucocytozoon* nesillerinin farklı konaklarda bulunduğu bildirilmiş olması, bu hipotezi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye’ de ilk kez *Simulium* türleri üzerine morfolojik, kromozomal ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon ve filogeni

çalışması yapılmıştır. Bu sonuçlarla Orta Kızılırmak Havzası'nda *S. (Wilhelmia) lineatum* ve *S. (Wilhelmia) balcanicum* türlerinin varlığı ve yaygınlıkları ortaya konmuş, primer yaygın tür *S. (Wilhelmia) lineatum* olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmayla Dünyada ilk kez *Wilhelmia* alt soyundaki *S. lineatum*, *S. balcanicum* ve *S. equinum* izolatlarının mitokondriyal ve ribozomal gen bölgelerine göre karakterizasyonları yapılarak filogenileri ortaya konmuş ve GenBank kayıtları gerçekleştirilerek moleküler taksonomiye yerleşimleri sağlanmıştır. İlâveten bu araştırmayla Dünyada ilk kez *S. lineatum*, *S. balcanicum* ve *S. equinum* türleri için özellikle pest kontrolü amacıyla moleküler markerlar ortaya konmuştur. Mevcut çalışma, Türkiye'de *Simulium* türlerinin epidemiyolojisi ile yaygın tür ve/veya alttürlerin sitogenetiği ve genotiplerinin ortaya konması açısından model olma niteliğindedir. Çalışma ile ayrıca söz konusu türlerin kan beslenmesinde konak eğilimleri ve konak türleri moleküler olarak saptanmış, her iki türün de kanatlı ve memeli türlerinden beslenebilmesinin yanında memeli tercihinin daha önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar da araştırma bölgesinde patojenlerin nakli açısından söz konusu iki türün risk potansiyelleri taşıdığını ortaya çıkarmıştır. Nitekim çalışmada incelenen ergin dişi simuliid örneklerinde kanatlı ve memeliler için risk oluşturan *Leucocytozoon* ve *Onchocerca* pozitifliklerinin belirlenmesi, bu iki simuliid türünün potansiyel vektör olmaları ve risk oluşturmaları açısından önem arz etmektedir. Çalışma ile ayrıca Dünya'da ilk kez *Leucocytozoon*, *Onchocerca* ve *Mansonella* türleri kantitasyona olanak sağlayan Real Time PCR yöntemiyle araştırılmış, spesifik primer dizaynları yapılmış ve yöntemler standardize edilmiş olup elde edilen bu sonuçlar dünya literatürüne kazandırılacaktır. Çalışmada ayrıca *Leucocytozoon* sp. ve *Onchocerca* sp. pozitif belirlenen örneklerle ait izolatların Türkiye'de bir ilk olarak moleküler karakterizasyonları yapılmış, GenBank kayıtları gerçekleştirilmiş ve Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak tescilleri sağlanmıştır. Bu sonuçlar, Türkiye'de simuliidlerin vektörlüğünü yaptığı leucocytozoonosis ve onchocerciasis üzerine kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç olduğunu da ortaya çıkarmıştır.

Proje süresince elde edilen bilimsel çıktılar; uluslararası alanda "Molecular characterization of blackflies (Diptera: Simuliidae) collected from Kızılırmak River in Nevşehir province of Turkey" başlığı ile 5th *International Simuliid Symposium*, 2012, Bratislava, Slovakya'da ve "Bloodmeal Identification and Detection of a *Leucocytozoon* lineage from blackflies (Diptera: Simuliidae) collected from Kızılırmak River in Nevşehir province of Turkey" başlığı ile *International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife*, 2013 Vilnius, Litvanya'da; ulusal alanda ise "Orta Kızılırmak Havzasında Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu" ve "Orta Kızılırmak Havzası'nda *Simulium* Türlerinin (Diptera: Simuliidae) Kan Emme Eğilimlerinin Moleküler

Olarak Belirlenmesi ve Patojenlerin Real Time PCR ile Araştırılması” başlıkları ile 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 2013 Denizli’de sunulmuşlar ve tartışılmışlardır.

KAYNAKLAR

1. Adeleke, M.A., Mafiana, C.F., Sam-Wobo, S.O., Olatunde, G.O., Ekpo, U.F., Akinwale, O.P., Toe, L. 2010. "Biting behaviour of *Simulium damnosum* complex and *Onchocerca volvulus* infection along the Osun River, Southwest Nigeria", *Parasit Vectors*, 7, 3, 93.
2. Adler, P.H., Cheke, R.A., Post, R.J. 2010. "Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae)", *Infect Genet Evol*, 10, 846-65.
3. Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M. 2004. Sayfa 941. "The Black Flies (Simuliidae) of North America", Cornell University Press in Association with the Royal Ontario Museum, USA.
4. Adler, P.H., Crosskey, R.W. 2011. "World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory". <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf> Son Erişim Tarihi: 30 Aralık 2013.
5. Adler, P.H. 2009. "Biodiversity of biting flies: implications for humanity". In: *Insect Biodiversity: Science and Society*, Footitt, R.G., Adler, P.H. (Eds.), Wiley–Blackwell Publ., Chichester, 523-545.
6. Adler, P.H., McCreadie, J.W. 2009. "Black flies (Simuliidae)". In: *Medical and Veterinary Entomology*, Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), 2nd ed. Elsevier, San Diego, CA, 189-206.
7. Akarsu, G.A., Güngör, Ç., Yergök, H.İ.Ç., Şimşek, İ. 2003. Bir idrar örneğinde *Simulium* larvası. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 56, 131-4.
8. Alibaşoğlu, M., Gölesuk, K., Erturk, E., Güler, S. 1969. "Türkiyede sığırlarda görülen onchocerciasis olayları (*Onchocerca armillata* Raillet ve Henry 1909)", *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 16, 50-60.
9. Balık, S., Ustaoglu, M.R., Özbek, M., Taşdemir, A., Topkara, E.T. 2002. "Yelköprü Mağarası (Dikili, İzmir) ve yakın çevresinin sucul faunası hakkında bir ön araştırma", *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, 19, 221-5.
10. Beadell, J.S., Gering, E., Austin, J., Dumbacher, J.P., Peirce, M.A., Pratt, T.K., Atkinson, C.T., Fleischer, R.C. 2004. "Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo- Papuan region", *Molecular Ecology*, 13, 3829-44.
11. Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R.T. 2000. "Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 1583-9.

12. Beytut, E., Akca, A., Bain, O. 2005. "Teat onchocercosis in cows with reference to prevalence, species involved and pathology", *Res Vet Sci*, 78, 45-51.
13. Brockhouse, C.L., Vajime, C.G., Marin, R., Tanguay, R. 1993. "Molecular identification of onchocerciasis vector sibling species in blackflies (Diptera: Simuliidae)", *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 628-634.
14. Chubareva, L.A., Petrova, N.A., 2008. *Tsitologicheskie Karty Politennykh Khromosomi Nekotorye Morfologicheskie Osobennosti Krovososushchikh Moshek Rossii i Sopredel'nykh Stran (Diptera: Simuliidae): Atlas [Cytological Maps of Polytene Chromosomes and Some Morphological Features of Bloodsucking Black Flies of Russia and Adjacent Countries (Diptera: Simuliidae): Atlas]*. Tovarishestvo Nauchnykh Izdaniy KMK, St. Petersburg. 134 pp. + 218 plates (in Russian).
15. Chubareva, L.A., Petrova, N.A. 2006. "B chromosome polymorphism of blackflies (Diptera, Simuliidae) from the north-western region of Russia", *Tsitologiya*, 48, 3, 253-63.
16. Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Frusteri, L., Maroli, M., Van De Pol, I., Verbeek-De Kruif, N., Rijpkema, S., Taggi, F. 1998. "Prevalence of *Borellia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* in Central Italy", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17, 134-5.
17. Clergue-Gazeau, M., Kazancı, N. 1992. "Türkiye Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası II: Çeşitli akarsu sistemlerinden toplanmış türlere ekolojik bir yaklaşım", *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 13, 17-32.
18. Conflitti, I.M., Kratochvil, M.J., Spironello, M., Shields, G.F., Currie, D.C. 2010. "Good species behaving badly: Non-monophyly of black fly sibling species in the *Simulium arcticum* complex (Diptera: Simuliidae)", *Mol Phylogenet Evol.*, 57, 245-57.
19. Crosskey, R.W., Zwick, H. 2007. "New faunal records with taxonomic annotations for the Blackflies of Turkey (Diptera: Simuliidae)", *Aqutaic Insects.*, 29, 21-48.
20. Crosskey, R.W. 1981. "Simuliid taxonomy". In: *Black flies: the future for biological methods in integrated control*, Laird. M., (ed). Academic Press, London, 3-18.
21. Crosskey, R.W. 1990. Sayfa 711. "The Natural History of Blackflies". John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England.
22. Cummins, K.W. 1987. "The functional role of black flies in stream ecosystems". In: *Black Flies: Ecology, population management and annotated world list*, Kim KC, Merritt RW (eds.), The Pennsylvania State University, University Park, 1-10.
23. Currie, D.C. 1988. "Phylogeny of Primitive Simuliidae (Insecta: Diptera: Culicimorpha)", Ph.D. dissertation, University of Alberta, Edmonton, Canada.

24. Currie, D.C., Adler, P.H. 2008. "Global diversity of black flies (Diptera: Simuliidae) in freshwater". In: Freshwater Animal Diversity Assessment, Balian, E.V., Leveque, C., Segers, H., Martens, K. (Eds.), Hydrobiologia, 595, 469-75.
25. Das, S.C., Nath, D.R., Bhuyan, M., Hazarika, S. 1990. "Field trial of abate and Teknar for Simulium (Diptera: Simuliidae) control in India", J Am Mosq Control Assoc, 6, 135-7.
26. De Moor, F.C. 1982. "Determination of the number of instars and size variation in the larvae and pupae of *Simulium chatteri* Lewis 1965 (Diptera: Simuliidae) and some possible bionomical implications", Can J Zool, 60, 1373-82.
27. Depaquit, J., Ferte, H., Le'ger, N., Rioux, J.A., Killick-Kendrick, M., Hanafi, H.A., Gobert, S. 2000. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus Paraphlebotomus (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) based on ITS2 rDNA sequences, Hypotheses of dispersion and speciation", Insect Mol Biol, 9, 293-300.
28. Dobigny, G., Ducroz, J., Robinson, T.J., Volobouev, V. 2004. "Cytogenetics and cladistics", Syst Biol, 53, 470-84.
29. Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S. 2011. "Geneious" v5.5, <http://www.geneious.com> Son Erişim Tarihi: 30 Aralık 2013.
30. Dye, C., Hasibeder, G. 1986. "Population dynamics of mosquito-borne disease: effects of flies which bite some people more frequently than others", Trans R Soc Trop Med Hyg, 80, 69-77.
31. Eisenbarth, A., Ekale, D., Hildebrandt, J., Achukwi, M.D., Streit, A., Renz, A. 2013. "Molecular evidence of 'Siisa form', a new genotype related to *Onchocerca ochengi* in cattle from North Cameroon", Acta Trop, 127, 3, 261-5.
32. Ertunç, Ö., Türkmen, G., Kazancı, N. 2008. "Research on Simuliidae (Insecta: Diptera) fauna of Yedigöller National Park (Bolu, Turkey)", Review of Hydrobiology, 2, 81-92.
33. Ertunç, Ö. 2009. Sayfa 104. "Türkiye'nin Batısındaki Bazı Akarsuların Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası Üzerine Bir Araştırma", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
34. Fritz, G.N., Conn, J., Cockburn, A., Seawright, J. 1994. "Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae)", Mol Biol Evol, 11, 406-16.
35. Gazyağcı, A.N. 2011. Sayfa 163. "Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde Simuliidae Türlerinin Yayılışı", 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül, KARS.
36. Gopal, H., Hassan, H.K., Rodríguez-Pérez, M.A., Toé, L.D, Lustigman, S., Unnasch, T.R. 2012. "Oligonucleotide based magnetic bead capture of *Onchocerca volvulus* DNA for PCR pool screening of vector black flies", PLoS Negl Trop Dis, 6, 6, 1712.

37. Gray, E.W., Adler, P.H., Coscaron-Arias, C., Coscarón, S., Noblet, R. 1999. "Development of the first blackfly (Diptera: Simuliidae) Management program in Argentina and comparison with other programs", J Am Mosq Control Assoc, 15, 400-6.
38. Grenier, P., Rageau, J. 1960. "Remarque's sur la classification des Simuliidae", Bull Soc Pathol Exot, 53, 727-42.
39. Grinchuk, T.M., Chubareva, L.A. 1974. "On the Intergroup Karyotypic Difference in Several Representatives of the Genus *Wilhelmia*", Tsitologiya, 16, 1432-5.
40. Gryaznov, A.I. 1984. "Morphological adaptations of bloodsucking blackflies to their hosts". In: Diptera (Insecta) of the Fauna of the USSR and Their Significance in Ecosystems [Dvukrylye Fauny SSSR i Ikh Rol' v Ekosistemakh], Narchuk EP, Zlobin VV. (Eds.), Akademiya Nauk SSSR, Leningrad [=St. Petersburg], Russia, pp. 31-34 (in Russian; English translation: 1992), Entomol Rev, 71, 143-5.
41. Hackett, B.J., Gimnig, J., Guelbeogo, W., Costantini, C., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Collins, F.H., Besansky, N.J. 2000. "Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon", Insect Mol Biol, 9, 369-74.
42. Hall, T.A. 1999. "Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series", 41, 95-8.
43. Hamada, N., Grillet, M.E. 2001. "Black flies (Diptera: Simuliidae) of the Gran Sabana (Venezuela) and Pacaraima Region (Brazil): Distributional data and identification keys for larvae and pupae", Entomotropica, 16, 1, 29-49.
44. Hamada, N., Adler, P.H. 1998. "A New Species of *Simulium* (Diptera: Simuliidae) from Open Areas in Central Amazonia, Brazil", Mem Inst Oswaldo Cruz, 93, 317-25.
45. Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. 2003a. "Biological identifications through DNA barcodes", Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270, 313-21.
46. Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. 2003b. "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species", Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270, 96-9.
47. Hellgren, O. 2005. "The occurrence of haemosporidian parasites in the Fennoscandian bluethroat (*Luscinia svecica*) population", Journal of Ornithology, 146, 55-60.
48. Hellgren, O., Bensch, S., Malmqvist, B. 2008. "Bird hosts, blood parasites and their vectors--associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals", Mol Ecol, 17, 1605-13.
49. Hellgren, O., Peréz-Tris, J., Waldenström, J., Szöll, E., Si, O., Hasselquist, D., Krizanauskiene, A., Ottosson, U., Bensch, S. 2007. "Detecting shifts of transmission

- areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach", *Molecular Ecology*, 16, 1281-91.
50. Higazi, T.B., Boakye, D.A., Wilson, M.D., Mahmoud, B.M., Baraka, O.Z., Mukhtar, M.M., Unnasch, T.R. 2001. "Cyto taxonomic and molecular analysis of *Simulium* (Edwardsellum) *damnosum* sensulato (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan", *J Med Entomol*, 37, 547-53.
 51. Hillis, D.M., Dixon, M.T. 1991. "Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference", *Q Rev Biol*, 66, 411-53.
 52. İlhan, H.D., Yaman, A., Morishima, Y., Sugiyama, H., Muto, M., Yamasaki, H., Hasegawa, H., Lebe, B., Bajin, M.S. 2013. "*Onchocerca lupi* infection in Turkey: a unique case of a rare human parasite", *Acta Parasitol*, 58, 384-388.
 53. Imura, T., Sato, Y., Ejiri, H., Tamada, A., Isawa, H., Sawabe, K., Omori, S., Murata, K., Yukawa, M. 2010. "Molecular identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan", *Parasitol Res*, 106, 543-7.
 54. Ishtiaq, F., Beadell, J.S., Baker, A.J., Rahmani, A.R., Jhala, Y.V., Fleischer, R.C. 2006. "Prevalence and evolutionary relationships of haematozoan parasites in native versus introduced populations of common myna *Acridotheres tristis*", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 587-94.
 55. İnci, A., Yazar, S., Tunçbilek, A., Canhilal, R., Doğanay, M., Aydın, L., Aktaş, M., Vatansever, Z., Özdarendeli, A., Özbel, Y., Yildirim, A., DüzlÜ, Ö. 2013. "Vectors And Vector-Borne Diseases in Turkey", *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 281-296.
 56. Jitklang, S., Kuvangkadilok, C., Baimai, V. 2008. "Cytogenetics and morpho taxonomy of the *Simulium* (Gomphostilbia) *ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand", *Zoo taxa*, 1917, 1-28.
 57. Katholi, C.R., Toe, L., Merriweather, A., Unnasch, T.R. 1995. "Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by Polymerase Chain Reaction screening of pools of black flies", *J Inf Dis*, 172, 1414-7.
 58. Kazancı, N., Clergue-Gazeau, M., 1990. "Simuliidae de Turquie. I: Premieresdonneesfaunistiques et biogeographiques (Diptera, Simuliidae)", *Annales de Limnologie*, 26, 45-50.
 59. Kazancı, N., Ertunç, Ö. 2008a. "Bazı Simuliidae (Insecta: Diptera) türlerinin habitat özellikleri", *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, 25, 319-23.
 60. Kazancı, N., Ertunç, Ö. 2008b. "On the Simuliidae (Insecta, Diptera) fauna of Turkey", *Review of Hydrobiology*, 1, 27-36.

61. Kazancı, N., Ertunç, Ö. 2010. "Simuliidae (Insecta, Diptera) türlerinin Yeşilırmak Nehri Havzası (Türkiye)'nin sucul habitat kalitesini belirlemede indicator olarak kullanılmaları", Review of Hydrobiology, 3, 27-36.
62. Khalimonchuk, O., Rödel, G. 2005. "Biogenesis of cytochrome c oxidase", Mitochondrion, 5, 363-88.
63. Kim, K.S., Tsuda, Y., Yamada, A. 2009. "Blood meal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan", J Med Entomol, 46, 1230-4.
64. Klion, A.D., Nutman, T.B. 1999. "Loiasis and Mansonella infections". In: Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice. Churchill Livingstone, Philadelphia, Guerrant, R.L., Walker, D.H., Weller, P.F. (Eds.), 861-72.
65. Krizanauskiene, A., Hellgren, O., Kosarev, V., Sokolov, L., Bensch, S., Valkiunas, G. 2006. "Variation in host specificity between species of avian haemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences", Journal of Parasitology, 92, 1319-24.
66. Krueger, A., Kalinga, A.K., Kibweja, A.M., Mwaikonyole, A., Maegga, B.T. 2006. "Cytogenetic and PCR-based identification of *S. damnosum* 'Nkusi J' as the anthropophilic blackfly in the Uluguru onchocerciasis focus in Tanzania", Trop Med Int Health, 11, 1066-74.
67. Kruger, A., Hennings, I.C. 2006. "Molecular phylogenetics of black flies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications", Mol Phylogenet Evol, 39, 83-90.
68. Kruger, A., Gelhaus, A., Garms, R. 2000. "Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum* and their relationship with West African species of the complex (Diptera: Simuliidae)", Insect Mol Biol, 9, 101-8.
69. Larue, B., Gaudreau, C., Bagre, H.O., Charpentier, G. 2009. "Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae)", Mol Phylogenet Evol, 53, 749-57.
70. Lechthaler, W., Car, M. 2005. "Simuliidae-Key to larvae and pupae from Central and Western Europe". CD-R Edition, Vienna.
71. Malafronte, R.S., Marrelli, M.T., Marinotti, O. 1999. "Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)", J Med Entomol, 36, 631-4.
72. Marrellin, M.T., Malafronte, R.S., Flores-Mendoza, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Kloetzel, J.K., Marinotti, O. 1999. "Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae)", J Med Entomol, 36, 679-84.

73. Moulton, J.K. 2003. "Can the current molecular Arsenal adequately track rapid divergence events within Simuliidae (Diptera)?", *Mol Phylogenet Evol*, 27, 45-57.
74. Moulton, J.K. 2000. "Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera)", *Syst Entomol*, 25, 95-113.
75. Munoz, A.G., Baxter, S.W., Linares, M., Jiggins, C.D. 2011. "Deep mitochondrial divergence within a *Heliconius* butterfly species is not explained by cryptic speciation or endosymbiotic bacteria", *BMC Evolutionary Biology*, 11, 358.
76. Myburgh, E., Nevill, E.M. 2003. "Review of blackfly (Diptera: Simuliidae) Control in South Africa", *Onderstepoort J Vet Res*, 70, 307-16.
77. Nirmala, X., Hypsa, V., Zurovec, M. 2001. "Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNA in higher dipterans and their use in phylogenetic inference", *Insect Mol Biol*, 10, 475-85.
78. Oliverio, M., Cervelli, M., Mariottini, P. 2002. "ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea)", *Mol Phylogenet Evol*, 25, 63-9.
79. Otranto, D., Torres, F.D., Papadopoulos, E., Petrić, D., Čupina, A.I., Bain, O. 2012. "Tracking the vector of *Onchocerca lupi* in a rural area of Greece", *Emerg Infect Dis*, 18, 1196-20.
80. Otranto, D., Sakru, N., Testini, G., Gürlü, V.P., Yakar, K., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Bain, O. 2011. "Case report: First evidence of human zoonotic infection by *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae)", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84, 55-8.
81. Özbek, H., Hayat, R., Aslan, İ., 1995. "Erzurum'un bazı ilçelerinde simuliid (Diptera, Simuliidae) salgını", *Türk Entomol Derg*, 19, 37-42.
82. Özkara, S., Işıksel, S., Kılıç, G. 2003. "Türkiye'de ender görülen bir filaria enfeksiyonu olgusu: *Onchocerca volvulus* enfeksiyonu", *Turkish Journal of Infection*, 17, 107-9.
83. Özyıldız, Z., Yılmaz, R., Özsoy, S.Y., Özkul, İ.A. 2013. "Parasitic Aortitis due to *Onchocerca armillata* in Slaughtered Cattle in the Southeastern Region of Turkey", *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 589-94.
84. Pasteur, N., Pasteur, G., Binhomme, F. 1988. Sayfa 215. "Practical Isozyme Genetics", Ellis Horwood Ltd, Chichester.
85. Petrova, N.A., Chubareva, L.A., Adler, P.N., Kachvorian, E.A. 2003. "Cytogenetic features of the blood-sucking blackfly *Wilhelmia paraequina* Puri (Diptera: Simuliidae) from Armenia", *Genetika*, 39, 41-50.

86. Phayahasena, S., Colgan, D.J., Kuvangkadilok, C., Pramual, P., Baimai, V. 2010. "Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences", *Genetica*, 138, 633-48.
87. Pramual, P., Kuvangkadilok, C. 2012. "Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium* (Gomphostilbia) *angulistylum* (Diptera: Simuliidae)", *Genome*, 55, 447-58.
88. Pramual, P., Wongpakam, K., Adler, P. 2011. "Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus Gomphostilbia (Diptera: Simuliidae)", *Genome*, 54, 1-9.
89. Pruess, K.P., Zhu, X., Powers, T.O. 1992. "Mitochondrial transfer RNA genes in a blackfly, *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae), indicate long divergence from mosquito (Diptera: Culicidae) and fruitfly (Diptera: Drosophilidae)", *J Med Entomol*, 29, 644-51.
90. Regis, L., da Silva, S.B., Melo-Santos, M.A. 2000. "The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95, 207-10.
91. Remme, J.H.F., Feenstra, P., Lever, P.R., Medici, A.C., Morel, C.M., Noma, M., Ramaiah, K.D., Richards, F., Seketeli, A., Schmunis, G., van Brakel, W.H., Vassall, A. 2006. "Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy". In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2nd edition, Washington (DC): World Bank, Chapter 22.
92. Report of a WHO Expert Committee on Onchocerciasis Control. 1995. WHO Technical Report Series. WHO, Geneva, 852.
93. Ricklefs, R.E., Fallon, S.M. 2002. "Diversification and host switching in avian malaria parasites", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, 885-92.
94. Ricklefs RE., Fallon SM., Bermingham E., 2004. "Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites", *Systematic Biology*, 53, 111-9.
95. Riley, C.M., Fusco, R. 1990. "Field efficacy of Vectobac-12AS and Vectobac-24AS against black fly larvae in new Brunswick streams (Diptera: Simuliidae)", *J Am Mosq Cntrol Assoc*, 6, 43-6.
96. Rivera, J., Currie, D.C. 2009. "Identification of Nearctic blackflies using DNA barcoding (Diptera: Simuliidae)", *Mol Ecol Res*, 9, 224-36.

97. Ross, D.H., Merritt, R.W. 1978. "The larval instar and population dynamics of five species of black flies (Diptera: Simuliidae) and their responses to selected environmental factors", *CanJ Zool*, 56, 1633-42.
98. Rothfels, K.H. 1979. "Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae)", *Ann Rev Entomol*, 24, 507-37.
99. Rothfels, K.H. 1981. "Cytological approaches to the study of black fly systematics and evolution". In: *Application of Genetics and Cytology in Insect Systematics and Evolution*, Forest, Wildlife, and Range Experiment Station, Stock, M.W. (Ed.), University of Idaho, Moscow, 67-83.
100. Rothfels, K.H. 1989. "Speciation in black flies", *Genome*, 32, 500-9.
101. Santa-Ana, M., Khadem, M., Capela, R. 2006. "Natural infection of *Culex theileri* (diptera:culicidae) with *Dirofilaria immitis* (nematoda: filarioidea) on Maderia Island, Portugal", *J Met Entomol*, 43, 104-6.
102. Schlotterer, C., Hauser, M.T., Haeseler, A.V. 1994. "Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*", *Mol Biol Evol*, 11, 513-22.
103. Shi, M., Chen, X.X., Achterberg, C. 2005. "Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rRNA, 28S rDNA D2, 18S rDNA gene sequences and morphological characters", *Mol Phylogenet Evol*, 37, 104-16.
104. Shields, G.F., Procnier, W.S. 1982. "A cytological description of sibling species of *Simulium* (Gnus) *arcticum* (Diptera: Simuliidae)", *Polar Biol*, 1, 181-92.
105. Simmons, K.R., Edman, J.D., Bennett, S.R. 1989. "Collection of blood-engorged black flies (Diptera: Simuliidae) and identification of their source of blood", *J Am Mosq Control Assoc*, 5, 541-6.
106. Stoops, C.A., Adler, P.H. 2006. "Feeding behavior of larval blackflies (Diptera: Simuliidae) with and without exposure to *Bacillus thuringiensis var israelensis*", *J Vector Ecol*, 31, 79-83.
107. Şirin, Ü., Sahin, Y. 2005. "New records of blackflies (Diptera, Simuliidae) for the Turkish fauna", *Zoology in the Middle East*, 36, 99-104.
108. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution", *Mol Biol Evol*, 28: 2731-9.
109. Tang, J., Toè, L., Back, C., Unnasch, T.R. 1996. "Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera:Simuliidae) complex", *Mol Biol Evol*, 13, 244-52.

110. Tang, J., Unnasch, T.R. 1995. "Discriminating PCR artifacts using DHDA (directed heteroduplex analysis)", *BioTechniques*, 19, 902-5.
111. Tang, J.M., Toe, L., Back, C., Unnasch, T.R. 1995. "Mitochondrial alleles of *Simulium damnosum* sensulato infected with *Onchocerca volvulus*", *Int J Parasitol*, 25, 1251-4.
112. Thanwisai, A., Kuvangkadilok, C., Baimai, V. 2006. "Molecular phylogeny of blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA", *Genetica*, 128, 177-204.
113. Toma, T., Miyagi, I., Crabtree, M.B., Miller, B.R. 2002. "Investigation of the *Aedes (Stegomyia) flavopictus* complex (Diptera: Culicidae) in Japan by sequence analysis of the internal transcribed spacers of ribosomal DNA", *J Med Entomol*, 13, 461-8.
114. Valkiunas, G. 2005. "Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia", 1st edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.
115. Valkiunas, G., Ashford R.W. 2002. "Natural host range is not a valid taxonomic character", *Trends in Parasitology*, 18, 528-9.
116. Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., Ottosson, U. 2002. "Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa", *Molecular Ecology*, 11, 1545-54.
117. Walton, C., Handley, M., Kuvangkadilok, C., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V., Butlin, R.K. 1999. "Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction", *Med Vet Entomol*, 13, 24-32.
118. Weber, E.A., Grunewald, J. 1989. "Cytotaxonomic differentiation of *Wilhelmia equina* (Linné, 1747) and *Wilhelmia lineata* (Meigen, 1804)", *Genome*, 32, 589-95.
119. Weekers, P.H.H., De Jonckheere, J.F., Dumont, H.J. 2001. "Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insect: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European zone", *Mol Phylogenet Evol*, 20, 89-99.
120. Yeşilöz, H. 2011. "Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir Bölümünde Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu", Doktora Tezi, ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
121. Yılmaz, A., İnci, A., Tunçbilek, Ş.A., Yeşilöz, H., Koçak, Ö., Şirin, Ü., İça, A., Yildirim, A., Demircioğlu, A., Düzlü, Ö. 2007. "Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (*Simulium (Wilhelmia) lineatum*) (Diptera: Simuliidae) İstilası", *ERÜ Vet Fak Derg*, 4, 91-5.
122. Yildirim, A., Çiloğlu, A., Düzlü, Ö., Önder, Z., İnci, A., Doğan, Z. 2013a. Sayfa 98. "Molecular Detection and Characterization of Two *Leucocytozoon* Lineages from A Long-Legged Buzzard (*Buteo Rufinus*) and a Common Buzzard (*Buteo Buteo*) from Kayseri Province of Turkey", International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife, LITVANYA.

123. Yildirim, A., Çiloğlu, A., Düzlü, Ö., Önder, Z., İnci, A., Doğan, Z. 2013b. Sayfa 148. "Kayseri Yöresindeki Bazı Yırtıcı Kuşlarda Saptanan *Leucocytozoon* Sp. Enfeksiyonları ve İzolatların Moleküler Karakterizasyonu", 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, DENİZLİ.
124. Young, I., Coleman, A.W. 2004. "The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example", Mol Phylogenet Evol, 30, 236-42.
125. Zwick H. 2007. "On a small collection of wild-caught adult black flies (Diptera: Simuliidae) from Turkey", Entomologist's Monthly Magazine, 143, 100.