

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

KAYSERİ YÖRESİNDEN TOPLANMIŞ *CULEX PIPIENS*
(DIPTERA: CULICIDAE) TÜRLERİNİN BESLENME
EĞİLİMLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI

Hazırlayan
Vet. Hek. Seval KORKMAZ

Danışman
Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2014
KAYSERİ

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

KAYSERİ YÖRESİNDEN TOPLANMIŞ *CULEX PIPIENS*
(DIPTERA: CULICIDAE) TÜRLERİNİN BESLENME
EĞİLİMLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI

Hazırlayan
Vet. Hek. Seval KORKMAZ

Danışman
Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-
2013-4296 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Haziran 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Vet. Hek. Seval KORKMAZ

İmza :



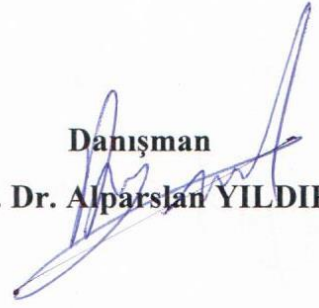
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri Yöresinden Toplanmış *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Türlerinin Beslenme Eğilimlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması” başlıklı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

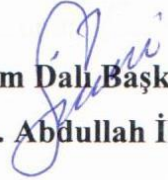
Tezi Hazırlayan
Seval KORKMAZ



Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Seval KORKMAZ** tarafından hazırlanan “**Kayseri Yöresinden Toplanmış *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Türlerinin Beslenme Eğilimlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması**” konulu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

05/06/2014

JÜRİ :

İmza

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

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

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

İmza
İmza
İmza

ONAY

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

13/06/2014

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeme katkıda bulunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ ve Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ile öğretim elemanları Araş. Görv. Arif ÇİLOĞLU ve Öğr. Gör. Dr. Zuhale BİŞKİN'ne ve çalışma süresince malzeme bazında TYL-2013-4296 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

KAYSERİ YÖRESİNDEN TOPLANMIŞ *CULEX PIPPIENS* (DIPTERA: CULICIDAE) TÜRLERİNİN BESLENME EĞİLİMLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2014

Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ÖZET

Bu çalışma, “*Dirofilaria immitis*’in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi” isimli ve 107O533 kodlu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında Kayseri yöresinden toplanmış ve uygun şartlarda muhafaza edilmiş olan sivrisinekler üzerinde yürütülmüş olup çalışmada *Cx. pipiens* tür kompleksinin moleküler karakterizasyonu ve ergin dişilerin kan beslenmesinde konak tercihleri ile konak spekturumlarının ortaya konması amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla toplam 1284 ergin dişi sivrisinek morfolojik olarak incelenmiş ve 376’sı (%28,4) *Cx. pipiens* olarak teşhis edilmiştir. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış ve mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgesi parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Amplifikasyon sonucu uygun bant profilleri gösteren örneklerden seçilen 2 izolat jel pürifiye edildikten sonra moleküler karakterizasyon ve filogenetik analizler amacıyla sekanslanmıştır. Parsiyel mt-COI nükleotid sekansları ortaya konan TrERUCxpip01 (GenBank aksesyon: KJ858517) ve TrERUCxpip02 (GenBank aksesyon: KJ858518) izolatlarının pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları belirlenmiş, Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank’a kayıtlı diğer *Cx. pipiens* izolatlarıyla ise ortalama $0,3 \pm 0,1$ genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinden bireysel olarak elde edilen genomik DNA’lar kanatlı ve memeli mitokondrial cyt b gen bölgesini spesifik olarak amplifiye eden primerler ile PCR analizleri gerçekleştirilmiş ve toplam 376 örneğin 148’i (%39,4) kanatlı ve/veya memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin toplam 43’ü yalnızca memeli, 98’i yalnızca kanatlı, 7’si ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif belirlenmiştir. Beslenme eğilimlerinin istatistiksel analizinde *Cx. pipiens* için kanatlı tercihi önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden kanatlı için 15, memeli için de 15 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 yapılmıştır. Kanatlı konak kanı pozitif 15 izolatın 9’unun Passeriformes takımında, 3’ünün Accipitriformes, 2’sinin Columbiformes ve birinin de Strigiformes takımında yer alan kanatlı

türlerinden kan emdiği belirlenmiştir. Memeli konak kanı pozitif 15 izolattan ise 6'sı insan, 4'ü sığır, 3'ü koyun, 2'si de köpek kanı pozitif saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *Cx. pipiens* tür kompleksi üzerine morfolojik ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon, filogeni ve kan beslenmesinde konak tercihi ve spekturumunun belirlenmesine yönelik bilimsel veriler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Cx. pipiens*, vektör, ekoloji, moleküler teşhis, Kayseri

BLOOD MEAL IDENTIFICATION OF *CX. PIPiens* (DIPTERA: CULICIDAE) COLLECTED FROM KAYSERİ PROVINCE BY MOLECULAR TECHNIQUES

Erciyes University, Graduate School of Health Science

Department of Veterinary Parasitology

Master's Thesis, June 2014

Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

ABSTRACT

This study was conducted on the mosquito specimens which were collected within the scope of the TUBITAK research project titled “Molecular Biological Diagnosis of *Dirofilaria immitis* in Vector Mosquitoes and The Ecology of Vector Mosquitoes in Kayseri Province” with project code 107O533 and preserved suitable conditions. The study was performed to determine the molecular characterization and, blood-meal analyses and host spectrum of the *Cx. pipiens* species complex collected from Kayseri region. For this aim totally 1284 female adult mosquito specimen were morphologically analyzed and 376 (28.4%) were identified as *Cx. pipiens*. Genomic DNAs were extracted from the individual *Cx. pipiens* specimens and mitochondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen regions were partially amplified with the related primers in PCR. After the amplifications 2 isolates with suitable band profiles were gel purified and sequenced in order to molecular characterization and phylogenetic analyses. The isolates TrERUCxpip01 (GenBank accession: KJ858517) and TrERUCxpip02 (GenBank accession: KJ858518) which the nucleotide sequences were determined showed 100.0% identity to each other and 0.3±0.1 genetic difference was found with the other *Cx. pipiens* isolates from several regions in the world available in the GenBank. The genomic DNAs obtained from individual *Cx. pipiens* specimens were also PCR analyzed with the primer pairs that amplified avian and mammalian mitochondrial cyt b gen region. 148 (39.4%) out of 376 specimens were found to be positive for avian and/or mammalian blood-meal. 43, 98 and 7 of the positive specimens were found as only mammalian, only avian and both avian and mammalian blood-meal. The statistical analyses of host tendency in blood-meal revealed that avian preference was more important for the *Cx. pipiens* ($p<0.05$). Each 15 blood-meal positive specimens for avian and mammalian hosts were selected and cloned, and the obtained plasmids were sequenced in order to determine the host species. The mt-cytb sequences obtained from the plasmids were analyzed by blastn in the GenBank and host species were determined. 9, 3, 2 and 1 out of the 15 avian blood-meal positive isolates were found to blood feed from the avian species in the Passeriformes, Accipitriformes, Columbiformes and Strigiformes orders, respectively. 6, 4, 3 and 2 out of mammalian blood-meal positive isolates were determined to blood feed from humans, cattle, sheep and dogs, respectively.

In conclusion, scientific data about the characterization, phylogeny, host preference and spectrum in blood-meal of the *Cx. pipiens* species complex were revealed for the first time in Turkey with this study.

Key words: *Cx. pipiens*, vector, ecology, molecular diagnosis, Kayseri

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	xii
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. SİVRİSİNEKLERDE (CULICIDAE:DIPTERA) SINIFLANDIRMA, CULEX PIPPIENS Linnaeus, 1758'İN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ VE MORFOLOJİSİ.....	3
2.2. CX. PIPPIENS'İN BİYOLOJİNDE ÖNEMLİ FAKTÖRLER.....	10
2.3. CX. PIPPIENS ERGİNLERİNİN KAN BESLENMESİNDE ÖNEMLİ FAKTÖRLER VE KONAK TERCİHLERİ	13
2.4. CX. PIPPIENS'İN VEKTÖRLÜK ROLLERİ.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ VE ARAŞTIRMA SAHASI	17
3.2. LABARATUVAR ÇALIŞMALARI	18
3.2.1. Sivrisinek Örneklerinde Cx. pipiens İdentifikasyonu	18
3.2.2. Ergin Dişi Cx. pipiens Örneklerinden Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	18
3.2.3. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu.....	20
3.2.4. Ergin Dişi Cx. pipiens Örneklerinin mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	20
3.2.5. Ergin Dişi Cx. pipiens Örneklerinin Kan Beslenmesinde Konak Spektrumunun PCR ile Belirlenmesi	21

3.2.6. Kanatlı ve Memeli Mt-cyb Genlerinin Klonlanması ve Plasmid İzolasyonu	21
3.2.7. Klonlanan Kanatlı ve Memeli Mt-cyb Genlerinin Tür Tayini için Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	25
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25
4. BULGULAR	26
4.1. İdentifiye Edilen Ergin Cx. pipiens Örneklerinin Tür Seviyesinde Ayrım Kriteri Olan Bazı Morfolojik Yapıları ve Dağılımları	26
4.2. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi	30
4.3. Cx. pipiens İzolatlarının Mt-COI Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi.....	33
4.4. Ergin dışı Cx. pipiens Türlerinin Kan Beslenmesinde Konak Spekturumu ve Türleri.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
6. KAYNAKLAR	54
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Tablo 4.1. Araştırmaya dahil edilen <i>Cx. pipiens</i> örneklerinin araştırma sezonu ve örnekleme bölgesine göre dağılımı	29
Tablo 4.2. Kayseri yöresinden toplanmış <i>Cx. pipiens</i> izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları	31
Tablo 4.3. Araştırma yöresinde belirlenen <i>Cx. pipiens</i> izolatları ile Dünyadan mt-COI gen bölgesine göre filogenetik kıyaslaması yapılan diğer <i>Cx. pipiens</i> izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler	34
Tablo 4.4. Mt-COI gen bölgesi yönünden çoklu hizalamaları yapılan <i>Cx. pipiens</i> izolatlarının nükleotid kompozisyonları	35
Tablo 4.5. Kayseri yöresi <i>Cx. pipiens</i> izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı <i>Cx. pipiens</i> izolatların mt-COI gen dizilimlerinin ikili hizalama analizleri sonucu identiklik oranları.....	36
Tablo 4.6. Bireysel olarak incelenen ergin dişi <i>Cx. pipiens</i> örneklerinin memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitiflikleri.....	42
Tablo 4.7. Memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitif belirlenen ve klonlama sonrası sekans ve genetik analizlerle konak türü belirlenen örneklerin konak tür dağılımları.....	44
Şekil 2.1. <i>Cx. pipiens</i> 'in sistematikteki yeri.....	7
Şekil 2.2. Ergin dişi <i>Cx. pipiens</i> kompleks türlerinin morfolojik yapısı.....	8
Şekil 2.3. <i>Cx. pipiens</i> kompleks türlerine ait larvaların morfolojik yapısı.	9
Şekil 2.4. <i>Cx. pipiens</i> 'in hayat siklusu.	10
Şekil 3.1. 2008 sezonunda sivrisinek örnekleme yapılan noktaların.....	17
Şekil 3.2. 2009 sezonunda sivrisinek örnekleme yapılan noktaların.....	18
Şekil 3.3. pJET1.2/blunt CloningVector.....	22
Şekil 4.1. <i>Cx. pipiens</i> (dişi); labiumda belirgin soluk renkli bir halka bulunmamakta.....	27
Şekil 4.2. <i>Cx. pipiens</i> (dişi); pre spiracular ve post spiracular bölgede setae yok, prealar bölgede pul bulunmamakta.....	27
Şekil 4.3. <i>Cx. pipiens</i> (dişi); 1. çift bacaklarda, tibia tamamen koyu renkli pullarla kaplı .	28

Şekil 4.4. *Cx. pipiens* (dişi); 3. çift bacaklarda, tarsomer I'in (b) uzunluğu hemen hemen tibianın (a) uzunluğuna eşit, tibia tamamen koyu renkli pullarla kaplı 28

Sayfa No

Şekil 4.5. *Cx. pipiens* (dişi); subcostal damarın apeksi ile R2-R3 çatal kökü hizalarında, R2-R3 çatal kökü kanat köküne daha yakın 29

Şekil 4.6. *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampikonların jel elektroforezde görünümü. 30

Şekil 4.7. Sekans analizine tabii tutulan *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre jel pürifikasyon sonrası agaroz jel üzerinde görünimleri 31

Şekil 4.8. TrERUCxpip01 izolatının parsiyel mt-COI gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri..... 32

Şekil 4.9. TrERUCxpip02 izolatının parsiyel mt-COI gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri..... 33

Şekil 4.10. Kayseri yöresinde belirlenen *Cx. pipiens* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin hizalamaları..... 40

Şekil 4.11. Kayseri yöresinden izole edilen *Cx. pipiens* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri..... 41

Şekil 4.12. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı ampikonların jel elektroforezde görünümü..... 42

Şekil 4.13. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinde memeli mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucunun jel elektroforezde görünümü..... 43

Şekil 4.14. Kanatlı konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri 45

Şekil 4.15. Memeli konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri 46

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Arthropoda şubesi, Hexapoda üst sınıfı, Insecta sınıfı, Diptera takımı, Nematocera alt takımı ve Culicidae ailesinde yer alan sivrisinekler, medikal açıdan önem arz eden çok sayıda patojeni omurgalı konaklara naklinde vektör görevi üstlenirler. Bu patojen enfeksiyonlar arasında çeşitli virüs, bakteri, protozoon ve nematod türleri tarafından oluşturulan sıtma, dengue ve sarıhumma, çeşitli viral ensefalitler ve filariosis gibi çok sayıda hastalık oldukça önem arz etmektedir. Sivrisineklerin vektörlük rolleri mekanik veya biyolojik olabilmektedir (1).

Diptera takımına bağlı Nematocera alt takımında, Chaoboridae, Dixidae ve Culicidae aileleri bulunmaktadır. Sivrisinekler, bunlardan Culicidae ailesinde yer almakta ve sadece bu ailedeki türler kan emme özelliği göstermektedirler. Bu ailedeki *Culex* soyunda bulunan ve “Kuzey Ev Sineği” olarak adlandırılan *Culex pipiens*, çeşitli coğrafyalarda yaygınlık göstermekte, çeşitli patojenleri naklederek insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedirler (2). Ayrıca bu tür Batı Nil Virüsü Hastalığı’nın en önemli vektörü olarak gösterilmişlerdir (3, 4, 5, 6).

Vektörlerin kan beslenmesinde konak tercihleri viral, bakteriyel ve paraziter birçok vector-borne hastalığın bulaşma dinamikleri açısından kritik öneme sahip olup kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için oldukça önemli bilgiler sağlamaktadır. Bunun yanında

vektörlerin konakçı tercihlerinin saptanması, hastalık etkenlerinin biyolojisi ve ekolojisini çözebilmek ve hastalık yayılışı hakkında yorum yapabilmek için de gereklidir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, moleküler tabanlı bir teknik olup yüksek spesifite ve sensiviteye sahiptir. Hastalık etkeni bulmada son derece hassas olan bu yöntem aynı zamanda ilgili primerler kullanıldığında vektörlerin beslenme eğilimlerini de saptayabilmektedir (7, 8). Söz konusu tekniğin diğer yöntemlere kıyasla daha spesifik sonuç vermesi, ergin dişi *C. pipiens*'lerin olası enfeksiyözleri bulaştırmaları açısından risk potansiyellerini ortaya koymak amacıyla beslenme eğilimlerini saptanması bakımından önem arz etmektedir.

Türkiye'de günümüze kadar sivrisineklerin konakçı tercihleri üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, "*Dirofilaria immitis*'in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi" isimli ve 107O533 kodlu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında sahadan toplanmış ve uygun şartlarda muhafaza edilmiş olan sivrisinek örneklerinde *C. pipiens* türüne ait olanlar identifiye edilmiş, dişi örnekler ayrılmış ve bireysel olarak kan beslenme eğilimleri, hem kanatlı konak spesifik primerler hem de memeli konak spesifik primerler kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile araştırma yöresinde *C. pipiens*'in kanatlı veya memeli konak açısından oluşturdukları risk potansiyeli hakkında veriler elde edilmiştir. Ayrıca konak kanı pozitif örneklerden seçilen bazı izolatlar klonlama ve plasmid pürifikasyonu sonrası sekans analizlerine tabii tutulmuş ve konak türü tayini yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SİVRİSİNEKLERDE (CULICIDAE:DIPTERA) SINIFLANDIRMA, *CULEX PIPIENS* Linnaeus, 1758'İN SINIFLANDIRMADAKİ YERİ VE MORFOLOJİSİ

Diptera takımına bağlı *Nematocera* alt takımında, *Chaoboridae*, *Dixidae* ve *Culicidae* aileleri bulunmaktadır. Sivrisinekler, bunlardan *Culicidae* ailesinde yer almakta ve sadece bu ailedeki türler kan emme özelliği gösterirler (1).

Culicidae erişkinleri, öne doğru yönelmiş uzun bir hortuma sahiptir. Hortum boyu, baş ve gövdenin toplam uzunluğuna eşittir. Kanat damarları üzeri pullarla kaplıdır. Pullar kanat saçağını oluşturur. Subkostal damar dallara ayrılmadan kosta ve radius damarlarına paralel seyreder. *Culicidae* larvaları akuatiktir. Çok az bir kısmı predatör özelliktedir (1).

Knight ve Stone (9) ve Knight (10), *Culicidae* ailesine ait 3000'in üzerinde türün varlığını bildirmişlerdir. Ward (11,12) ve Gaffigan ve Ward (13) bu listeye 203 yeni tür daha eklemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Culicidae* ailesine ait toplam 3268 türün varlığı bildirilmiştir (12).

Culicidae'nin ailesine bağlı *Anophelinae*, *Culicinae* ve *Toxorhynchitinae* alt aileleri tanımlanmıştır (14,15,9). Alt aileler içerisindeki yüksek filogeniyi netleştirmek için tribus (kabile) leri oluşturmak ilk defa Belkin (15) tarafından denenmiştir. Belkin (15), *Anophelinae* alt ailesinin, üst aile köküne daha yakın olduğu düşüncesi üzerinde tartışmış ancak Harbach ve Kitching (16) tarafından yapılan çalışma ile *Anophelinae*'nin taksonomik yerinin alt aile olduğu kesinlik kazanmıştır. Yine bu çalışmanın sonucu

olarak *Anophelinae* ve *Culicinae* geçerli monofiletik alt aileler olarak kabul edilirken, *Toxorhynchitinae*, *Culicinae* alt ailesi altında ayrı bir kabile seviyesine indirilmiştir.

Yapılan güncel değişiklikler sonucunda, *Culicidae* ailesinin alt cins düzeyinde sistematik sıralaması aşağıdaki listede verilmiştir (17).

Aile: Culicidae

1. Alt aile: Anophelinae

1. Cins: *Anopheles*

Alt cinsler: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia*, *Nyssorhynchus*

2. Cins: *Chagasia*

2. Alt aile: Culicinae

1. Tribus: Aedeomyiini

Cins: *Aedomyia*

Alt cinsler: *Aedeomyia*, *Lepiothauma*

2. Tribus: Aedini

1. Cins: *Aedes*

Alt cinsler: *Aedes*, *Aedimorphus*, *Alanstonea*, *Albuginosus*, *Belkinus*, *Bothaella*, *Cancraedes*, *Christophersiomyia*, *Diceromyia*, *Edwardsaedes*, *Fredwardsius*, *Huaedes*, *Indusius*, *Isoaedes*, *Leptosomatomyia*, *Lorrainea*, *Neomelaniconion*, *Paraedes*, *Pseudarmigeres*, *Scutomyia*, *Skusea*, *Stegomyia*

2. Cins: *Armigeres*

Alt cinsler: *Armigeres*, *Leicesteria*

3.Cins: *Ayurakitia*

4.Cins: *Eretmapodites*

5.Cins: *Haemagogus*

Alt cinsler: *Conopostegus*, *Haemagogus* 6.Cins: *Heizmannia*

Alt cinsler: *Heizmannia*, *Mattinglyia*

7.Cins: *Ochlerotatus*

1. Seksiyon Alt Cinsler: *Chaetocruimyia*, *Finlaya*, *Geoskusea*, *Halaedes*, *Kenknightia*, *Levua*, *Macleaya*, *Molpemyia*, *Mucidus*, *Nothoskusea*, *Ochlerotatus*, *Protomacleaya*, *Pseudoskusea*, *Rhinoskusea*, *Rusticoidus*, *Zavortinkius*

2. Seksiyon Alt Cinsler: *Abraedes*, *Aztecaedes*, *Gymnometopa*, *Howardina*, *Kompia*

8.Cins: *Opifex*

9.Cins: *Psorophora*

Alt cinsler: *Grabhamia*, *Janthinosoma*, *Psorophora*

10. Cins: *Udaya*

11. Cins: *Verrallina*

Alt cinsler: *Harbachius*, *Neomacleaya*, *Verrallina*

12.Cins: *Zeugomyia*

3. Tribus: Culicini

1. Cins: *Culex*

Alt cinsler: *Acalleoemyia*, *Acallyntrum*, *Aedinus*, *Afroculex*, *Allimanta*, *Anoediopora*, *Barraudius*, *Belkinomyia*, *Carrollia*, *Culex*, *Culiciomyia*, *Deinocerites*, *Eumelanomyia*, *Kitzmilleria*, *Lasiosiphon*, *Lophoceraomyia*, *Lutzia*, *Maillotia*, *Melanoconion*, *Micraedes*, *Microculex*, *Neoculex*, *Phenacomyia*, *Thaiomyia*, *Tinolestes*

2. Cins: *Galindomyia*

4. Tribus: Culisetini

Cins: *Culiseta*

Alt cinsler: *Allotheobaldia*, *Austrotheobaldia*, *Climacura*, *Culicella*, *Culiseta*, *Neotheobaldia*, *Theomyia*

5. Tribus: Ficalbiini

1. Cins: *Ficalbia*

2. Cins: *Mimomyia*

Alt cinsler: *Etorleptiomyia*, *Ingramia*, *Mimomyia*

6. Tribus: Hodgesiini

Cins: *Hodgesia* 7. Tribus: *Mansoniini*

1. Cins: *Coquillettidia*

Alt cinsler: *Austromansonia*, *Coquillettidia*, *Rhynchotaenia*

2. Cins: *Mansonia*

Alt cinsler: *Mansonia*, *Mansonioides*

8. Tribus: *Orthopodomyiini*

Cins: *Orthopodomyia*

9. Tribus: *Sabethini*

1. Cins: *Isostomyia*

2. Cins: *Johnbelkinia*

3. Cins: *Limatus*

4. Cins: *Malaya*

5. Cins: *Maorigoeldia*

6. Cins: *Onirion*

7. Cins: *Runchomyia*

Alt cinsler: *Ctenogoeldia*, *Runchomyia* 8. Cins: *Sabethes*

Alt cinsler: *Davisomyia*, *Peytonulus*, *Sabethes*, *Sabethinus*, *Sabeihoides*

9. Cins: *Shannoniana*

10. Cins: *Topomyia*

Alt cinsler: *Suaymyia*, *Topomyia*

11. Cins: *Trichoprosopon*

12. Cins: *Tripteroïdes*

Alt cinsler *Polylepidomyia*, *Rachionotomyia*, *Rachisoura*, *Tricholeptomyia*, *Tripteroïdes*

13. Cins: *Wyeomyia*

Alt cinsler: *Antunesmyia*, *Caenomyiella*, *Cruzmyia*, *Decamyia*, *Dendromyia*, *Dodecamyia*, *Exallomyia*, *Menolepis*, *Nunezia*, *Phoriomyia*, *Prosopolepis*, *JVyeomyia*, *Zinzala*

10. Tribus: Uranotaeniini

Cins: *Uranotaenia*

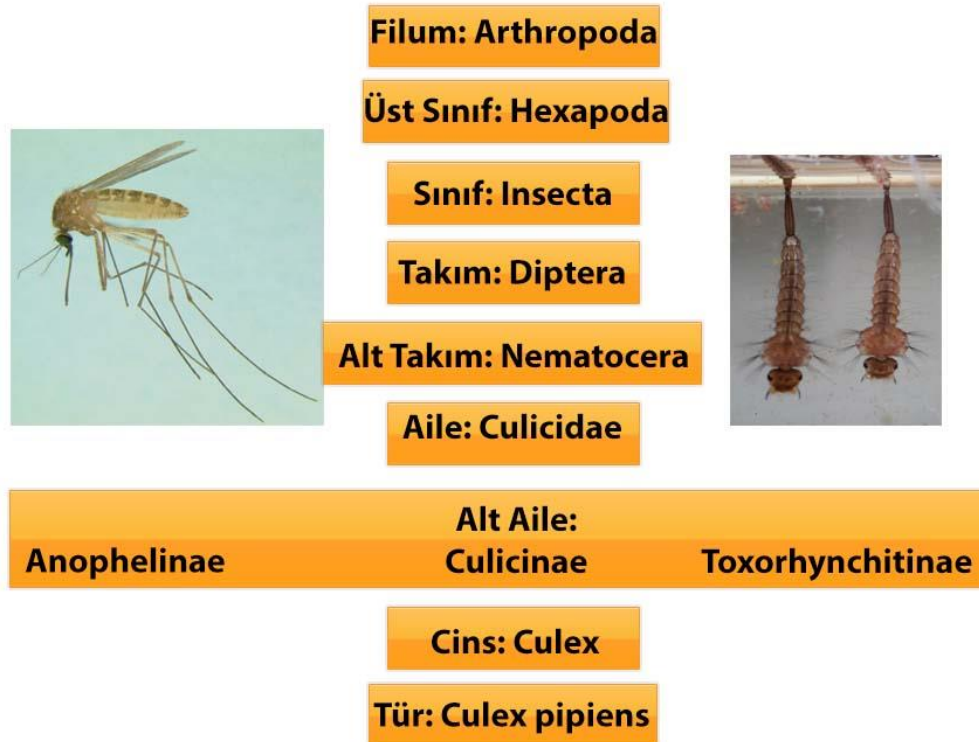
Alt cinsler: *Pseudoficalbia*, *Uranotaenia*

11. Tribus: Toxorhynchitini

Cins: *Toxorhynchites*

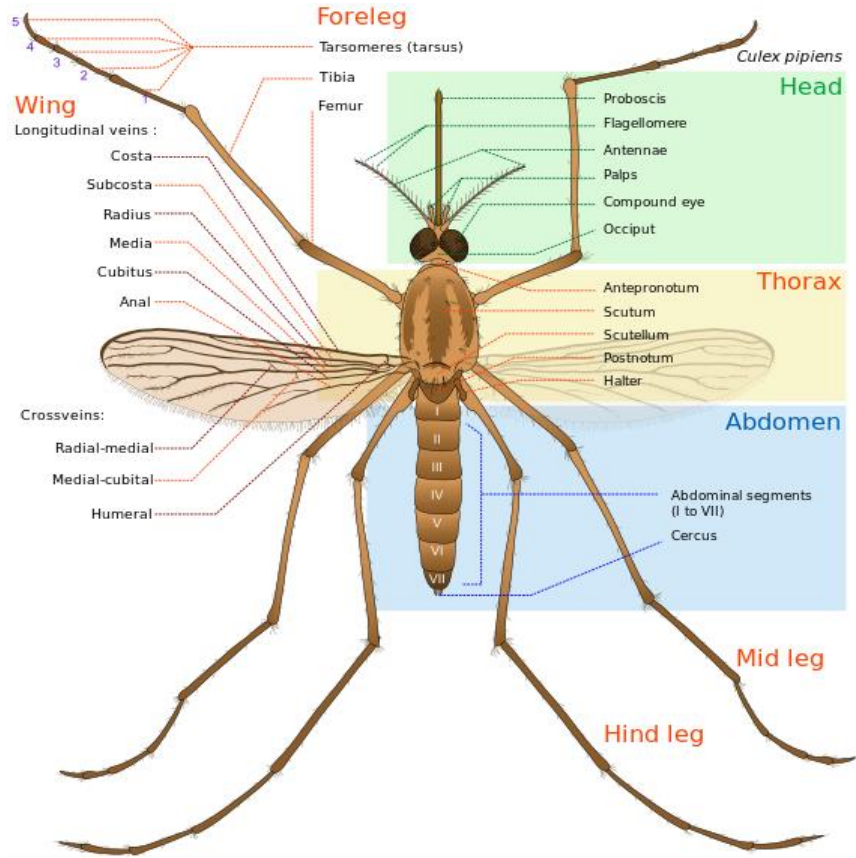
Alt cinsler: *Afrorhynchus*, *Ankylorhynchus*, *Lynchiella*, *Toxorhynchites*

Culex pipiens Linnaeus, 1758 yukarıdaki sınıflandırmada 3. Tribus Culicini'de yer almakta olup Systema Naturae 2000 ve National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veritabanına göre sistematikteki yeri ayrıca aşağıda (Şekil 1) verilmiştir (Zuhal 1).

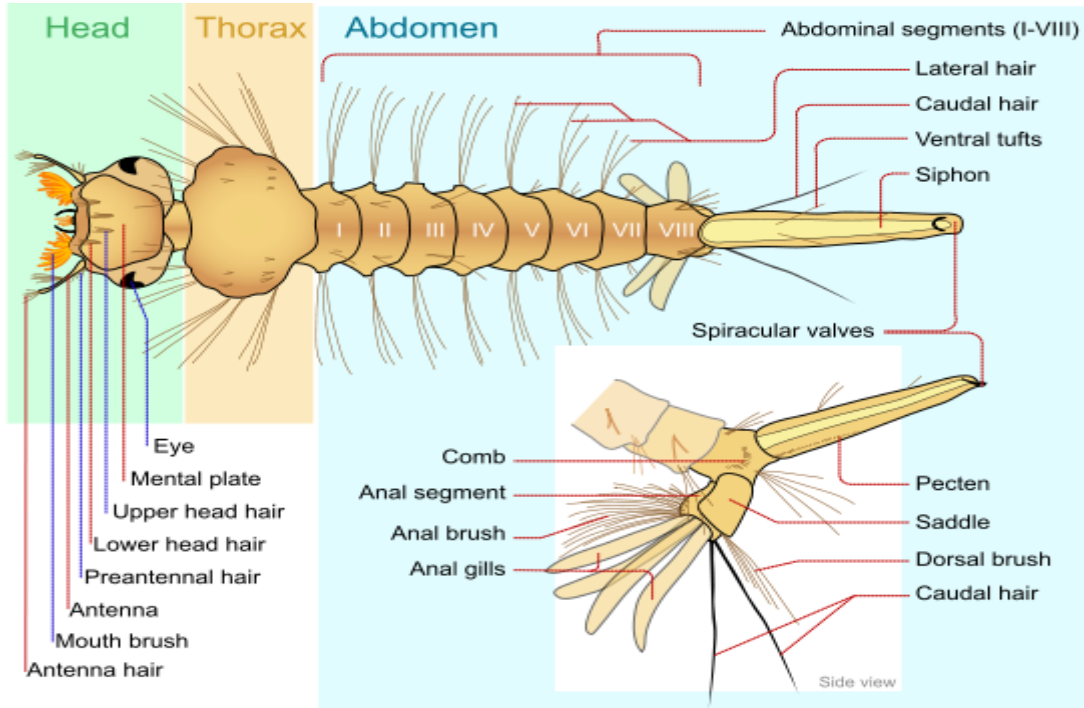


Şekil 2.1. *Cx. pipiens*'in sistematikteki yeri

Medikal ve veteriner önemine karşın *Cx. pipiens*'in taksonomik durumu henüz tam olarak netliğe kavuşmamıştır. Genel olarak *Cx. pipiens* kompleks olarak nitelenen bu türde *Cx. pipiens quinquefasciatus*, *Cx. pipiens pallens*, *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* olmak üzere çeşitli alt türlerin bulunduğu kabul edilmektedir (18, 19). Buna karşın diğer bazı araştırmacılar farklı popülasyonlar üzerine yaptıkları araştırmalarda *Cx. quinquefasciatus*'un alt tür olmayıp farklı bir tür olduğunu öne sürmüşlerdir (20,21,22,23). Morfolojik karakterler diğer fizyolojik ve davranışsın karakterlerle kıyaslandığında taksonomik çalışmalarda daha önemli olduğu belirtilmiştir (19). Morfolojik karakterlerden III–IV. segmentlerin larval abdominal seta 1'i, siphon/saddle indeksi, siphon şekli, seta 1a–S ve 1b–S'in dallanma sayısı, DV/D oranı, R2/R2+3 uzunluk oranı, R2+3'deki bifurkasyon ile subcosta ve costadaki *kesişmenin* *Cx. pipiens* kompleks türlerinin erginlerinin ayrımında önemli olduğu kaydedilmektedir. Ancak mevcut bu kriterler tam olarak bu türlerin ayrımında yeterli olmamaktadır. Erkek genital sisteminin morfolojik ayrımında en önemli kriter olduğu belirtilmektedir (18, 24, 25, 26, 27). *Cx. pipiens* kompleks türlerinin ergin ve larvalarına ait morfolojik özellikler Şekil 2.2-Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Ergin dişi *Cx. pipiens* kompleks türlerinin morfolojik yapısı

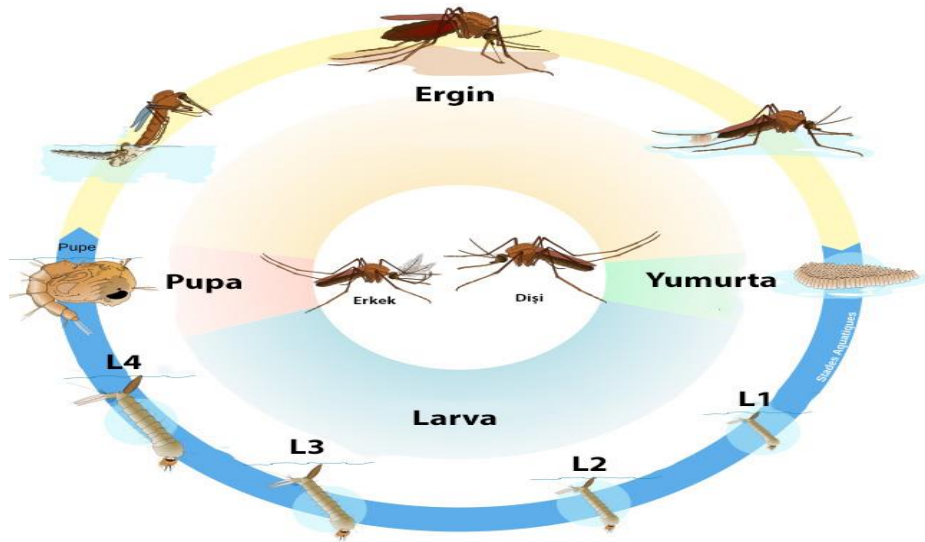


Şekil 2.3. *Cx. pipiens* kompleks türlerine ait larvaların morfolojik yapısı

Lokal popülasyonlarda gözlenen morfolojik ve biyolojik karakterlerdeki varyasyonlar, *Cx. pipiens* kompleks türlerinin taksonomik durumuyla ilgili olarak daha kesin verilerin gerekliliğini ortaya koymuştur (20). Tür kompleksinin taksonomik durumunun kesin olarak ortaya konması farklı popülasyonlarda yapılacak çalışmalardan elde edilecek daha kesin ve bütünlüyci bilgilere ihtiyaç göstermektedir (18). Dünyada *Cx. pipiens* kompleksinin hızlı ve başarılı identifikasyonu oldukça önemlidir. Morfolojik teşhis yöntemlerinin çeşitli zorlukları bulunmakta olup zaman alıcı ve erkeklerle sınırlıdır. Biyokimyasal ve moleküler teknikler 1995 yılında *Cx. pipiens* kompleksinin identifikasyonunda kullanılmaya başlanmıştır. Crabtree ve ark. (28) ITS 2 genini hedef alan standart PCR yöntemlerinin *Cx. pipiens* complex, *Cx. restuans* ve *Cx. salinarius* türlerinin ayırımında kullanışlı olduğunu ancak tür kompleksinin identifikasyonunda yetersiz kaldığını kaydetmişlerdir. Basit sekans tekrarları (SSRs) veya kısa ard arda tekrarlar (STRs) olarak da bilinen Microsatellite lokus ile Ace.2, COI ve ITS genleri üzerine PCR ve PCR-RFLP gibi diğer bazı moleküler teknikler de bu tür kompleksinin ayırımında çalışılmıştır. Bunlar arasında Ace geni ve Microsatellite lokus en önemli karakterler olarak nitelenmiş ve özellikle *Cx. pipiens* ve *Cx. quinquefasciatus*'un ayırımında kullanılabileceği belirtilmiştir (24,29-32).

2.2. *CX. PIPiens*'İN BİYOLOJİNDE ÖNEMLİ FAKTÖRLER

Diptera takımının genel özelliği olarak, sivrisinekler tam metamorfoz geçirirler. Tüm sivrisinekler gelişimleri için akuatik habitatlara gereksinim duyarlar. Yumurtadan çıkıştan sonra dört larval dönem ve pupa dönemini geçirerek erişkin döneme geçerler (Şekil 2.4) (2).



Şekil 2.4. *Cx. pipiens*'in hayat siklusu

Habitat tipleri: Sivrisinekler, pratikte her çeşit durgun suda üreme potansiyeline sahiptirler. Az miktardaki sularda dahi çok fazla sayıda üreyebilirler. Atılmış teneke kutular, atılmış araba tekerlekleri, ağaç kovukları, yaprakların üzeri ve hayvanların ayak izlerinde biriken sularda, su depolarında, tuzlu bataklıklar gibi çeşitli özellikteki sularda üreyebilirler (32). Su hayatına uyum sağlamış olan sivrisinek larvalarına hemen hemen her türlü su birikintisinde rastlamak mümkündür. Ancak, her sivrisinek türü her çeşit su birikintisinde bulunamamakta ve türlere göre çeşitli habitatlar bulunmaktadır (33). Yapılan çalışmalarla *Cx. pipiens*'in birinci derecede, olmak üzere belli bir habitat seçmedikleri, hemen her çeşit sularda bulunduğu ortaya konmuş olmakla birlikte genellikle kirli, sulu habitatlarda daha yoğun bulundukları kaydedilmiştir (33).

Çiftleşme ve yumurta bırakma (ovipozisyon): Dişilerin çiftleşme aktivitesi, pupadan erişkin döneme geçişten kısa bir süre sonra olur. Erkekler ilk önce pupadan erişkin döneme geçerler. Üreme yerleri etrafında kümeler halinde uçarak dişi sivrisineklerin çıkışını bekler halde görülebilirler. Dişi sivrisinek bu kümenin içine girer ve çiftleşme meydana gelir.

Sivrisinek türlerinin çoğunda, döllenmiş dişiler yumurtlamak için sezonda bir ya da birkaç kez kan emme gereksinimi duyar. Dişi sivrisineklerin döllendikten sonra kan emerek yumurtlamalarına kadar geçen süreye “trofogni dönemi” denir. Her bir dönemin üç evresi vardır:

- 1) Kan emmeye yöneliş ve kan emme,
- 2) Kanın sindirimi ve yumurtalıklarda yumurtaların gelişimi,
- 3) Üreme yerlerine doğru uçmak ve burada yumurtlamak.

Yazın yeterli sıcaklıklarda bir kez kan emme, yumurtaların gelişimi için yeterli olmaktadır. Kanın sindirimi süresince yumurtalıklardaki tüm yumurtalar olgunlaşır (trofogni uyumu). Sonbaharda havaların soğuması ile kan emmiş sivrisinekteki yumurtalar olgunlaşamaz. İlkbaharda havaların ısınması ile sivrisinek tekrar kan emmeye başlar ve yumurta olgunlaşması kaldığı yerden devam eder (trofogni uyumu bozulur) (34). Çoğu sivrisinek türünde dişiler, kopulasyon sonrası yumurtaların gelişimini tamamlayabilmesi için kan emmek zorundadırlar (otojen olmayan gelişim). Az sayıdaki türün dişilerine (ör. *Cx. p. pipiens biotype molestus*) ait ilk parti yumurtalar kan emmeden de gelişebilirler (otojen gelişim). Dişi sivrisinekler, kan emmeyi takiben 2-4 gün içerisinde 50-500 adet yumurta bırakırlar (2). Sivrisinekler bıraktıkları yumurta içerisindeki embriyonun dış etkilerle tetiklenen dinlenme periyoduna (uyku hali) girip girmemelerine göre ikiye ayrılmıştır. İlk gruptakiler uyku halinde olmayan (nondormant) yumurtalar olup *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Uranotaenia*, *Orthopodomyia* ve *Wyeomyia* cinsine ait türlerdir. İkinci gruptakiler ise uyku halinde olan (dormant) yumurtalar olup, *Aedes* ve *Psorophora* cinslerine ait türlerdir. Dormant yumurtalar diğer gruptakilere göre kurumaya daha dirençlidirler (2).

İlk gruptaki (nondormant) yumurtalara sahip dişiler, yumurtalarını tek tek (*Anopheles*) veya kümeler halinde (*Culex*, *Uranotaenia*, *Coquillettidia*, *Orthopodomyia* ve Alt cins *Culiseta*) su yüzeyine bırakırlar (2). Bu gruptaki (nondormant) dişiler suyun üzerinde veya suya çok yakın durarak yumurtaları su yüzeyine bırakırlar. Bu tip yumurtaların embriyoları oda sıcaklığında (23°C) iki gün içerisinde gelişimini tamamlayarak kısa sürede yumurtadan çıkarlar. Bu tip yumurtalar kuru ortamda kısa süre içinde canlılığını yitirirler. Ancak çok nemli veya çok az su birikintisi içinde “karaya oturmuş” şekilde bir gün veya daha az canlılığını koruyabilirler (2). Uyku haline girmeyen (nondormant) yumurtalara sahip türler yetiştirme sezonlarına bağlı olarak, senede bir kaç jenerasyon

verebilirler. Bu gruptaki türler daha çok aynı sezon içinde birden fazla jenerasyonu kolayca oluşturabileceği kalıcı ve yarı kalıcı tipteki üreme yerlerinde bulunurlar. Genel görüş bu şekilde olsa da, *An. punctipennis* ve *Cx. pipiens* genellikle geçici su kaynaklarında bulunurlar (2). Embriyonik gelişim, yumurtalar suya bırakıldıktan hemen sonra başlar. Sıcaklığa bağlı olarak 2-7 gün veya daha uzun sürede embriyonik gelişim tamamlanır. Suya bırakılan *Cx. p. pipiens* yumurtalarından larva çıkışı 30°C’de bir gün, 20°C’de üç gün ve 10°C’de on gün sonra gerçekleşirken 4°C’de ise embriyonik gelişim tamamlanamaz (2).

Larva ve pupa dönemi: Yumurtadan çıkan larval dönemden erişkin evreye değin geçecek olan süre ortamın iklim, mevsim ve suyun sıcaklık durumuna göre değişir. Larvaların optimum gelişim sıcaklığı 24°C-26°C’dir (34). Optimum hava sıcaklığı ve besin alımında bu süre *Culicinae* alt ailesinde ortalama 7 gündür (32). Larvalar, bakteriler başta olmak üzere sudaki mikroorganizmalar, algler, protozoonlar, omurgasız canlılar ve tortulardan beslenir. Beslenme tipleri filtre edenler, tarayıcılar ve predatörler olmak üzere üç grupta incelenebilir. Filtre edenler, tipik olarak suda baş aşağı asılı dururlar ve su yüzeyinin altından tabana doğru olan kısımda süspansiyon halinde bulunan gıda partiküllerini süzerler (*Culex*, *Coquillettidia*, Alt cins *Culiseta*, bazı *Aedes* ve *Ochlerotatus* larvaları). Bitkiler ve ölü omurgasız canlıların küçük parçaları da ağız organelleri ile parçalanabilmektedir. Predatörler genellikle sivrisineklerin haricindeki diğer insektlerin larvaları ile beslenirler (*Toxorhynchites*, *Aedes*, *Psorophora* ve *Culex* larvaları). Predatör tip larvalara Avrupa’da rastlanmamaktadır (2).

Pupa akuatiktir. Metamorfozun şekillendiği bu dönem ortalama 2 gün sürer. Pupa, Diptera takımındaki diğer pupaların aksine, sudaki hareketlenmelere karşı çok hassas ve dikkat çekecek derecede hareketlidir. Suya dalıktan sonra aktif hareketleri ile su yüzeyine çıkan larvaların aksine, pupalar su yüzeyine pasif olarak çıkarlar. Pupalar kuraklığa göreceli olarak daha dayanıklı olup, üreme yerlerindeki su kurumaya yüz tutsa dahi erişkinler pupadan çıkabilmektedir. Larvanın aksine, pupa beslenemez (2).

Erişkin sivrisineklerin yaşam süreleri: Erkek sivrisinekler genellikle 6-7 gün arasında yaşarlar. Laboratuvar koşullarında, yüksek nem ve yeterli karbonhidrat beslenmesi ile yaşam süreleri bir ayı geçebilir. Dişiler özellikle hibernasyon durumunda ve bol gıda ile 4-5 ay süre ile canlı kalabilirler. Aktivitelerinin en yüksek olduğu dönemlerde ise dişilerin yaşam süresi, yaklaşık iki haftadır (32).

Hibernasyon ve estivasyon: Sivrisinekler kışın soğuk ve yazın kuraklık gibi uygun olmayan hava koşullarında etkinlik gösteremez ve dinlenme (diapoz) dönemine girerler. Bunların kan emme ve yumurtlama etkinlikleri durur (gerçek diapoz). Büyük çoğunluğu ölür. Bazı türlerde ise dişiler kötü hava koşullarında dahi (kışın ahır ve evlerde) kan emebilirler fakat yumurtlayamazlar. Bu durumda diapoz tam değildir (yumurtalık diapozu) (34). *Culex*, *Culiseta*, *Uranotaenia* ve *Anopheles* cinslerinde erişkin dönemde hibernasyon görülmektedir (2). Hibernasyona girecek dişiler, sonbaharın son günlerine doğru ahır ve evlere girerek kuytu bir köşe, aralık, çatlak veya bodrumlara sığınır. Havaaların soğuması ile sivrisineğin karnındaki yağ gözeleri sayıca artar ve yumurta gelişimi durur, yumurta yerleri yağla sarılır. Hibernasyona giren dişiler, su kaybını azaltmak için gliserol, trehaloz ve sorbitolü kullanmazlar, bunun yerine kutikular hidrokarbonları kullanarak su kaybını en aza indirirler (35). Sivrisinek ayaklarını iki yana açar ve karnını duvara dayarcasına yaklaştırır. Besin alamaz ve uyuşukluk (letarji) durumunda kalır. Hibernasyon esnasında tedirgin olduklarında çok yakın bir yere geçerek orada kışlamaya devam ederler. Havaaların ısınmasıyla hibernasyon sonlanır (34). Çok sıcak ve kurak geçen yaz aylarında sıvı kaybı sonucu sivrisinek besin alamaz ve uyuşukluk durumuna girer. Bu duruma da estivasyon (yaz uyuşukluğu) denir (34).

Sivrisineklerin uçuş gücü: Havadaki nemin yükselmesi, sivrisineklerin uçuş mesafesini artırmaktadır. Erişkinler, nemin az olduğu havalarda dinlenme durumunda bulunurlar. Sivrisinekler üreme yerlerinden 2-3 km uzağa uçabilmektedirler. Sivrisineklerin kendi güçleri ile yayılışına “aktif dispersiyon”, rüzgâr ve çeşitli hava, kara, su aracı ile daha uzak yerlere yayılışına ise “pasif dispersiyon” denir. Sivrisinekler 1000 m yüksekliğe kadar çıkabilirler (34).

2.3. CX. PIPENS ERGİNLERİNİN KAN BESLENMESİNDE ÖNEMLİ FAKTÖRLER VE KONAK TERCİHLERİ

Kan ile beslenen (haematophagous) artropodların beslenme yapıları ve konak tercihleri, bir çok patojenin çoğalması ve omurgalı konaklara bulaşması açısından oldukça önemlidir (36,37). 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 (36). Ergin *Cx. pipiens* erkeklerinin ağız yapıları delmeye elverişli olmadığından kan ememezler. Beslenmeleri nektarlar, bitki öz suları ve diğer sıvılar ile olmaktadır. Dişilerin beslenmeleri ise çeşitli omurgalılarından kan emme yoluyla olur. Nitekim sivrisineklerin büyük bir çoğunluğu zoofilik olup, insanlar haricindeki hayvanlar ve soğukkanlı omurgalılarından kan emer. Kan emmek için insanı tercih eden türler antropofilik olarak tanımlanır (32). Konak ayrımı yapmadan hayvanlardan ve insanlardan kan emenlere ise zooantropofilik denir (34).

Beslenme yirmidört saatlik zaman dilimi tarafından kontrol edilen birçok insekt aktivitesinden birisidir (38). İnsektler ritmik paternlerde beslenir ve hareket ederler. Bu periyod içerisinde inaktif veya uyku dönemlerinde ise hareketsiz kalırlar ve beslenmezler (39). Endojen beslenme ritimleri günlük aydınlık/karanlık siklusların içerisinde olmakla birlikte diğer bazı eksternal ve internal faktörler de (Örn. Sıcaklık, rüzgar, fizyolojik durum vb.) bu beslenme ritimlerini modüle edebilir (38). İnsektlerde erginlerin beslenmesi aydınlık (40,41), karanlık (42,43), veya gün doğumu/gün batımı (44,45,46) ile sınırlıyken gelişim dönemleri 24 saat boyunca gelişigüzel beslenebilirler (47). İnsektlerin tüm hayat dönemleri boyunca, yakın türler veya tür içinde dahi beslenme aktivitesi periyodunda farklılıklar bulunabilir (44-50). Kanla beslenen insektlerin günlük beslenme ritimleri üzerine özellikle hastalık naklindeki önemlerinden dolayı vektör türler başta olmak üzere detaylı çalışmalar yapılmıştır (43,44,50-53). Serbest yaşayan kanla beslenen insektlerin (Örn., Culicidae, Culicoides, Ceratopogonids vd.) beslenmeleri, aktif oldukları periyodların konak uygunluğu periyoduyla örtüşmesini gerektirir. Bunun yanında 24 saat dilimindeki predatör aktivitesi ve çevresel koşullar (Örn., sıcaklık, rutubet) da insekt uygunluğunu etkileyebilir (54). Yirmidört saatlik zaman dilimi tarafından kontrol edilen insekt kan beslenme aktivitesi, 1) konak uygunluğu, 2) predatör inaktivitesi ve 3) uygun çevresel koşullar ile senkronize olan konak arama zamanı sayesinde bir mekanizma sağlamaktadır. Örneğin tahtakurularından *Cimex lectularius*'un kan beslenmesi, insanların inaktif ve uygun, kısmi rutubetin ise yüksek olduğu sabahın erken saatlerinde gerçekleşir (54). Birçok patojen ve parazitin vektörler tarafından nakli beslenme periyodlarının yüksek olduğu dönem boyunca şekillenir. Vektör türlerin kan emme periyodlarının pik dönemlerinin ve moleküler temellerinin bilinmesi, ken emici insekt türleri ile konaklarının temasını azaltma amacıyla kontrol önlemlerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Son zamanlarda bazı vektör türlerde günlük davranış ritimlerinin temelini oluşturan endojen

moleküler saatin detayları tarif edilmiştir (55,56). Sivrisinekler arasında fotoperiyotla ilgili olarak konak arama için uçuşlar ritmiktir (57-60). Konak varlığına dair işaretler de beslenme davranışlarını etkilemektedir (61). Bu işaretlerden biri CO₂ olup, sivrisinek aktivasyonunda önemli olduğu (53) ve konak bulma için uzun mesafeli bir işaret rolü üstlendiği belirtilmektedir (62).

Cx. pipiens kompleks içinde yer alan *Cx.p. pipiens* ve *Cx.p. molestus* morfolojik olarak identik olup, coğrafik dağılımları da örtüşmektedir. Ancak bu iki alt tür (bioform) davranışsal olarak farklılık göstermektedir. Örneğin *Cx.p. molestus* ilk yumurta yığını kan beslenmesinden önce bırakmaktayken *Cx.p. pipiens* reproduksiyonunda kan beslenmesi zorunludur (63). *Cx. p. molestus* popülasyonları sıklıkla yer altında (kiler, mahzen, yer altı tünelleri gibi) beslenirken (18,64,65), *Cx. p. pipiens* popülasyonları daha çok açık ve yer üstünde beslenir. Asyadaki *Cx. p. molestus* popülasyonlarının günlük uçuş paternleri *Cx. pipiens* kompleksteki yer üstünde beslenen diğer alt türlere göre aritmik olduğu kaydedilmiştir (60,66). Yetersiz ışık kaynaklarıyla karanlık habitatları ve uçuş aktivitesindeki aritmiye dair bulgular, *Cx. p. molestus*'un yer üstünde beslenen *Cx. p. pipiens* popülasyonları ile kıyaslandığında biyolojik yapısında ışık tarafından uyarılmadığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu iki bioformun doğal popülasyonlarının da farklı konak tercihleri olduğu rapor edilmiştir. *Cx. p. pipiens*'in kan beslenmesinde daha çok kanatlı (67,68), *Cx. p. molestus*'un ise insanları (18,69) tercih ettiği kaydedilmiştir.

2.4. CX. PIPENS'İN VEKTÖRLÜK ROLLERİ

Sivrisinekler, medikal açıdan önemli olan çeşitli patojenleri naklederler. Virüsler, bakteriler, protozoonlar ve nematodların etkeni olduğu önemli hastalıklar olan sıtma, dengue ve sarıhumma, çeşitli viral ensefalitler ve filariosis vb.'nin nakillerinden sorumludurlar. Sivrisineklerin vektörlük rolleri mekanik veya biyolojik olabilmektedir (1).

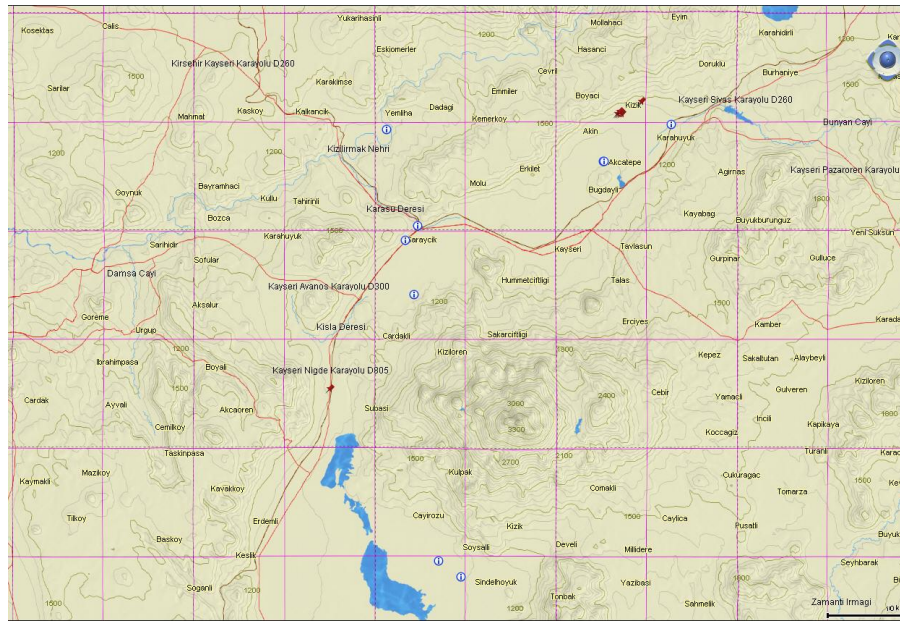
Cx. pipiens kompleks içinde yer alan sivrisinek türleri kosmopolit yayılışa sahip olup kanatlı malariası, dirofilariosis, Bancroftian filariasis ile Rift Valley fever, Sindbis virüs, St. Louis encephalitis ve West Nile Fever gibi birçok enfeksiyonu kanatlı ve memeli konaklara nakletme yeteneğindedirler (70,71). *Cx. p. molestus*'un Kuzey Amerika'da West Nile Virusu'nun primer vektörü olduğu rapor edilmektedir (4). Asya, Afrika ve Güney Amerika'nın tropik bölgelerinde lenfatik filariosis etkeni olan

nematodlar, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ve *Brugia timori*, yaklaşık 120 milyon insanı etkilemiştir. Bu vakaların % 90'ının etkeni *W. bancrofti*'dir. Hastalığın vektörlüğünü yapan en önemli türlerden biri de *Culex pipiens quinquefasciatus* olarak belirlenmiştir (2). Ayrıca *Cx. pipiens* kompleks türlerinin dünyanın çeşitli yörelerinde köpeklerin kalp kurdu etkeni *Dirofilaria immitis*'e aktif vektörlük yaptıkları kaydedilmiştir (72-80).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ VE ARAŞTIRMA SAHASI

Bu çalışmanın materyalini “*Dirofilaria immitis*’in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi” isimli ve 107O533 kodlu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında Kayseri yöresinden 2008 ve 2009 sezonlarında farklı 46 odaktan (Şekil 1, Şekil 2) toplanmış ve -20 °C’de muhafaza edilmiş olan sivrisinek örnekleri oluşturmuştur.



Şekil 3.1. 2008 sezonunda sivrisinek örnekleme yapılan noktaların (★, ①) coğrafik harita üzerinde gösterimi.

- b) Çözünmüş pellet üzerine 350 µl PBS (phosphate-buffered saline, not provided) ve 0.9 µl RNase A ilave edilmiş ve 30 sn el yardımıyla nazikçe çalkalanıştır.
- c) 350 µl homojenat pipet yardımıyla 2 ml microfuge tube (provided) içerisine alınmıştır.
- d) Tüp içine 20 µl Proteinase K ve 150 µl Buffer C-L ilave edilerek hemen 1dk vortekslenmiştir.
- e) Tüpler 56°C'de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir (Her 2-5 dk'da bir vortekslenmiştir).
- f) Tüpler üzerine 350 µl Buffer P-D eklenerek 30 sn vortekslenmiştir.
- g) Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- h) Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine (provided) miniprep kolon yerleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep columnlar içerisine konularak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- i) Süre sonunda dibe çöken süpernatantlar dökülmüş ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep columnlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- j) Miniprep columnndan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırılmış ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep kolonlar içerisine 700 µl of Buffer W2 ilave edilerek 14,000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve bu işlemler 2 kez tekrarlanmıştır.
- k) Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirilmiştir. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.
- l) Herbir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, önceden 65°C'lik su banyosuna konulmuş olan Eluent'den 100 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu

Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktlarından 4'ü mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgesinin yaklaşık 658 bp gen fragmentini amplifiye eden LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATAT TGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3') (86) primerler ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 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. Thermalcyclerda protokol 96 °C'de 1 dk; 35 siklus, denaturation: 94 °C'de 1 dk, annealing: 55 °C'de 1 dk, extension: 72 °C'de 1,5 dk; final extension: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerle 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 Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4. Ergin Dişi *Cx. pipiens* Örneklerinin mt-COI Gen Bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizleri

Tür teşhisleri yapılmış ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinin PCR analizleri sonucu uygun bant profilleri gösterenlerden seçilen 2 izolat High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örneklerin mt-COI gen bölgesi LCO1490/HCO2198 primerleri ile ABI 3700 Capillary Sequence System (Applied Biosystems) de sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlarla ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (87) ve Geneious 6.1.6 (88) 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 (89) ve Geneious 5.5.5 (88)

yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

3.2.5. Ergin Dişi *Cx. pipiens* Örneklerinin Kan Beslenmesinde Konak Spekturumunun PCR ile Belirlenmesi

Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinin beslenme eğilimlerini belirlenmesi mitochondrial cytochrome b (mt-cyb) gen bölgelerinden dizayn edilen kanatlı spesifik Avian-3 (5'-GACTGTGAYAAAATYCCMTTCCA-3') ve Avian-8 (5'-GYCTTCAITYTTTGGYT TACAAGAC-3') primerleri, memeli spesifik Mammalian-1 (5'-TGAYATGAAAAA YCATCGTTG-3') ve Mammalian-2 (5'-TGTAGTTTRTCWGGGTCKCCTA-3') primerleri kullanılmıştır (90). 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. Kanatlı ve Memeli Mt-cyb Genlerinin Klonlanması ve Plasmid İzolasyonu

Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinin beslenme eğilimlerini belirlenmesinde konak türü tayini için memeli ve kanatlı mt-cyb gen bölgesi yönünden PCR analizlerinde pozitif belirlenen 10'ar izolat klonlanmış ve plasmid pürifikasyon yapılmıştır. Klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

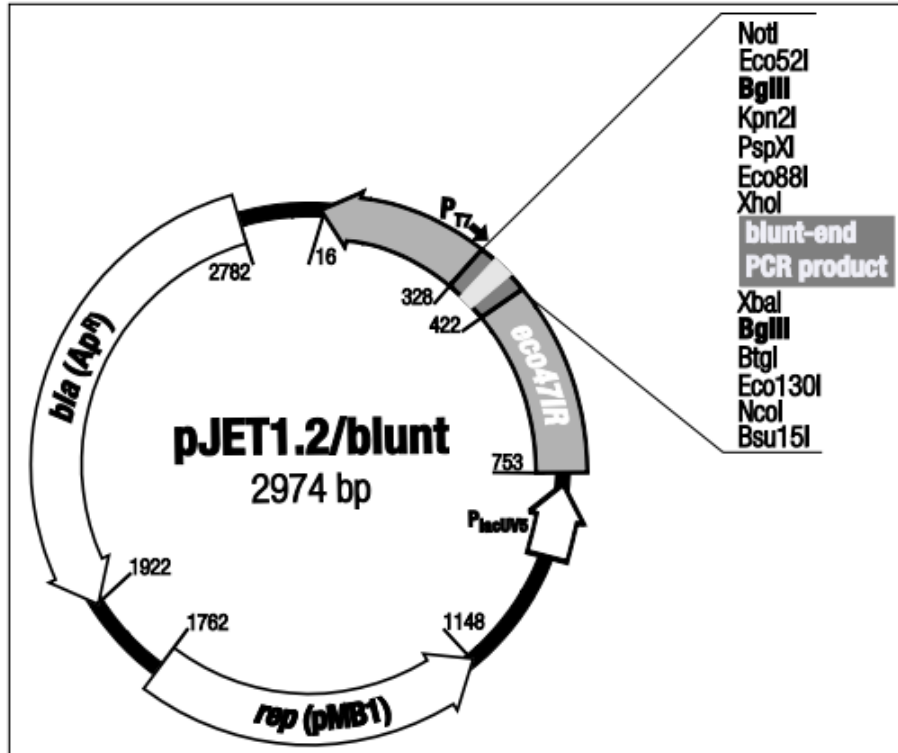
Ligasyon basamağı: Memeli ve/veya kanatlı mt-cyb gen bölgesi yönünden PCR analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen ampikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin

klonlanmasında CloneJET PCR Clonning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaction Buffer	15 µl
PCR product (10 ng/ µl)	11.5 µl
DNA Blunting enzyme	1.5 µl
Toplam	18 µl

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

Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl’ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl’si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3. pJET1.2/blunt CloningVector

Transformasyon Basamağı: 5 µL’lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücrelerine eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Karışım, önce 42°C’de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium

eklenmiştir. 37°C’de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

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

Koloni Screening PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için Koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl ITaq master mix’i, 0,4 µl pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerleri ile bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılarak toplam 20 µL’lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C’de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 °C’de 30 s, annealing: 60 °C’de 30 s, extension: 72 °C’de 1 dk; final extension: 72 °C’de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampliconlar %1.5’luk agaroz jelde yürütölüp görüntülenmiştir.

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

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

- 1- -20 °C’de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1 eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2- Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalanmıştır.
- 3- Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklenmiş ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalanmıştır
- 4- Karışım daha sonra 12,000×g’de 10 dakika santrifüj edilmiş
- 5- Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plasmid Miniprep column içine konulup 12,000×g’de 1 dk santrifüj yapılmıştır
- 6- Altteki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki Miniprep column tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.

- 7- Yıkama amacıyla her bir Miniprep column üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 8- Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve Miniprep column aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir
- 9- Tüp üzerine 700 µl Buffer W2 eklenerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir.
- 10-Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmıştır. Miniprep column bu kez, yeni 2 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirilmiş ve membrana bağlanan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 11-Santrifüj sonrası Miniprep column temiz bir 1.5 ml'lik tüp içerisine yerleştirilmiş ve plasmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 60 µl Eluent eklenmiş ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 12-Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plasmid DNA'sı, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon ve PCR Analizleri: İzole edilen rekombinant plasmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve/veya vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır. Elde edilen plasmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

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

Karışım vortekslenmiş ve 37 °C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra %1.5'lik agaroz jele yüklenerek klonlanan genin varlığı yönünden incelenmiştir.

Plasmid DNA'ların amplifikasyonu amacıyla pJET1.2 Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Thermo Scientific) ve pJET1.2 Reverse (5'-

AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3', Thermo Scientific) primerleri kullanılmış ve PCR sonrası ampliconlar % 1,5 'luk agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.

3.2.7. Klonlanan Kanatlı ve Memeli Mt-cyb Genlerinin Tür Tayini için Sekans ve Filogenetik Analizleri

Kanatlı ve memeli mt-cyb gen bölgesi için elde edilmiş olan plasmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plasmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra BioEdit Sequence Alignment (87) ve Geneious 5.5.5 (88) yazılımları ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlemiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ve Geneious 6.1.6 (88) genetik analiz yazılımıyla çoklu hizalamaları yapılarak konak türleri identifiye edilmiştir. filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen nükleotid dizilerinin GenBank kayıtları yapılmıştır.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 15.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinin kan beslenmesinde konak tercihlerinin istatistiksel analizinde Fisher's Exact ve Pearson's Chi Square testleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İdentifiye Edilen Ergin *Cx. pipiens* Örneklerinin Tür Seviyesinde Ayrım Kriteri Olan Bazı Morfolojik Yapıları ve Dağılımları

Çalışmada identifikasyona tabii tutulan toplam 1284 ergin dişi sivrisinekten 376'sı *Cx. pipiens* olarak teşhis edilmiştir. İdentifiye edilen ergin *Cx. pipiens* dişilerinin önemli bazı morfolojik özellikleri aşağıda gösterilmiştir:

1. Labyumda belirgin soluk renkli bir halka bulunmamıştır (Şekil 4.1).
2. Pre spiracular ve post spiracular setae'lar mevcut değildir (Şekil 4.2).
3. Prealar bölgede pul görülmemiştir (Şekil 4.2).
4. 1. çift bacaklarda, tibia'nın tamamen koyu renkli pullarla kaplı olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).
5. 3. çift bacaklarda, tarsomer I'in uzunluğu hemen hemen tibianın uzunluğuna eşit olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).
6. 3. çift bacaklarda, tibia'nın tamamen koyu renkli pullarla kaplı olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).
7. Kanatlarda, subcostal damarın apeksi ile R2-R3 çatal kökü hizalarının incelenmesinde R2-R3 çatal kökünün kanat köküne daha yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.1. *Cx. pipiens* (dişi); labiumda belirgin soluk renkli bir halka bulunmamakta



Şekil 4.2. *Cx. pipiens* (dişi); pre spiracular ve post spiracular bölgede setae yok, prealar bölgede pul bulunmamakta



Şekil 4.3. *Cx. pipiens* (dişi); 1. çift bacaklarda, tibia tamamen koyu renkli pullarla kaplı



Şekil 4.4. *Cx. pipiens* (dişi); 3. çift bacaklarda, tarsomer I'in (b) uzunluğu hemen hemen tibianın (a) uzunluğuna eşit, tibia tamamen koyu renkli pullarla kaplı



Şekil 4.5. *Cx. pipiens* (dişi); subcostal damarın apeksi (→) ile R2-R3 çatal kökü (→) hizalarında, R2-R3 çatal kökü kanat köküne daha yakın

Araştırma kapsamında incelenen 376 *Cx. pipiens* örneğinin toplanma yılları ve bölgelere göre dağılımları Tablo 4.1’de verilmiştir.

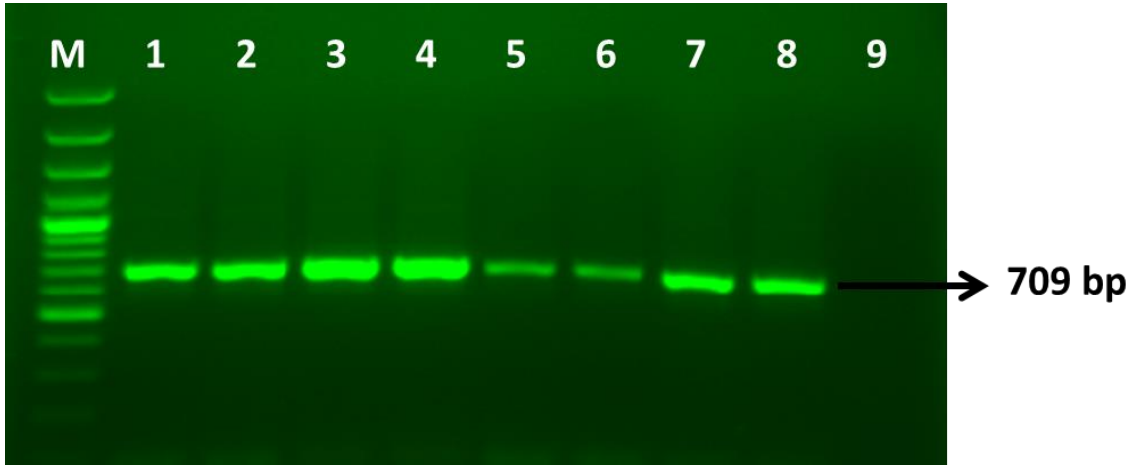
Tablo 4.1. Araştırmaya dahil edilen *Cx. pipiens* örneklerinin araştırma sezonu ve örnekleme bölgesine göre dağılımı

Yıl	Nokta	Koordinat	Bağlı olduğu merkez	Cx. pipiens	
				Sayı	%
2008	NKT-1	38°34.002’N; 35°11.197’E	İncesu	12	3,19
	NKT-3	38°13.891’N; 35°11.968’E	Yeşilhisar	10	2,66
	NKT-7	38°53.156’N; 35°35.282’E	Kızık	4	1,06
	NKT-8	38°53.859’N; 35°37.062’E	Kızık	4	1,06
	NKT-11	38°52.253’N; 35°39.587’E	Gömeç	2	0,53
	NKT-12	38°49.727’N; 35°34.002’E	Akçatepe	7	1,86
	NKT-14	38°51.924’N; 35°15.944’E	Yemliha	9	2,39
	NKT-16	38°44.252’N; 35°17.507’E	Saraycık	15	3,99

	NKT-17	38°40.521'N; 35°18.246'E	Dokuzpınar	26	6,91
	NKT-18	38°22.079'N; 35°20.305'E	Develi	12	3,19
	NKT-19	38°20.938'N; 35°22.124'E	Sindelhöyük	9	2,39
2009	NKT-1	38°52.459'N;35°45.166'E	Bünyan	5	1,33
	NKT-5	38°49.700'N;35°33.248'E	Akçatepe	32	8,51
	NKT-6	38°53.023'N;35°35.157'E	Kızık	38	10,11
	NKT-7	38°51.543'N;35°31.925'E	Akın	4	1,06
	NKT-8	38°53.559'N;35°37.490'E	Güneşli	35	9,31
	NKT-14	38°49.235'N;35°37.394'E	Yeşilyurt	52	13,83
	NKT-15	38°46.361'N;35°33.648'E	Cırgalan	25	6,65
	NKT-16	38°52.902'N;35°35.091'E	Kızık	42	11,17
	NKT-18	38°41.308'N;35°19.946'E	Dokuzpınar	8	2,13
	NKT-22	38°23.639'N;35°55.092'E	Tomarza	5	1,33
	NKT-27	38°15.533'N;35°37.317'E	Develi	20	5,32
TOPLAM				376	100,00

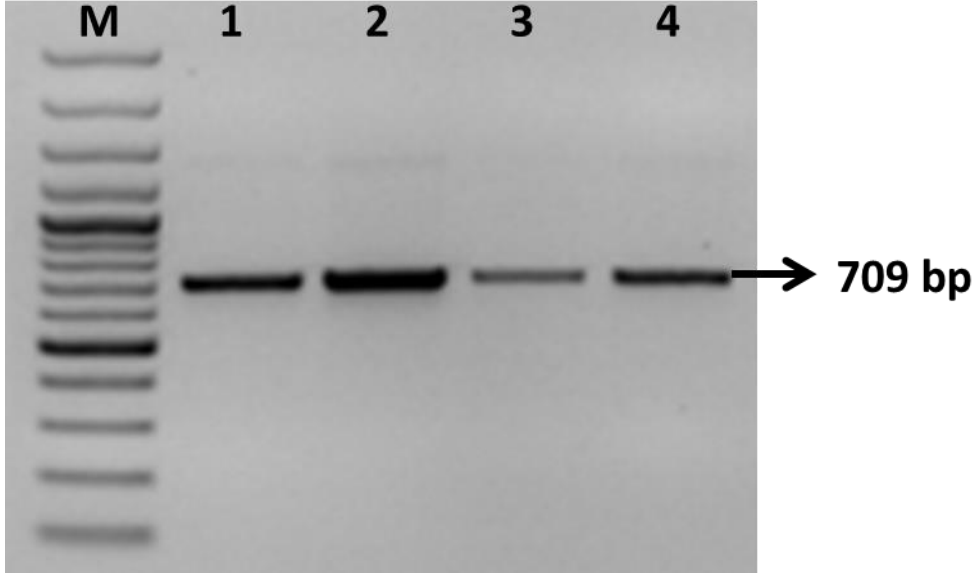
4.2. Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (mt-COI) Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi

Tür teşhisleri yapılan *Cx. pipiens* örneklerinden seçilen bazı izolatların mt-COI geninin parsiyel amplifikasyonu sonucunda jel üzerinde 709 bp büyüklüğünde amplifikasyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Bazı pozitif izolatlarda parsiyel mt-COI gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100bp); 1-7: Pozitif izolatlar; 8: Pozitif Kontrol; 9: No DNA

Mt-COI genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile PCR sonucu pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan iki izolat jel pürifiye (Şekil 4.7) edildikten sonra PCR primerleri ile sekans analizlerine tabii tutulmuştur.

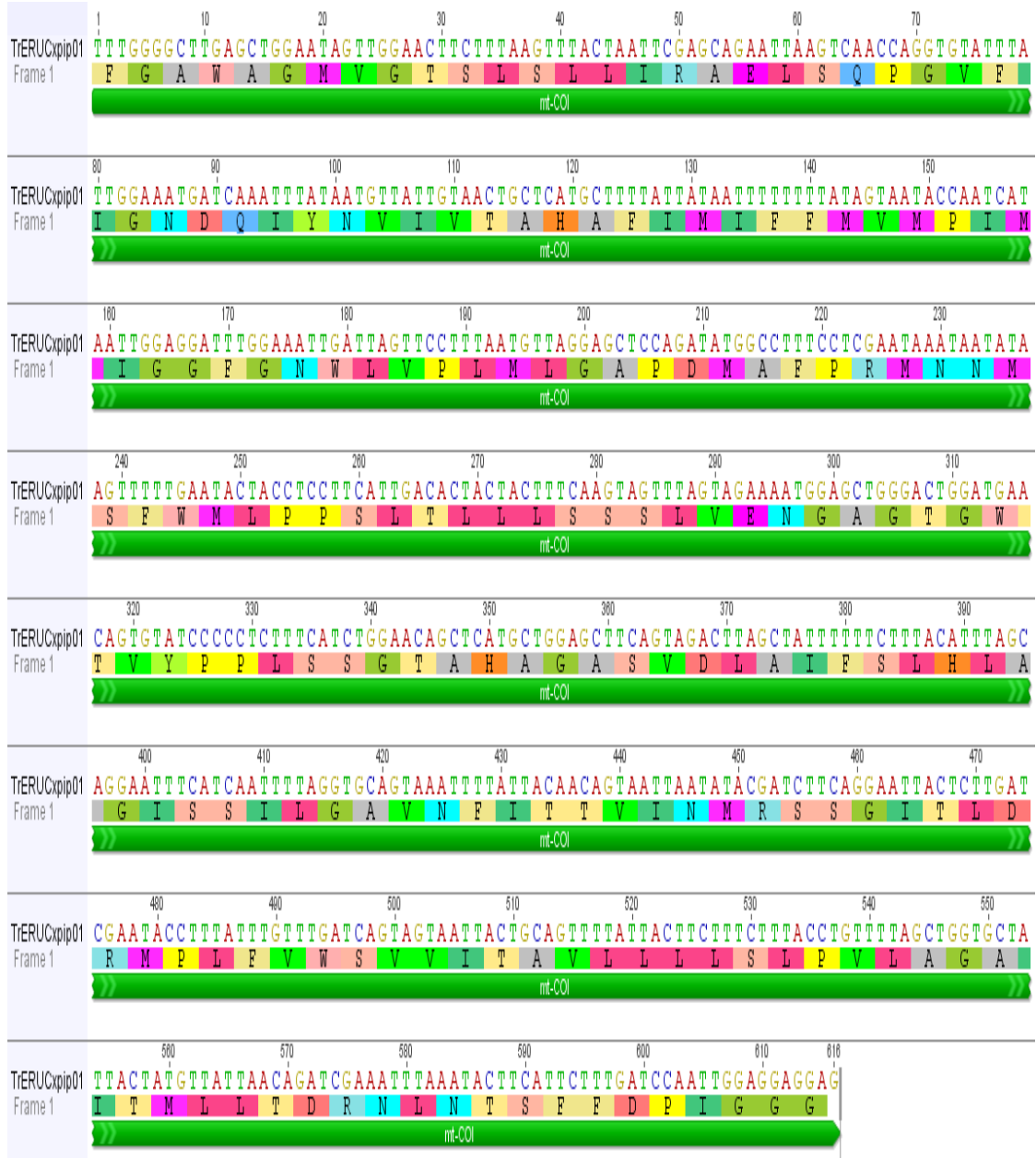


Şekil 4.7. Sekans analizine tabii tutulan *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre jel pürifikasyon sonrası agaroz jel üzerinde görünüşleri M: Marker (100bp); 1,2: I. izolat; 3,4: II. izolat

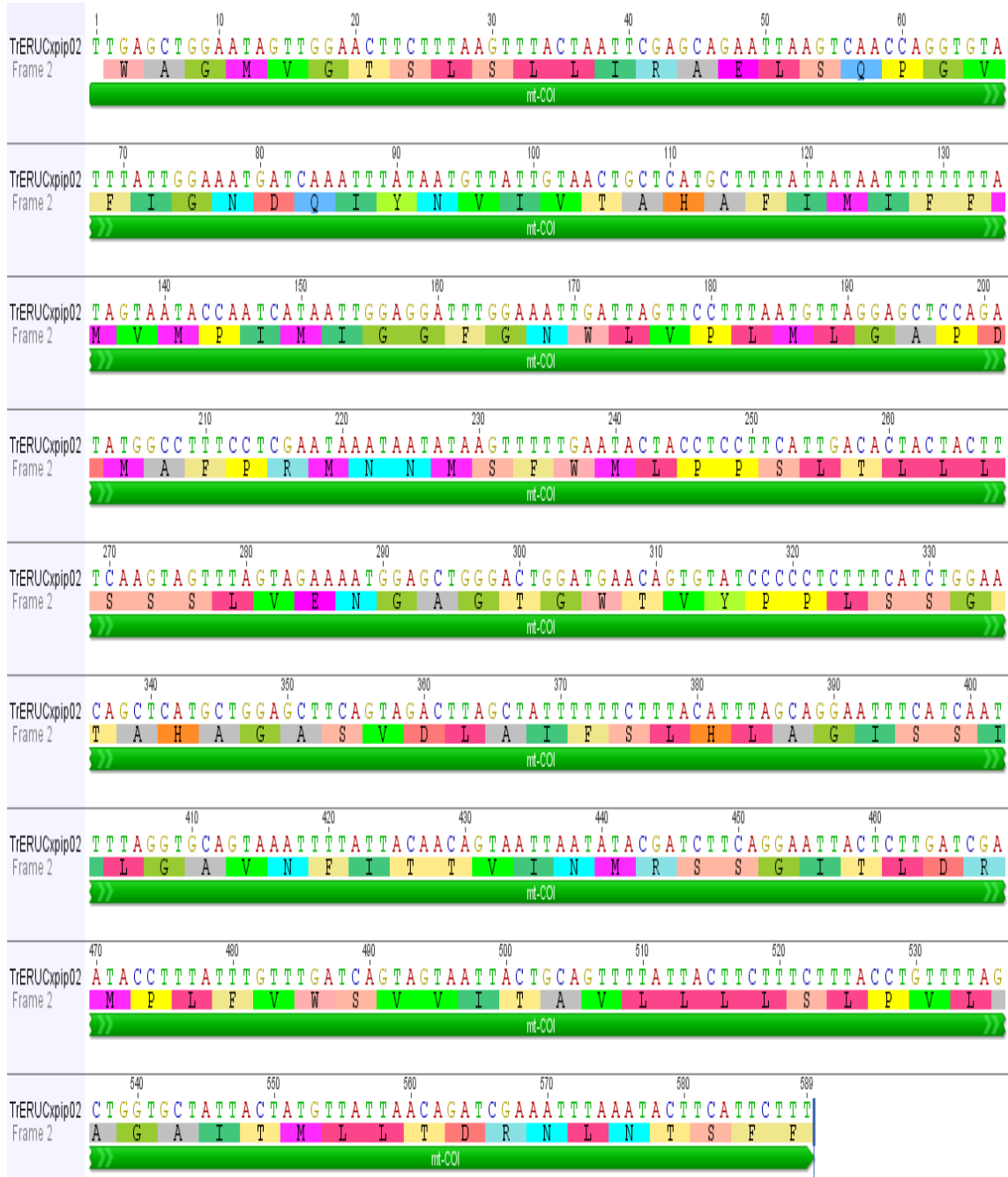
Mt-COI gen bölgesi yönünden sekansları belirlenen *Cx. pipiens* izolatlarının, izolasyon kaynağı ile GenBank aksesyon numaraları Tablo 4.2'de, nükleotid kompozisyonları ise Şekil 4.8-4.9'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Kayseri yöresinden toplanmış *Cx. pipiens* izolatlarının incelenen gen bölgesi, izolasyon kaynağı ile moleküler karakterize edilen türler ve GenBank aksesyon numaraları

İzolat	Tür	Gen bölgesi	İzolasyon kaynağı	GenBank Aksesyon Numarası
TrERUCxpip01	<i>Cx. pipiens</i>	Mt-COI	Ergin Dişi	KJ188203
TrERUCxpip02	<i>Cx. pipiens</i>	Mt-COI	Ergin Dişi	KJ188204



Şekil 4.8. TrERUCxpi01 izolatının parsiyel mt-COI gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (KJ188203)



Şekil 4.9. TrERUCxip02 izolatının parsiyel mt-COI gen bölgesi nükleotit ve aminoasit dizilimleri (KJ188204)

4.3. *Cx. pipiens* İzolatlarının Mt-COI Geninin Moleküler Karakterizasyonu ve Filogenetik Analizi

Kayseri yöresinden toplanan *Cx. pipiens* izolatlarıyla mt-COI gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki diğer bazı *Cx.*

pipiens izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Araştırma yöresinde belirlenen *Cx. pipiens* izolatları ile Dünyadan mt-COI gen bölgesine göre filogenetik kıyaslaması yapılan diğer *Cx. pipiens* izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Orijin	İzolasyon kaynağı	Aksesyon Numarası
Iksha4	Rusya	Ergin	FN395182
-	Rusya	Ergin	AM403476
-	İsveç	Ergin	JX040514
No2	Danimarka	Ergin	KJ401308
No3	Danimarka	Ergin	KJ401309
SAW 564	Almanya	Ergin	HF562712
SAW 526	Almanya	Ergin	HF562641
ALL 3 20	Almanya	Ergin	HF562788
05_Elmley_2010	İngiltere	Ergin	JN592749
12_Cliffe_2010	İngiltere	Ergin	JN592736
10773	İngiltere	Ergin	JQ253844
JL_21	Hindistan	Ergin	KC970296
1002YON2011	Japonya	Ergin	AB738278
TH148-8	Tayland	Ergin	HQ398883
M026	Arjantin	Ergin	KF919189
mosq281-11ab	Kanada	Ergin	GU908076
mosqPP2	Kanada	Ergin	GU908078
mosqPP9	Kanada	Ergin	GU908084
mosq174-12	Kanada	Ergin	GU908074
TUC9	ABD	Ergin	JX297287
P2AB	ABD	Ergin	GU474010
P7FA	ABD	Ergin	GU474003
SAR2	Meksika	Ergin	JX297290
-	Türkiye	Ergin	HQ724616
TrERUCxpip01	Türkiye-Kayseri	Ergin dışı	KJ858517
TrERUCxpip02	Türkiye-Kayseri	Ergin dışı	KJ858518

Kayseri yöresinde koyunlarda belirlenen ve nükleotid dizisi ortaya konan *Cx. pipiens* izolatları ile Dünyanın çeşitli ülkelerinden çoklu hizalamaya dahil edilen diğer izolatların mt-COI gen bölgesi yönünden nükleotid kompozisyonları Tablo 4.4'de, ikili hizalamaları sonucu genetik identiklik oranları ise Tablo 4.5'da verilmiştir.

Tablo 4.4. Mt-COI gen bölgesi yönünden çoklu hizalamaları yapılan *Cx. pipiens* izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat Aksesyon No	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	A+T (%)	G+C (%)	Toplam nükleotid sayısı
FN395182	39,6	14,8	30,7	14,9	70,4	29,6	1542,0
AM403476	39,3	15,1	29,2	16,4	68,5	31,5	603,0
JX040514	39,7	14,7	30,8	14,8	70,5	29,5	1442,0
KJ401308	39,9	14,8	28,9	16,4	68,7	31,3	675,0
KJ401309	40,0	14,5	29,2	16,3	69,2	30,8	668,0
HF562712	39,7	14,8	29,4	16,1	69,1	30,9	657,0
HF562641	39,7	14,7	29,5	16,1	69,1	30,9	658,0
HF562788	39,6	14,9	29,5	16,0	69,1	30,9	651,0
JN592749	39,5	14,9	30,2	15,3	69,8	30,2	658,0
JN592736	39,8	14,7	29,3	16,1	69,1	30,9	658,0
JQ253844	39,9	14,8	29,2	16,1	69,1	30,9	609,0
KC970296	39,7	14,9	29,3	16,1	69,0	31,0	658,0
AB738278	39,8	14,7	29,5	16,0	69,3	30,7	658,0
HQ398883	39,8	14,9	28,6	16,7	68,4	31,6	658,0
KF919189	39,6	14,8	29,2	16,4	68,8	31,2	654,0
GU908076	39,0	15,2	29,3	16,5	68,3	31,7	638,0
GU908078	39,4	15,0	29,3	16,3	68,7	31,3	632,0
GU908084	39,2	15,0	29,6	16,1	68,8	31,2	632,0
GU908074	39,4	15,0	29,4	16,2	68,8	31,2	635,0
JX297287	39,9	14,9	29,1	16,0	69,1	30,9	611,0
GU474010	38,9	15,5	29,2	16,4	68,1	31,9	586,0
GU474003	39,0	15,5	29,2	16,3	68,2	31,8	582,0
JX297290	39,8	14,9	29,2	16,1	69,0	31,0	610,0
HQ724616	39,6	14,8	30,8	14,8	70,4	29,6	1537,0
KJ858517	39,0	14,9	28,9	17,2	67,9	32,1	616,0
KJ858518	39,7	15,1	29,2	16,0	68,9	31,1	589,0
Ortalama	39,6	14,9	29,6	15,9	69,2	30,8	735,3

	AB738278	AM403476	FN395182	GU474003	GU474010	GU908074	GU908076	GU908078	GU908084	HF562641	HF562712	HF562788	HQ398883	HQ724616	JN592736	JN592749	JQ253844	JX040514	JX297287	JX297290	KC354820	KC970296	KF919189	KJ401308	KJ401309	TrERUC...	TrERUC...
AB738278		100%	99.8%	99.5%	98.9%	99.6%	99.6%	99.2%	98.9%	99.7%	99.8%	99.3%	98.3%	99.7%	99.8%	97.7%	99.8%	100%	99.8%	99.8%	84.0%	99.4%	99.7%	98.6%	99.8%	99.8%	100%
AM403476	100%		100%	100%	99.9%	100%	99.7%	99.5%	99.2%	99.8%	99.9%	99.6%	98.5%	99.8%	100%	97.8%	100%	100%	100%	100%	84.1%	99.5%	99.8%	98.8%	100%	100%	100%
FN395182	99.8%	100%		99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.2%	98.9%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.8%	100%	97.9%	100%	99.9%	100%	100%	86.2%	99.5%	99.8%	98.7%	100%	100%	100%
GU474003	99.5%	100%	99.5%		99.9%	99.6%	99.4%	98.9%	98.6%	99.3%	99.4%	99.1%	98.1%	99.3%	99.5%	97.4%	99.5%	100%	99.5%	99.5%	83.7%	99.0%	99.3%	98.3%	99.5%	99.5%	100%
GU474010	98.9%	99.9%	98.9%	99.9%		99.5%	99.3%	98.8%	98.5%	98.7%	98.8%	98.5%	97.5%	98.7%	98.9%	96.8%	98.9%	99.9%	98.9%	98.9%	83.2%	98.4%	98.7%	97.7%	98.9%	99.2%	99.9%
GU908074	99.6%	100%	99.6%	99.6%	99.5%		99.4%	99.2%	98.9%	99.5%	99.6%	99.2%	98.1%	99.5%	99.6%	97.6%	99.6%	100%	99.6%	99.6%	84.0%	99.2%	99.5%	98.4%	99.6%	99.6%	100%
GU908076	99.6%	99.7%	99.7%	99.4%	99.3%	99.4%		98.9%	98.6%	99.6%	99.6%	99.3%	98.2%	99.6%	99.7%	97.5%	99.7%	99.8%	99.7%	99.7%	84.1%	99.3%	99.6%	98.5%	99.7%	99.7%	99.7%
GU908078	99.2%	99.5%	99.2%	98.9%	98.8%	99.2%	98.9%		98.5%	99.0%	99.1%	98.7%	97.6%	99.0%	99.2%	97.1%	99.1%	100%	99.1%	99.1%	83.5%	98.7%	99.0%	97.9%	99.2%	99.1%	99.5%
GU908084	98.9%	99.2%	98.9%	98.6%	98.5%	98.9%	98.6%	98.5%		98.7%	98.8%	98.5%	97.6%	98.7%	98.9%	97.9%	98.8%	99.3%	98.8%	98.8%	83.8%	98.4%	98.7%	97.9%	98.9%	98.8%	99.2%
HF562641	99.7%	99.8%	99.8%	99.3%	98.7%	99.5%	99.6%	99.0%	98.7%		99.8%	99.3%	98.3%	99.7%	99.8%	97.7%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	84.3%	99.4%	99.7%	98.6%	99.8%	99.8%	99.8%
HF562712	99.8%	99.9%	99.9%	99.4%	98.8%	99.6%	99.6%	99.1%	98.8%	99.8%		99.4%	98.4%	99.8%	99.9%	97.8%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%	84.1%	99.5%	99.8%	98.7%	99.9%	99.9%	99.9%
HF562788	99.3%	99.6%	99.5%	99.1%	98.5%	99.2%	99.3%	98.7%	98.5%	99.3%	99.4%		98.1%	99.3%	99.5%	97.8%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	84.2%	99.1%	99.3%	98.3%	99.5%	99.6%	99.6%
HQ398883	98.3%	98.5%	98.5%	98.1%	97.5%	98.1%	98.2%	97.6%	97.6%	98.3%	98.4%	98.1%		98.3%	98.5%	97.0%	98.5%	98.4%	98.5%	98.5%	83.9%	98.3%	98.6%	97.9%	98.5%	98.5%	98.5%
HQ724616	99.7%	99.8%	99.8%	99.3%	98.7%	99.5%	99.6%	99.0%	98.7%	99.7%	99.8%	99.3%	98.3%		99.8%	97.7%	99.8%	99.9%	99.8%	99.8%	86.2%	99.4%	99.7%	98.5%	99.9%	99.8%	99.8%
JN592736	99.8%	100%	100%	99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.2%	98.9%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.8%		97.9%	100%	100%	100%	100%	84.2%	99.5%	99.8%	98.8%	100%	100%	100%
JN592749	97.7%	97.8%	97.9%	97.4%	96.8%	97.6%	97.5%	97.1%	97.9%	97.7%	97.8%	97.8%	97.0%	97.7%	97.9%		97.9%	97.9%	97.9%	97.9%	84.5%	97.7%	97.7%	97.0%	97.9%	97.7%	98.0%
JQ253844	99.8%	100%	100%	99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.1%	98.8%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.8%	100%	97.9%		100%	100%	100%	84.2%	99.5%	99.8%	98.9%	100%	100%	100%
JX040514	100%	100%	99.9%	100%	99.9%	100%	99.8%	100%	99.3%	99.8%	99.9%	99.5%	98.4%	99.9%	100%	97.9%	100%		100%	100%	86.1%	99.5%	99.8%	98.6%	100%	100%	100%
JX297287	99.8%	100%	100%	99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.1%	98.8%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.8%	100%	97.9%	100%	100%		100%	84.1%	99.5%	99.8%	98.9%	100%	100%	100%
JX297290	99.8%	100%	100%	99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.1%	98.8%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.8%	100%	97.9%	100%	100%	100%		84.1%	99.5%	99.8%	98.9%	100%	100%	100%
KC354820	84.0%	84.1%	86.2%	83.7%	83.2%	84.0%	84.1%	83.5%	83.8%	84.3%	84.1%	84.2%	83.9%	86.2%	84.2%	84.5%	84.2%	86.1%	84.1%	84.1%		84.5%	84.4%	83.7%	84.4%	84.3%	84.2%
KC970296	99.4%	99.5%	99.5%	99.0%	98.4%	99.2%	99.3%	98.7%	98.4%	99.4%	99.5%	99.1%	98.3%	99.4%	99.5%	97.7%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	84.5%		99.7%	98.3%	99.5%	99.5%	99.5%
KF919189	99.7%	99.8%	99.8%	99.3%	98.7%	99.5%	99.6%	99.0%	98.7%	99.7%	99.8%	99.3%	98.6%	99.7%	99.8%	97.7%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	84.4%	99.7%		98.6%	99.8%	99.8%	99.8%
KJ401308	98.6%	98.8%	98.7%	98.3%	97.7%	98.4%	98.5%	97.9%	97.9%	98.6%	98.7%	98.3%	97.9%	98.5%	98.8%	97.0%	98.9%	98.6%	98.9%	98.9%	83.7%	98.3%	98.6%		98.8%	98.9%	98.8%
KJ401309	99.8%	100%	100%	99.5%	98.9%	99.6%	99.7%	99.2%	98.9%	99.8%	99.9%	99.5%	98.5%	99.9%	100%	97.9%	100%	100%	100%	100%	84.4%	99.5%	99.8%	98.8%		100%	100%
TrERUCxpi01	99.8%	100%	100%	99.5%	99.2%	99.6%	99.7%	99.1%	98.8%	99.8%	99.9%	99.6%	98.5%	99.8%	100%	97.7%	100%	100%	100%	100%	84.3%	99.5%	99.8%	98.9%	100%		100%
TrERUCxpi02	100%	100%	100%	100%	99.9%	100%	99.7%	99.5%	99.2%	99.8%	99.9%	99.6%	98.5%	99.8%	100%	98.0%	100%	100%	100%	100%	84.2%	99.5%	99.8%	98.8%	100%	100%	

Tablo 4.5. Kayseri yöresi *Cx. pipiens* izolatları ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *Cx. pipiens* izolatların mt-COI gen dizilimlerinin ikili hizalama analizleri sonucu identiklik oranları

Kayseri yöresinden elde edilen *Cx. pipiens* izolatları ile Dünya'da GenBank'a kayıtlı benzer diğer bazı izolatların, parsiyel mt-COI gen bölgelerinin çoklu hizalamaları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

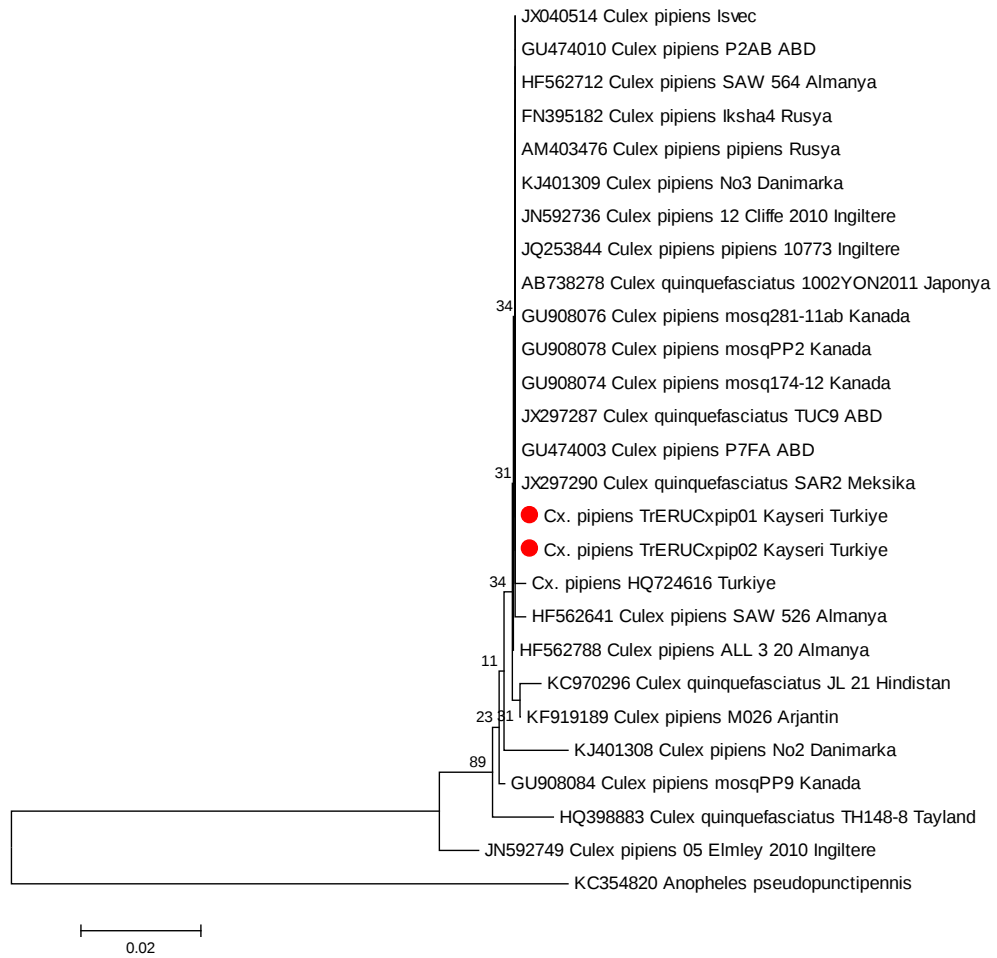
	1	10	20	30	40	50	60	70	80
1. AB738278						AACATTATATTTTATTTTGGG	CTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
2. AM403476							TTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
3. FN395182	TCGCGACAATGACTATTCCTACAAATCATAAAGATATTGGAACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC								
4. GU474003							TCGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
5. GU474010						ACGATTGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
6. GU908074							GNNNTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
7. GU908076							GGGGCTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
8. GU908078							GCNNNTTNNGCGNNATAGTTGGAAC		
9. GU908084							GCNNNTTNNGCTGGAATAATTGGAAC		
10. HF562641						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
11. HF562712						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
12. HF562788						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
13. HQ398883						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAATTGG	AC		
14. HQ724616	TCGCGACAATGACTATTCCTACAAATCATAAAGATATTGGAACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC								
15. JN592736						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
16. JN592749						AACATTATATTTTATTTTGGGCTTGAGCTGGAATAATTGGAAC			
17. JQ253844						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
18. JX040514							ATAGTTGGAAC		
19. JX297287						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
20. JX297290						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
21. KC354820	TGAATTATTCTACAAATCATAAGGATATTGGAACCTTATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGG	AC							
22. KC970296						AACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
23. KF919189						ACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
24. KJ401308						AGATATTGGAACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAATTGG	AC		
25. KJ401309						ATTGGAACATTATATTTTATTTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC			
26. TrERUCxip01							TTTGGGGCTTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
27. TrERUCxip02							TTGAGCTGGAATAGTTGGAAC		
	90	100	110	120	130	140	150	160	170
1. AB738278	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
2. AM403476	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
3. FN395182	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
4. GU474003	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
5. GU474010	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
6. GU908074	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
7. GU908076	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
8. GU908078	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
9. GU908084	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
10. HF562641	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
11. HF562712	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
12. HF562788	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
13. HQ398883	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATGATGTTATTGTAAC	CTG							
14. HQ724616	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
15. JN592736	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
16. JN592749	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
17. JQ253844	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
18. JX040514	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
19. JX297287	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
20. JX297290	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
21. KC354820	CTCTCTAGATTCTAATTCGAGCAGAATTAGGCCACCCAGGAGCTTTCTTGGAGATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	AG							
22. KC970296	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
23. KF919189	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
24. KJ401308	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
25. KJ401309	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
26. TrERUCxip01	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							
27. TrERUCxip02	TTCTTTAAGTTTACTAATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCAGGTGATTTTATTTGGAAATGATCAAAATTTATAATGTTATTGTAAC	CTG							

	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1. AB738278	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
2. AM403476	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
3. FN395182	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
4. GU474003	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
5. GU474010	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
6. GU908074	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
7. GU908076	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
8. GU908078	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
9. GU908084	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
10. HF562641	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
11. HF562712	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
12. HF562788	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
13. HQ398883	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
14. HQ724616	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
15. JN592736	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
16. JN592749	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
17. JQ253844	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
18. JX040514	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
19. JX297287	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
20. JX297290	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
21. KC354820	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
22. KC970296	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
23. KF919189	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
24. KJ401308	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
25. KJ401309	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
26. TrERUCxpi01	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
27. TrERUCxpi02	GGAATTACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACTGCAGTTTTATTACTTCTTTCTTTACCTGTTTTAGC								
	610	620	630	640	650	660	670	680	
1. AB738278	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
2. AM403476	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGG								
3. FN395182	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
4. GU474003	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
5. GU474010	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
6. GU908074	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
7. GU908076	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
8. GU908078	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
9. GU908084	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
10. HF562641	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
11. HF562712	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
12. HF562788	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
13. HQ398883	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
14. HQ724616	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
15. JN592736	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
16. JN592749	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
17. JQ253844	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
18. JX040514	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
19. JX297287	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
20. JX297290	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
21. KC354820	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
22. KC970296	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
23. KF919189	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
24. KJ401308	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
25. KJ401309	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATC								
26. TrERUCxpi01	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAG								
27. TrERUCxpi02	TGGTGCATTACTATGTTATTAAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGATCCAATTGGAGGAGGAG								

Şekil 4.10. Kayseri yöresinde belirlenen *Cx. pipiens* izolatları ile Dünyadaki diğer bazı *Cx. pipiens* izolatlarının parsiyel mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin hizalamaları

Çalışmada Kayseri yöresinden toplanmış ve parsiyel mt-COI nükleotid sekansları ortaya belirlenmiş olan TrERUCxpi01 ve TrERUCxpi02 izolatlarının pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.5). Ayrıca *Cx. pipiens* Kayseri

izolatlarının Dünyanın farklı bölgelerinden GenBank'a kayıtlı diğer *Cx. pipiens* izolatlarıyla ortalama $0,3 \pm 0,1$ genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Kayseri *Cx. pipiens* TrERUCxpip01 ve TrERUCxpip02 izolatları Rusya (FN395182, AM403476), İsveç (JX040514), Danimarka (KJ401309), İngiltere (JN592736, JQ253844), Amerika Birleşik Devletleri (JX297287) ve Meksika'dan (JX297290) izole edilmiş *Cx. pipiens* kompleks izolatlarıyla %100,0 identik bulunurken Tablo 4.5'de gösterilen Dünyanın farklı bölgelerinden izole edilmiş diğer izolatlarla ise %0,1-2,3 genetik farklılık göstermiştir (Şekil 4.10). Bu sonuçlarla Neighbor Joining Metodu (K.mura Two Parameter, Bootstrap 1000) ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4.11) görüleceği üzere *Cx. pipiens* Kayseri izolatları mt-COI gen bölgesine göre identik oldukları diğer izolatlarla birlikte aynı filogenetik branşta yer almış ve dolayısıyla aynı genotipte oldukları belirlenmiştir.



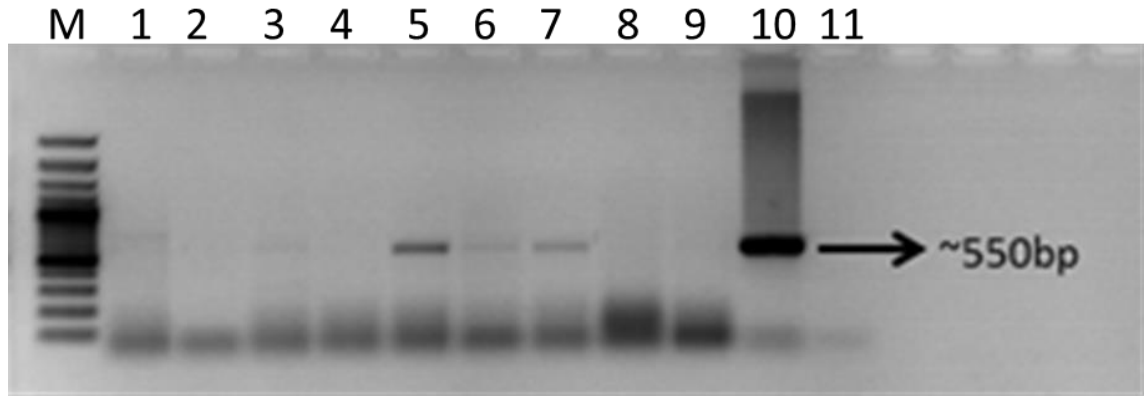
Şekil 4.11. Kayseri yöresinden izole edilen *Cx. pipiens* izolatları ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Kimura Two Parameter modeli, Bootstrap:1000). ● : Kayseri izolatları; Dış grup olarak *Anopheles pseudopunctipennis* (KC354820) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir

4.4. Ergin dişi *Cx. pipiens* Türlerinin Kan Beslenmesinde Konak Spekturumu ve Türleri

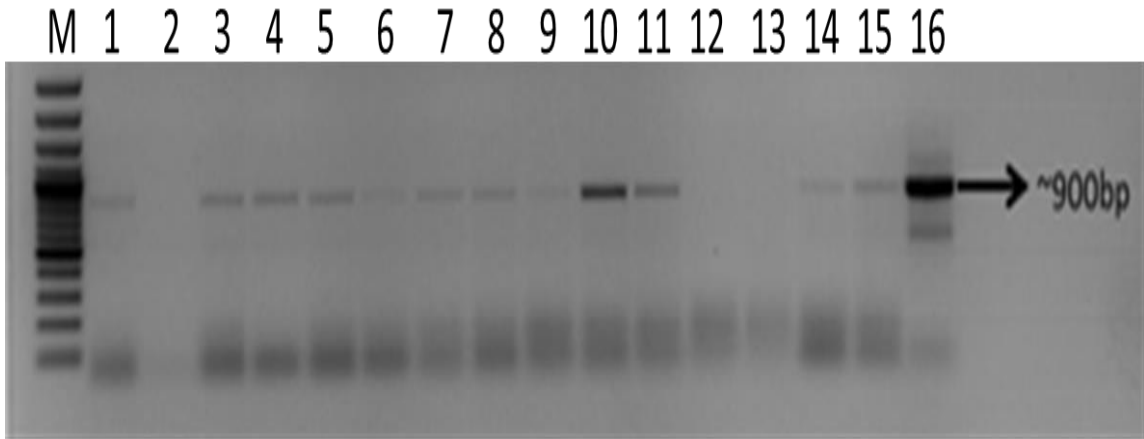
Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinden bireysel olarak elde edilen genomik DNA ekstraktlarının mitokondrial cyt b gen bölgesinden dizayn edilen kanatlı ve memeli spesifik primerler ile moleküler analiz sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir. Tablo 4.6’da görüleceği üzere incelemesi yapılan toplam 376 örneğin 148’i (%39,4) kanatlı ve/veya memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin toplam 43’ü yalnızca memeli, 98’i yalnızca kanatlı, 7’si ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Beslenme eğilimlerinin istatistiksel analizinde *Cx. pipiens* için kanatlı tercihi önemli bulunmuştur ($\chi^2=40,970$, $p<0,05$). Mitokondrial cyt b gen bölgesi için kanatlı ve memeli kanı pozitif belirlenen bazı izolatların agaroz jel üzerinde görünüşleri sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4.6. Bireysel olarak incelenen ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinin memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitiflikleri

İncelenen dişi simuliid sayısı	Konak kanı yönünden pozitiflik							
	Kanatlı		Memeli		Kanatlı+Memeli		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
376	98	26,1	43	11,4	7	1,9	148	39,4



Şekil 4.12. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinde kanatlı mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu elde edilen bazı ampikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,3,5,6,7: Pozitif örnekler, 10: Pozitif kontrol (Kanatlı DNA’sı); 11: No DNA



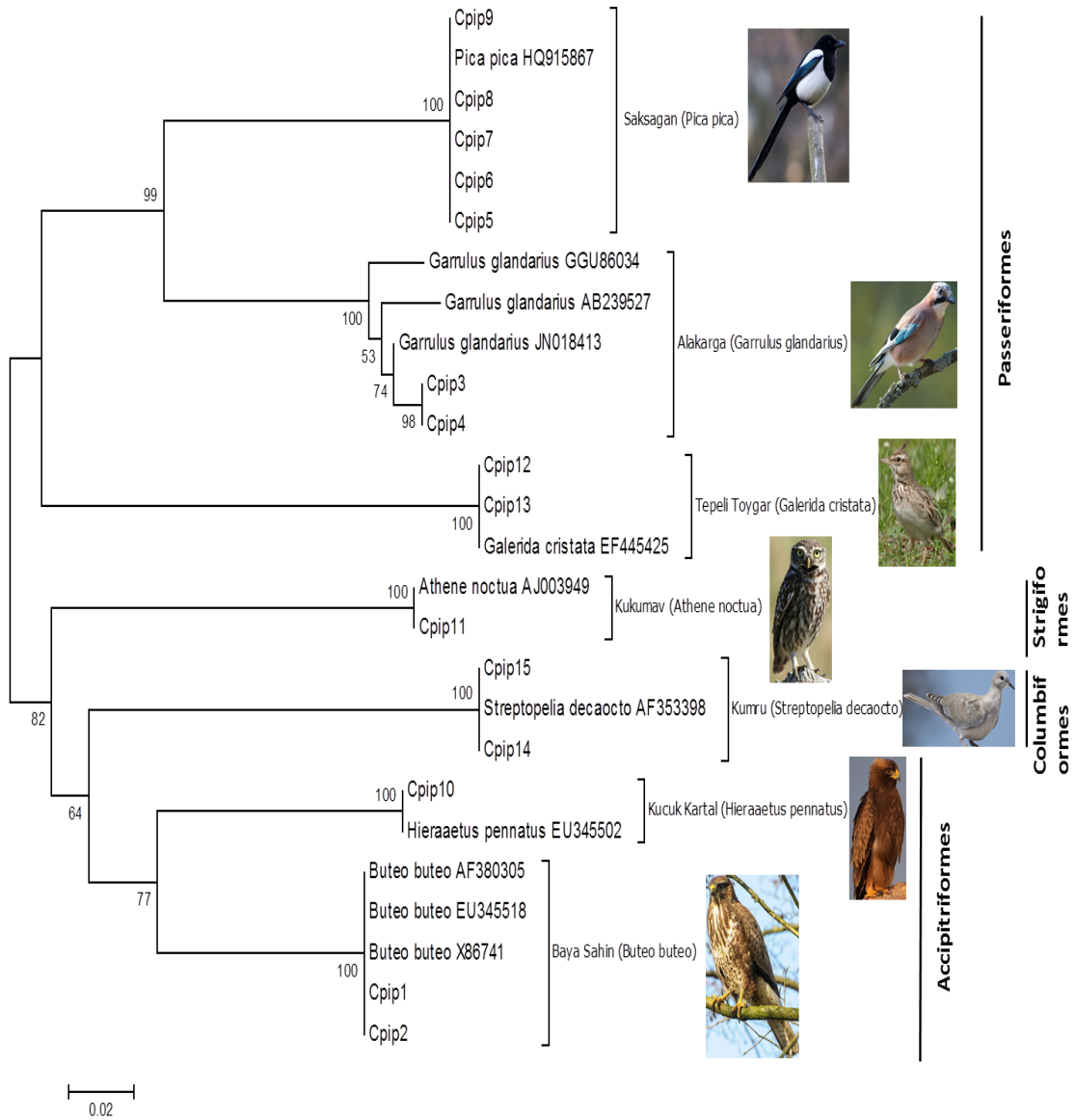
Şekil 4.13. Ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinde memeli mt-cyt b gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerler ile amplifikasyon sonucunun jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,3-11,14,15: Pozitif örnekler, 2: No DNA; 16: Pozitif kontrol (sığır DNA'sı)

Konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden kanatlı için 15, memeli için de 15 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 konak türlerinin dağılımı Tablo 4.7'de verilmiştir. Konak türü belirlenen izolatların ayrıca mt-cyt b gen bölgesine göre filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri kanatlı için Şekil 4.14, memeli için de Şekil 4.15'de verilmiştir. Tablo 4.7'de görüleceği üzere sekans analizi yapılan kanatlı konak kanı pozitif 15 dişi *Cx. pipiens* izolatından 9'unun Passeriformes takımında, 3'ünün Accipitriformes, 2'sinin Columbiformes ve birinin de Strigiformes takımında yer alan kanatlı türlerinden kan emdiği belirlenmiştir. Passeriformes takımında belirlenen izolatların 2'sinin Alakarga (*Garrulus glandarius*), 5'inin Saksığan (*Pica pica*), 2'sinin de Tepeli toygar (*Galerida cristata*) türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Accipitriformes takımında belirlenen izolatların 2'sinin Baya şahin (*Buteo buteo*), birinin de Küçük kartal (*Hieraaetus pennatus*), Columbiformes takımındakilerin ikisinin de Kumru (*Streptopelia decaocto*), Strigiformes takımında belirlenen tek izolatın da Kukumav (*Athene noctua*) türlerine ait olduğu moleküler olarak ortaya konmuştur.

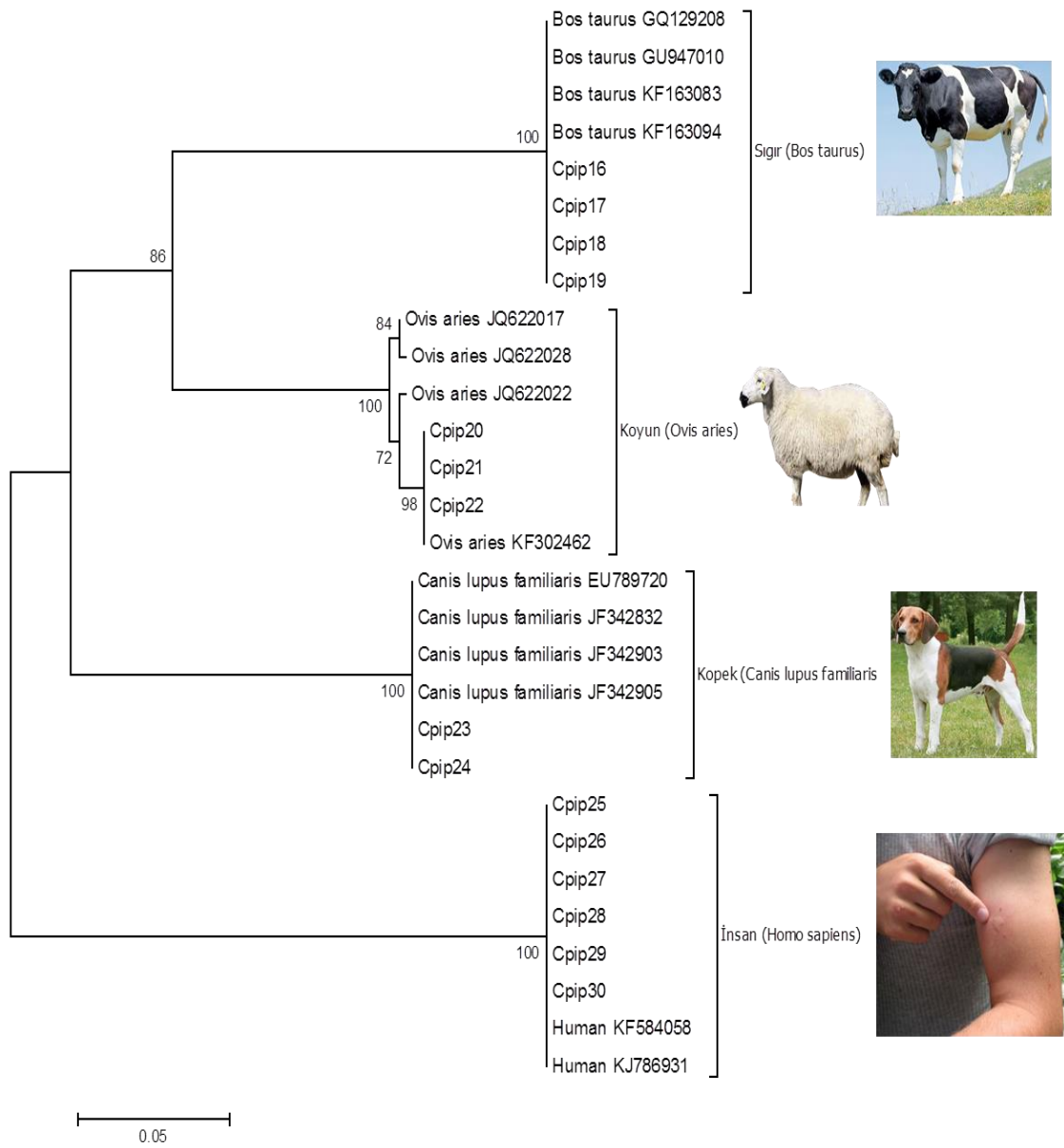
Sekans analizi yapılan memeli konak kanı pozitif 15 dişi *Cx. pipiens* izolatından 6'sı insan (*Homo sapiens*), 4'ü sığır (*Bos taurus*), 3'ü koyun (*Ovis aries*), 2'si de köpek (*Canis lupus familiaris*) kanı pozitif belirlenmiştir.

Tablo 4.7. Memeli ve kanatlı kanı yönünden pozitif belirlenen ve klonlama sonrası sekans ve genetik analizlerle konak türü belirlenen örneklerin konak tür dağılımları

	Klonlanan İzolat Sayısı	Konak türü		İdentifiye Edilen Örnek Sayısı
KANATLI	15	Takım	Tür	
		Passeriformes	Alakarga (<i>Garrulus glandarius</i>)	2
			Saksağan (<i>Pica pica</i>)	5
			Tepeli toygar (<i>Galerida cristata</i>)	2
		Accipitriformes	Baya şahin (<i>Buteo buteo</i>)	2
			Küçük kartal (<i>Hieraaetus pennatus</i>)	1
		Columbiformes	Kumru (<i>Streptopelia decaocto</i>)	2
		Strigiformes	Kukumav (<i>Athene noctua</i>)	1
MEMELİ	15	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)		6
		Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)		2
		Koyun (<i>Ovis aries</i>)		3
		Sığır (<i>Bos taurus</i>)		4



Şekil 4.14. Kanatlı konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri



Şekil 4.15. Memeli konak türü belirlenen izolatların mt-cyt b gen bölgesine göre referans izolatlarla filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yeryüzünde teşhisi yapılan ve sistematikteki yeri belirlenen canlıların % 80'den fazlasını artropoda teşkil eder. Artropoda anacının en büyük sınıfını oluşturan *Insecta* ise yeryüzünde bilinen canlıların % 50'den (~900.000 tür) fazlasını oluşturur. İnsektler, ekosistemin fonksiyonlarında özellikle bitkilerin tozlaşmasında kritik manada polenatör olarak anahtar rollere sahiptirler. Öte yandan pek çok tür, bizzat kendisi parazit olmanın yanında çok sayıda çeşitli patojeni bitki, hayvan ve insanlara vektör olarak naklederler. Bunlar arasında Diptera dizisi Nematocera dizi bölümüne bağlı *Culicidae* ailesi önemli bir yer tutmakta ve bu ailede 3.500'ü aşkın sivrisinek türü bulunmaktadır.

Culicidae ailesinde yer alan *Culex* soyu en geniş gruplardan birini oluşturmakta olup 26 soy altında 768 türü içermektedir (91). *Culex* alt soyunda 198 tür bulunmakta olup bunlardan çoğu filariasis'e yol açan nematodlara (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* vd.) (92,93) ve çeşitli arboviruslara (94,95) vektörlük yapabilmektedir. Kuzeydoğu Brezilya'da *W. bancrofti*'nin primer vektörü *Cx. quinquefasciatus* olarak bildirilirken (92), *Cx. coronator* ve *Cx. declarator* türleri Saint Louis encephalitis virusunun (SLEV) potansiyel vektörleri olarak kaydedilmiştir (96). Arjantin'de *Cx. quinquefasciatus* ve *Cx. interfor* SLEV'in sırasıyla primer ve sekonder vektörleri olduğu belirtilmiştir (97). Venezuela equine encephalitis virus kompleksde bulunan Rio Negro virüsü, *Cx. coronator* ve *Cx. maxi*'den izole edilmiştir (98). *Culex* soyundaki türlerin ayrıca Kuzey

Amerika’da West Nile virüsünün vektörü olduğu belirtilmiştir (99). Türkiye’de günümüze kadar sivrisinek türleri üzerine yapılan çalışmaların daha çok morfolojik identifikasyonlara dayalı prevalans çalışmaları olduğu görülmekte olup moleküler tabanlı çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda hedef tür kompleksi olarak belirlediğimiz *Cx. pipiens*’in İstanbul (100), Adana (101,102), Ankara (103,104), Antalya (105,106), İçel (107), Muğla (108), Şanlıurfa (109), Kars (110) ve Kayseri (80,111) yörelerinde farklı prevalanslarda yaygınlık gösterdiği kaydedilmiştir. *Cx. pipiens* ve naklettikleri patojenler üzerine yapılan sınırlı sayıdaki moleküler çalışmalarda ise Bişkin ve ark. (112), Kayseri’nin Felahiye yöresinden topladıkları sivrisinek örneklerinde tür teşhislerini takiben enfektif ve enfekte sivrisinek türlerin belirlenebilmesi için her bir örneğin baş-toraks ve abdomeni diseke edilerek, tür ve toplama bölgesine göre gruplanmış toplam 54 adet havuzdan genomik DNA ekstrakte edilmiş ve *D. immitis* spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmiştir. Çalışmada (112) toplam 54 havuzdan *Ae. vexans*’ların baş-gövde ve karınlarından oluşan iki havuzda *D. immitis* DNA’ları saptanmış, yörede gözlenen minimum enfeksiyon oranı (MIRs) % 0,33 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada (112) *Ae.vexans*’lardan oluşturulan 20 havuzda MIRs %1,04 olarak saptanmış, *Cx. pipiens*’lerden oluşturulan 34 havuzda ise *D. immitis* DNA’larına rastlanılmadığı kaydedilmiştir. Yıldırım ve ark. (80), Kayseri yöresinde topladıkları sivrisineklerin tür teşhislerinden sonra oluşturulan 1198 havuzdan (599 baş+toraks, 599 abdomen) genomik DNA ekstraksiyonunu takiben *D. immitis* spesifik primerler ile PCR analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada (80) iki sezon boyunca incelenen 6153 adet dişi sivrisinekte *D. immitis* ile minimum enfeksiyon oranı (MIRs) 0,26 belirlenmiş, *D. immitis* DNA’larına yalnızca *Ae. vexans* ve *Cx. pipiens* türlerinden oluşan havuzlarda rastlanmış, *Ae. vexans* için MIRs 0,41, *Cx. pipiens* için ise 0,12 olarak belirlenmiştir. İnci ve ark., (113), aynı sivrisinek havuzları üzerinde yürüttükleri çalışmada kanatlı haemosporidian protozoonlarını (*Plasmodium*, *Haemoproteus*) Nested-PCR ile araştırmışlar, elde ettikleri izolatların mitokondrial cyt-b gen bölgelerini sekanslayarak filogenetik olarak karakterize etmişlerdir. Çalışmada (113) incelemesi yapılan toplam 1198 genomik DNA havuzunun 128’inde (59 baş+toraks, 69 abdomen) (%10,7) nested PCR analizi ile de pozitiflik saptanmış, incelenen 6153 adet dişi sivrisinekte avian haemosporidianları ile minimum enfeksiyon oranı (MIRs) 1,12 olarak belirlenmiştir. MIRs, *Ae. vexans* için 0,60, *Cx. pipiens* için 2,09, *Cx. theileri* için 1,04, *Cs. annulata* için de 1,06 saptanmıştır. Ayrıca çalışmada

(113) sekans analizi gerçekleştirilen pozitif 13 izolatın GenBank kayıtları gerçekleştirilmiş (HQ677623-24, JF411401-8, JF430404-6), blastn analizleri sonucu 11 baş/thoraks pozitif havuzundan elde edilen DNA dizilerinin *Plasmodium* sp., 2 abdomen havuzundan elde edilen DNA dizilerinin ise *Haemoproteus* sp. olduğu belirlenmiştir. Çalışmada (113) filogenetik analiz sonucunda *Plasmodium* soyundaki 11 izolatın 4 ana filogenik grupta, *Haemoproteus* soyundaki 2 izolatın ise tek filogenik grupta yerleştiği ortaya konmuştur. Çalışmamızda hedef tür kompleksi olarak belirlediğimiz *Cx. pipiens* örnekleri “Dirofilaria immitis’in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi” isimli ve 107O533 kodlu TÜBİTAK araştırma projesi kapsamında Kayseri yöresinden 2008 ve 2009 sezonlarında farklı 46 odaktan toplanmış olan sivrisinek örnekleri arasından identifiye edilmiştir. İdentifikasyona tabii tutulan toplam 1284 ergin dişi sivrisinekten 376’sı (%29,3) *Cx. pipiens* olarak teşhis edilmiş ve tüm örneklerde ergin *Cx. pipiens* dişilerinin morfolojik özellikleri saptanmıştır.

Culex soyunda mevcut alt soy klasifikasyonu dişi ve erkeklerin morfolojik özelliklerine göre yapılmaktadır (114, 115). *Culex* soy altındaki türler altı gruba, çeşitli alt gruplara ve tür komplekslerine bölünmektedir (91). Neotropikal türler Coronator ve Pipiens gruplarında yer almaktadır (91). Erkek genital organlarının özellikleri genellikle türlerin yeterli identifikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bunun yanında dişilerin eksternal morfolojik özellikleri de identifikasyonda kullanılmaktadır. Ancak dişilerin morfolojik karakterlerinin polimorfik özellik gösterebilmesi ve/veya farklı türler arasında benzerlik gösterebilmesi sebebiyle mevcut çoğu teşhis anahtarları dikkatli kullanılmalıdır. Bilinmeyen tür komplekslerinin varlığı da ayrıca identifikasyonu zorlaştırmaktadır. Mevcut çalışmada da morfolojik identifikasyonlardaki söz konusu zorluklar ve yalnızca dişilerin incelenmesi sebebiyle tür teşhisleri *Cx. pipiens* kompleks olarak yapılmış tür isimleri *Cx. pipiens* olarak alınmıştır. Tür teşhisleri ayrıca moleküler ve sekans analizleri ile konfirme edilmiştir. Nitekim DNA sekans teknolojisi günümüze tür identifikasyonlarında ve moleküler taksonomide (116-119), Culicidae gruplarının içinde veya arasındaki filogenetik ilişkinin gösterilmesinde (120-122) ve vektör tür popülasyonlarının genetik yapısının belirlenmesinde (123) yaygın olarak kullanılmaktadır. Mitokondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) geni takson ve tür barkodlamasında ve filogenetik karakterizasyon ve ilişkilerin belirlenmesinde yaygın

kullanılan gen bölgelerinin başında gelmektedir (86,124,125). Sivrisinek türlerinin identifikasyonu amacıyla örneğin Kanada (126), Hindistan (95), Çin (127), Brezilya ve Arjantin'den (125) örneklenen sivrisineklerde ve *Anopheles* soyunun *Nyssorhynchus* soy altındaki tür komplekslerinin ortaya konması (118,119,128) gibi çeşitli çalışmalarda COI barkod sekansları kullanılmıştır. COI geninin parsiyel sekansları da ayrıca sivrisineklerde tür komplekslerinin onaylanmasında (129, 130), *Anopheles darlingi* Root'da filogenetik paternlerin ortaya konmasında (131) ve Brezilya'nın çeşitli ekobölgelerinde *An. darlingi* ile *An. triannulatus* popülasyonlarının filocoğrafik paternlerinin kıyaslanmasında kullanılmıştır (132). Hebert ve ark. (133), tğr komplekslerinin varlığını belirlemek için ortalama interspesifik genetik farklılığın ortalama intraspesifik genetik farklılıktan en az 10 kat yüksek olması gerektiğini kaydetmişlerdir. COI genindeki intra ve interspesifik varyasyon paternlerinin çeşitli hayvan gruplarında benzer olduğu kaydedilmekle (133) birlikte Ruiz-Lopez ve ark. (128), ortalama intraspesifik Kimura two-parameter (K2P) uzaklığını sivrisinekler için %0,2-1,4 ve ortalama interspesifik varyasyonu %2-5,6 arasında olması gerektiğini önermişlerdir. Mevcut çalışmada da tür teşhisleri yapılan *Cx. pipiens* örneklerinden seçilen bazı izolatların parsiyel mt-COI geni amplifiye edilmiş ve jel üzerinde 709 bp büyüklüğünde ampikonlar belirlenmiştir. Bu ampikonlardan uygun konsantrasyonda olan ikisi jel pürifiye edildikten sonra PCR primerleri ile sekans analizlerine tabii tutulmuş ve yaklaşık 600bp uzunlukta nükleotid sekansları elde edilmiştir. TrERUCxpip01 ve TrERUCxpip02 olarak isimlendirilen izolatların GenBank kayıtları sağlanmış (KJ188203, KJ188204) ve tür identifikasyonları moleküler olarak konfirme edilmiştir. Bu çalışma Türkiye'de *Cx. pipiens* kompleks türlerinin mt-COI gen bölgesine göre karakterizasyonlarının yapıldığı ilk çalışmadır. Bununla birlikte GenBank kayıtlarında Fransız araştırmacılar tarafından *Cx. pipiens*'e ait Türkiye'den de bir izolatın (Genbank aksesyon: HQ724616) dahil olduğu mitokondrial genom çalışmasının yapıldığı görülmektedir. Bu noktada araştırmacı grubunda herhangi bir Türk araştırmacının bulunmaması ile Türkiye'nin biyolojik varlıklarının yabancı bilim insanları tarafından kullanılmış olması çeşitli soru işaretlerini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda TrERUCxpip01 ve TrERUCxpip02 izolatlarının pairwise analizleri sonucu %100,0 identik oldukları ve dünyanın farklı bölgelerinden GenBank'a kayıtlı diğer *Cx. pipiens* izolatlarıyla ortalama %0,3±0,1 genetik farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Kayseri *Cx. pipiens* TrERUCxpip01 ve TrERUCxpip02 izolatları Rusya (FN395182,

AM403476), İsveç (JX040514), Danimarka (KJ401309), İngiltere (JN592736, JQ253844), Amerika Birleşik Devletleri (JX297287) ve Meksika'dan (JX297290) izole edilmiş *Cx. pipiens* kompleks izolatlarıyla %100,0 identik bulunurken Dünyanın farklı bölgelerinden izole edilmiş diğer izolatlarla ise %0,1-2,3 genetik farklılık göstermiştir. İntra ve interspesifik varyasyonlar göz önüne alındığında elde edilen sonuçlar Ruiz-Lopez ve ark.nın (128) öngörülerine paralel bulunmuştur.

Sivrisinek türlerinin vektörlük potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda vektör etkinliği üzerine coğrafik alan, ekolojik faktörler ve sivrisineklerin konak tercihlerinin önemli olduğu bilinmektedir (74,76, 134). Bir bölgede vektörlük potansiyeli belirlenen bir sivrisinek türünün diğer bazı bölgelerde vektör etkinliğinin düşük olduğu veya hiç olmadığı görülmektedir. Kan ile beslenen (haematophagous) artropodların beslenme yapıları ve konak tercihleri, bir çok patojenin çoğalması ve omurgalı konaklara bulaşması açısından oldukça önemlidir (36,37). 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 (36). Kosmopolit bir yayılışa sahip olan ve Kuzey Ev Sivrisineği olarak da bilinen *Cx. pipiens* insan ve hayvan sağlığını etkileyen çeşitli patojenlerin önemli bir vektörü olarak nitelenmektedir (2). *Cx. pipiens* kompleks türlerinin kan beslenmesinde konak tercihleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Munoz ve ark. (37), İspanya'nın çeşitli bölgelerinden topladıkları 65 adet *Cx. pipiens* örneğinden 43'ünü konak kanı yönünden pozitif belirlemişler, mt-COI sekans analizleriyle konak tür dağılımını memeli grubunda köpek (*Canis lupus familiaris*) %14,3, kedi (*Felis catus*) 21,4 ve İnsan (*Homo sapiens*) %35,7; kanatlı grubunda ise tahtalı güvercin (*Columba palumbus*) %4,8, tavuk (*Gallus gallus*) %2,4, yeşil paraket (*Myiopsitta monachus*), bayağı serçe (*Passer domesticus*) %4,8, kumru (*Streptopelia decaocto*) %2,4 ve karataş (*Turdus merula*) %4,8 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar (37), çalışma sahasında (Barselona) *Cx. pipiens*'in kan beslenme paterninde kanatlı konak tercihini memeli grubuna oranla daha düşük belirlemişler ve neticede West Nile Virus (WNV) naklinde ve çoğalmasında önemli olan kanatlıların konak olarak düşük düzeyde bulunması ile bu viral hastalığın dünyanın diğer bölgelerine göre çalışma sahasında daha az risk taşıyabileceğini öne sürmüşlerdir.

Nitekim kanatlılardan daha yoğun olarak beslenen sivrisinek popülasyonları, insan ve diğer memelilerin sivrisinekleri enfekte etmek için yeterli viremiyi gösterememesi sebebiyle WNV'nin çoğalması için daha yüksek kapasiteye sahiptirler (135). *Cx. pipiens* Kuzey Amerika'da WNV'nin önemli enzootik vektörü ve Avrupa'daki WNV salgınlarında esas ana vektör olarak belirlenmiştir (136, 137). Amerika (8) ve Avrupa'da (138,139) yapılan çeşitli araştırmalarda *Cx. pipiens*'in kan beslenmesinde kanatlı konak spekturumu %64-97 oranında belirlenmiş ve memeli konaklara göre kan beslenmesinde kanatlı konak tercihleri önemli bulunmuştur. Garcia-Rejon ve ark (140), Meksika'da *Cx. pipiens* tür kompleksi içerisinde yer alan *Cx. quinquefasciatus*'un kan beslenmesinde konak eğilimi ve spekturumu üzerine yaptıkları moleküler tabanlı çalışmada toplam 658 doymuş dişi örneğin %82'sini kanatlı, %18'ini ise memeli kanı pozitif belirlemişler, en sık omurgalı konakları Galliformes (47,1%), Passeriformes (%23,8), Columbiformes (%11,2) kuşları ve (%8,8) olarak belirlemişlerdir. Bruno Gomes ve ark (141), Portekiz'de örnekledikleri *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* alt türlerinin kan beslenmesinde serolojik yöntemlerle kanatlı tercihinin %90'ın üzerinde belirlemişlerdir ve bu kanatlıların büyük çoğunluğunun Passeriformes takımında yer aldığını saptamışlardır. Çalışmamızda ergin dişi *Cx. pipiens* örneklerinden bireysel olarak elde edilen genomik DNA ekstraktlarının mitokondrial cyt b gen bölgesinden dizayn edilen kanatlı ve memeli spesifik primerler ile moleküler analizi sonucunda incelemesi yapılan toplam 376 örneğin 148'i (%39,4) kanatlı ve/veya memeli kanı yönünden pozitif bulunmuştur. Pozitif belirlenen örneklerin %29,1'i yalnızca memeli, %66,2'si yalnızca kanatlı, %4,7'si ise hem kanatlı hem de memeli kanı yönünden pozitif belirlenmiş olup beslenme eğilimlerinin istatistiksel analizinde *Cx. pipiens* için kanatlı tercihi önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuç çeşitli araştırmacıların bulguları (138-141) ile paralellik göstermiştir. Konak kanı yönünden pozitif belirlenen örneklerden kanatlı için 15, memeli için de 15 izolat klonlandıktan sonra konak türü tayini için elde edilen plasmidler sekans analizine tabii tutulmuş ve konak türü identifikasyonları yapılmıştır. Kanatlı konak kanı pozitif 15 dişi *Cx. pipiens* izolatından 9'unun Passeriformes takımında, 3'ünün Accipitriformes, 2'sinin Columbiformes ve birinin de Strigiformes takımında yer alan kanatlı türlerinden kan emdiği belirlenmiştir. Passeriformes takımında belirlenen izolatların 2'sinin Alakarga (*Garrulus glandarius*), 5'inin Saksagan (*Pica pica*), 2'sinin de Tepeli toygar (*Galerida cristata*) türlerine ait olduğu, Accipitriformes takımında belirlenen izolatların

2'sinin Baya şahin (*Buteo buteo*), birinin de Küçük kartal (*Hieraaetus pennatus*), Columbiformes takımındakilerin ikisinin de Kumru (*Streptopelia decaocto*), Strigiformes takımında belirlenen tek izolatın da Kukumav (*Athene noctua*) türlerine ait olduğu moleküler olarak ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar *Cx. pipiens*'in kan beslenmesinde Passerin kuşların önemli olduğunu göstermiş olup ayrıca Bruno Gomes ve ark.nın (141) bulgularıyla da benzerlik göstermiştir. Sekans analizi yapılan memeli konak kanı pozitif 15 dişi *Cx. pipiens* izolatından ise 6'sı insan (*Homo sapiens*), 4'ü sığır (*Bos taurus*), 3'ü koyun (*Ovis aries*), 2'si de köpek (*Canis lupus familiaris*) kanı pozitif belirlenmiştir. Çalışmada insan kanı pozitifliği diğer memelilere oranla yüksek bulunmuş olup bu sonuç da Munoz ve ark.nın (37) bulgularıyla paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez *Cx. pipiens* tür kompleksi üzerine morfolojik ve moleküler analizler bir arada kullanılarak karakterizasyon, filogeni ve kan beslenmesinde konak tercihi ve spektrumunun belirlenmesi üzerine bilimsel veriler elde edilmiştir. Çalışmayla araştırma yöresinde belirlenen *Cx. pipiens* izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre karakterizasyonları yapılarak filogenileri ortaya konmuş ve GenBank kayıtları gerçekleştirilerek yöresel izolatlar kayıt altına alınmıştır. Mevcut çalışma, Türkiye'de çeşitli sivrisinek türlerinin epidemiyolojisi ile yaygın tür ve/veya alttürlerin sitogenetiği ve genotiplerinin ortaya konması üzerine yapılacak çalışmalara model olma niteliğindedir. Çalışma ile ayrıca söz konusu tür kompleksinin kan beslenmesinde konak eğilimleri ve konak türleri moleküler olarak saptanmış ve bu türlerin hem kanatlı ve hem de memeli türlerinden beslenebilmesinin yanında kanatlı tercihinin daha önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar da araştırma bölgesinde özellikle Rift Valley fever, Sindbis virüs, St. Louis encephalitis ve West Nile Fever gibi viral enfeksiyonların yanında filariosis, dirofilariosis ve avian malaria gibi birçok paraziter enfeksiyonun nakli açısından söz konusu tür kompleksinin yüksek risk potansiyeli taşıdığını ortaya çıkarmıştır. Elde edilen sonuçlar, Türkiye'de *Cx. pipiens* tür kompleksi ve naklettikleri patojenler üzerine kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç olduğunu da ortaya çıkarmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Kettle DS, Medical and Veterinary Entomology (2nd ed) CAB International, Wallingford, UK, 1995.
2. Becker N, Petric D, Zgomba M et al. Mosquitoes and Their Control. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2003.
3. Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ et al. Entomol 2001; 38: 130.
4. Foncesa DM, Nusha Keyghobadi, Colin A et al. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* complex, 2004.
5. Kilpatrick A M, LD Kramer, S Campbell, EO Alleyne et al. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. Emerg Infect Dis 2005; 11: 425-429.
6. Hamer G.L, UD Kitron, JD Brawn et al. *Culex pipens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. J Med Entomol 2008; 45: 125-128.
7. Kilpatrick AM, Kramer MJ, Jones MJ et al. Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. Am J Trop Med Hyg 2007; 77:667-671.
8. Gomez Diaz E, and Fiquerola J. New perspectives in tracing vector- borne interaction networks. Trends Parasitol 2010; 26:470-476.
9. Knight KL, Stone A. A catalog of the mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). (2nd ed) Maryland: The Entomological Society of America 1977.
10. Knight KL. Supplement to "A catalog of the mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae). The Entomological Society of America, Maryland 1978.
11. Ward RA. Second supplement to "A catalog of the mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 1984; 16: 227-70.
12. Ward RA. Third supplement to "A catalog of the mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 1992; 24: 177-230.

13. Gaffigan TV, Ward RA. Index to the second supplement to “A catalog of the mosquitoes of the World” (Diptera: Culicidae), with corrections and additions. Mosquito Systematics 1985; 17: 52-63.
14. Edwards FW. Genera Insectorum Diptera, Family Culicidae. Belgium: Desmet-Verten 1932; 194.
15. Belkin J. The mosquitoes of the South Pasific (Diptera: Culicidae). University of California Press, Los Angeles 1962.
16. Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomology 1998; 23: 327-70.
17. Reinert JF. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of *Culicidae* (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. J Am Mosq Control Assoc 2001; 17:1, 51-5.
18. Vinogradova EB. *Culex pipiens* mosquito: Taxonomy, distribution, egology, physiology, genetics, applied importance and control. In: Golovatch SI , editor. Sofia, Bulgaria: pensoft Publishers 2000; pp:1-250. Vector Borne Dis 50 2013; pp:
19. Dehghan H, Sadraei J, Moosa-Kazemi SH. The molecular and morphological variations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Iran. 2013.
20. Knight KL, Malek AA. A morphological and biological study of *Culex pipiens* in the Cairo area of Egypt. Sot Fouad Ent Bull 1951; 35: 175-85.
21. Sirivanakarn S, White GG. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Proc Ent Soc 1978; 80: 360-72.
22. Miles SJ. Laboratory evidences of mate recognition behavior in member of the *Culex pipiens* complex (Diptera:Culicidae). Aust J zool 1977; 25: 491-8.
23. Jupp PG. *Culex* (*Culex*) *pipiens pipiens* Linnaeus and *Culex* (*Culex*) *pipiens quinquefasciatus* Say in South Africa: Morphological and reproductive evidence in favor of their status as two species. MOsq Sys 1978; 10: 461-73.
24. Smith JL, Foncesa DM. Rapid assats for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex , their hybrids, and other sibling species (Diptera:Culicidae). Am J Trop Med Hyg 2004; 70: 339-45.
25. Sasa M, Shirasaka A, Wada Y, Kanda T. Comparative studies on some morphological and physiological characters of the *Culex pipiens* complex of japan and southern Asia. Jap J Exp Med 1967; 37: 475-9.

26. Harbach RE: pictorial keys to the genera of mosquitoes, subgenera of *Culex* and the speices of *Culex* (*Culex*) occurring southwestern Asia and Egypt, with a note on the sub generic placemet of *Culex deserticola* (Diptera:Culicidae). Mosq Sys 1985; 17: 83-107.
27. Choochote W. Observation on the D/V ratio of male genitalia of *Culex pipiens* complex in Amphur Muang Chiang Mai, northem Thailand. Southeas Asian J Trop Med Public Health 1987; 18: 115-20
28. Crabtree MB, Savage HM, Miller BR. Development of a speices diagnostic PCR assay for the identification of *Culex* vectors of St Louis encephalitis virus based on interspeices sequence variation in ribisimal DNA spacers. Am J Trop Med Hyg 1995; 3: 105-9.
29. Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A et al. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resstance in *Culex pipiens*. Insect Mol Biol 1998; 7: 107- 20.
30. Crabtree MB, Savage HM, Miller BR. Development of polymerase chain reaction assay for differentiation between *Culex pipiens* and *Cx. P. quiquefasciatus* (Diptera:Culicidae) in North America based on genomic differences identified by subtractive hybridization. J Med Entomol 1997; 34: 532-7.
31. Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* Mosquito speices, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Insect Mol Biol 1996; 5: 93- 107.
32. James MT, Harwood RF. Herms's Medical Entomology (6 th ed), Macmillan Publishing Co Inc, New York, 1969.
33. Kasap M. Sivrsinek larvalarının habitat tiplerinin incelenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 1985; 42(2), 269-74.
34. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyo-morfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılışı ve sağlık önemleri). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, 1984; Yayın No: 3215.
35. Benoit JB, Denlinger DL. Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. J Exp Biol 2007; 210, 217-26.
36. Dye C, Hasibeder G. Population Dynamics of mosquito-borne disease: effects of flies which bite some people more frequently than others. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986; 80, 69-77.

37. Munoz AG, Baxter SW, Linares M, Jiggins CD. Deep mitochondrial divergence within a *Heliconius* butterfly species is not explained by cryptic speciation or endosymbiotic bacteria. *BMCEvolutionary* 2011; 11, 358.
38. Beck SJ. *Insect Photoperiodism*. Academic Press Inc, New York 1980.
39. Shaw PJ, Cirelli C, Greenspan RJ, Tononi G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000; 287:1834-1837.
40. Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 2002; 417:329-335.
41. Dennis DS. Ethology of *Proctacanthus brevipennis* (Wiedemann, 1828) (Diptera : Asilidae) in Northeastern Florida. *J Entomol Res Soc, USA* 2012; 14(3):91-109.
42. Appel AG, Rust MK. Time-activity budgets and spatial distribution patterns of the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Dictyoptera: Blattidae). *Ann Entomol Soc Am.* 1986; 79:104-108.
43. Lorenzo MG, Lazzari CR. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae). *Acta trop* 1998; 70(2):163-170.
44. Yee WL, Foster WA. Diel sugar-feeding and host-seeking rhythms in mosquitoes (Diptera:Culicidae) under laboratory conditions. *J Med Entomol* 1992; 29(5):784-791.
45. Haddow AJ, Ssenkubuge Y. The mosquitoes of Bwamba County, Uganda. IX. Further studies on the biting behavior of an outdoor population of the *Anopheles gambiae* Giles complex. *Bull Entomol Res* 1973; 62:407-414.
46. Haddow AJ, Ssenkubuge Y. The mosquitoes of Bwamba County, Uganda. X. Observations on the biting behavior of *Anopheles* spp. other than *A. gambiae* Giles, with notes on the behavior of these species in the Entebbe area. *Bull Entomol Res* 1974; 64:45-51.
47. Takeda M. Differentiation in life cycle of sympatric populations of two forms of *Hyphantria* moth in central Missouri. *Entomol Sci* 2005; 8:211-218.
48. Apperson GW. Nocturnal blood-feeding preferences associated with a melanotic mutant of *Culex tarsalis* (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol* 1979; 16(3):240-245.
49. Rickenbach A, Ferrara L, Eouzan JP, Germain M, Button JP. Cycles d'agressivité et Répartition verticale de quelques espèces de moustiques forestiers de la région de Yaounde (Cameroun). *Cah O.R.S.T.O.M, ser Ent med et Parasitol* 1972;4:309-325.

50. Viennet E, Garros C, Rakotoarivony I et al. Host-seeking activity of Bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of Culicoides in Western Europe. PloS One 2012; 7(10):e48120.
51. Service MW. Flight periodicities and vertical distributions of *Aedes cantans* (M.G.), *Ae. Geniculatus* (O.L.), *Anopheles plumbeus* Steph. And *Culex pipiens* L. (Diptera:Culicidae) in Southern England. Bull Entomol Res 1971; 60:639-651.
52. Schlein Y, Warburg A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi*. J Med Entomol 1986; 23(1):11-15.
53. Clements AN. The Biology of Mosquitoes. Cambridge, MA, USA:CABI Publishing 1999.
54. Barroza RB, Schilman PE, Minoli SA, Lazzari CR: Daily rhythms in disease-vector insects. Biol Rhythm Res 2004; 35(1-2):79-92.
55. Gentile C, Rivas GBS, Meirles-Filho ACA, Lima JBP, Peixoto AA. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. J Biol Rhythms 2009; 24:444.
56. Rund SSC,Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(32):E421-E430.
57. Service MW. Mosquito (Diptera:Culicidae) dispersal-the long and short of it. J Med Entomol 1997; 34(6):579-588.
58. Jones MDR, Gubbins SJ. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. Physiol Entomol 1978; 3:213-220.
59. Jones MDR, Gubbins SJ. Modification of female circadian flight-activity by a male accessory glandpheromone in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. Physiol Entomol 1979; 4:345-351.
60. Chiba Y, Shinkawa Y, Yoshii M et al. A comparative study on insemination dependency of circadian activity pattern in mosquitoes. Physiol Entomol 1992; 17(3):213-218.
61. Takken W, Verhulst NO. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Ann Rev Entomol 2013; 58:43-53.
62. Gillies MT. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera:Culicidae) a review. Bull Entomol Res 1980; 70:525-532.

63. Spielman A. Bionomics of autogenous mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1971; 16:231-28.
64. Byrne K, Nichols RA. *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity* 1999; 82:7-15.
65. Mutebi JP, Savage HM. Discovery of *Culex pipiens pipiens* form *Molestus* in Chicago. *J Am Mosq Control Assoc* 2009; 25(4):500-503.
66. Shinkawa Y, Takeda S, Tomioka K et al. Variability in circadian activity patterns within the *Culex pipiens* complex (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol* 1994;31(1):49-56.
67. Hamer GL, Kitron UD, Goldberg TL et al. Host selection by *Culex pipiens* mosquitoes and West Nile Virus amplification. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(2):268-278.
68. Huang S, Hamer GL, Molaei G et al. Genetic variation associated with mammalian feeding in *Culex pipiens* from a West Nile Virus epidemic region in Chicago, Illinois. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9(6):637-642.
69. Harbach RE, Harrison BA, Gad AM. *Culex* (*Culex*) *molestus* Forskal (Diptera:Culicidae):neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proc Entomol Soc Wash* 1984; 86(3):521-542.
70. Foster WA, Walker ED. Mosquitoes (Culicidae), Chapter 12. In *Medical and Veterinary Entomology* (2nd edition). Academic Press 2009; 207-259.
71. Harbach RE. *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective. *J Am Mosq Control Assoc* 2012; 28(4):10-23.
72. Todaro WS, Morris CD, Heacock NA. *Dirofilaria immitis* and its potential mosquito vectors in central New York state. *Am J Vet Res* 1977; 38(8):1197-200.
73. Robert C, Lowrie JR. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. *J Am Mosq Assoc* 1991; 7:30-6.
74. Loftin KM, Byford MJ, Loftin MJ, Craig ME. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Bernalillo County, New Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 1995; 11(1):90-93.
75. Labarthe N, Serrao ML, Melo YF et al. Potential vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856) in Itacoatiara, Oceanic region of Niteroi Municipality, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(4):425-32.
76. Rossi L, Pollono F, Meneguez PG et al. Four species of mosquito as possible vectors for *Dirofilaria immitis* piedmont rice-fields. *Parassitologia*, 1999; 41(4): 537-42.

77. Mendes Ahid SM, Silva Vasconcelos PS, De Oliveira RL. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. Mem Inst Cruz 2000; 95(6):769-75.
78. Lai C, Tung K, Ooi H, WANG J. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial dencity. Vet Parasitol 2000; 90:231-7.
79. Lee SE, Kim HC, Chong ST, Klein TA, Lee WJ. Moleculer survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. Vet Parasitol; 2007; 148:149-55.
80. Yildirim A, Inci A, Duzlu O, Biskin Z, Ica A, Sahin I. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. Vet Parasitol, 2011,178:143-147.
81. Cranston PS, Ramsdale CD, Snow KR, White GB. Keys to the adults, male hypopygia, fourth-instar larvae and pupae of the British mosquitoes (culicidae). Ambleside: Scientific Publication No: 48, Freshwater Biological Association 1987.
82. Glick J. Illustrated key to the female *Anopheles* of southwestern Asia and Egypt (diptera: culicidae). Mosquito Systematics 1992; 24:125-53.
83. Darsie RE, Samanidou-Voyadjoglou A. Keys for the mosquitoes of Greece. Journal of the American Mosquito Control Association 1997; 13(3):247-54.
84. Samanidou-Voyadjoglou A, Harbach RE. Keys to the adult female mosquitoes (culicidae) of Greece. European Mosquito Bulletin 2001; 10:13-20.
85. Schaffner E, Angel G, Geoffroy B et al. Instut de Resherche Pour le Développement. The mosquitoes of Europe (CD-Rom), Montpellier, France, 2001.
86. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270: 96-99.
87. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
88. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S.. Geneious” v5.5, <http://www.geneious.com>, 2011.
89. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance,

- and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution*, Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731-2739.
90. Kim KS, Tsuda Y, Yamada A. Blood meal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan, *J Med Entomol*, 2009, 46: 1230-1234.
 91. Harbach RE. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop*, 2011, 120: 1-14.
 92. Fontes G, Braun RF, Fraiha Neto H, Vieira JB, Padilha SS, Rocha RC, da Rocha EM. Filariose linfática em Belém, estado do Pará, norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2005, 38: 131-136.
 93. Fontes G, Rocha EMM, Brito AC, Antunes CMF. Lymphatic filariasis in Brazilian urban area (Maceió, Alagoas). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998, 93: 705-710.
 94. Hubálek Z. European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol*, 2000, 13: 415-426.
 95. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA Barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 2007, 44: 1-7.
 96. Vasconcelos PFC, Travassos-da-Rosa JFS, Travassos-da-Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, Sá-Filho GC. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1991, 33: 465-476.
 97. Spinsanti LI, Diaz LA, Contigiani MS. Eco-epidemiología del virus encefalitis St. Louis en Córdoba, Argentina. *Rev Fac Cienc Med*, 2009, 66: 52-59.
 98. Pisano MB, Ré VE, Díaz LA, Farías A, Stein M, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Almirón WR, Contigiani MS. Enzootic activity of Pixuna and Rio Negro viruses (Venezuelan Equine Encephalitis complex) in a Neotropical region of Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10: 199-201.
 99. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*, 2008, 53: 61-81.
 100. Öter K. İstanbul'da Görülen Sivrisinek Türlerinin Tespiti, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.
 101. Kasap H, Kasap M, Mimioğlu MM, Aktan F. Çukurova ve çevresinde sivrisinek ve malaria üzerine araştırmalar. *Doğa Bil Derg*, 1981, 5:141-150.

102. Kasap H, Kasap M. Türkiye Anophelinae türleri. Türk Hij Den Biyol Derg, 1983, 40: 39-52.
103. Eren H, Yağcı Ş, Tanyüksel M. Ankara yöresinde bulunan sivrisinek (diptera: culicidae) türleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 1996, 53: 25-29.
104. Aldemir A, Boşgelmez A. Population dynamics of adults and immature stages of mosquitoes (diptera: culicidae) in Gölbaşı district, Ankara. Turkish Journal of Zoology, 2006, 30: 9-17.
105. Şahin İ. Antalya ve çevresindeki sivrisinekler (diptera: culicidae) ve filariose vektörü olarak önemleri üzerinde araştırmalar. II. Sivrisinek faunasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar. Doğa Bil Derg, 1984, 8: 385-396.
106. Çağlar SS, Alten B, Bellini R, Şimşek FM. Kaynaş, S., Comparsion of nocturnal activities of mosquitoes (diptera: culicidae) sampled by New Jersey light traps and C02 traps in Belek, Turkey. Journal of Vector Ecology, 2003, 28: 1-11.
107. Mimioğlu M, Aktan F, Kasap M, Kasap H. Çukurova ve çevresinde sivrisinek ve malaria üzerine araştırmalar. TÜBİTAK TBAG Proje, 1981.
108. Alten B, Boşgelmez A. Muğla ili, Ortaca ve Dalaman yörelerinde bulunan *Culex* (diptera: culicidae) türlerinin biyo-ekolojisi üzerine araştırmalar I. Turkish Journal of Zoology, 1996, 20: 27-51.
109. Şimşek FM. Şanlıurfa İli Sınırları İçerisinde Bulunan Sivrisinek Türleri (Diptera: Culicidae) ve Sıtma Vektörlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar, Doktora tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
110. Taşçı GT, Kılıc Y. Kars ve Iğdır Civarındaki Köpeklerde *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)'nin Prevalansı ve Potansiyel Vektör Sivrisinek Türleri Üzerine Araştırmalar. Kafkas Univ Vet fak Derg, 2012, 18: A29-A34.
111. Bişkin Z, İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö. Kayseri'nin Felahiye Yöresinde Yaygınlık Gösteren Sivrisinek (Diptera:Culicidae) Türleri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2010, 19: 133-139.
112. Bişkin Z, Düzlü Ö, Yıldırım A, İnci A. Kayseri'nin Felahiye Yöresinde *Dirofilaria immitis*'in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı, T Parazitol Derg, 2010, 34: 200-205.
113. İnci A, Yıldırım A, Njabo KY, Duzlu O, Biskin Z, Ciloglu A. Detection and molecular characterization of avian *Plasmodium* from mosquitoes in central Turkey. Vet Parasitol, 2012, 188: 179-84.

114. Bram RA. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). Proc US Natl Mus, 1967, 120: 1-122.
115. Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia, Vol. 2, EDUSP, São Paulo, 2002, 864 p.
116. Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, dos Santos CL. Insight into *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) species from Brazil. J Med Entomol, 2008, 45: 970-981.
117. Sallum MAM, Foster PG, dos Santos CL, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles* (Nyssorhynchus) *strodei* Root and characterization of a distinct morphological form from the Strodei complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, 2010, 47: 504-526.
118. Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). Parasit Vectors, 2013, 6: 111.
119. Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TP, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Sallum MAM. Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (Nyssorhynchus). PLoS ONE, 2013, 8: 54063.
120. Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and weight of evidence. Syst Biol, 2001, 50: 540-546.
121. Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Syst Entomol, 2002, 27: 361-382.
122. Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, Besansky NJ. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evol Biol, 2009, 9: 298.
123. Mirabello L, Conn JE. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. Med Vet Entomol, 2008, 22: 109-119.
124. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
125. Laurito M, de Oliveira TM, Almirón WR, Sallum MA. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case

- study using samples from Argentina and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2013,108:110-122.
126. Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Entomol, 2006, 20: 413-424.
 127. Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, Zhang Y, Liu M, Zheng Z, Zhang H, Zhu X, Wu Z, Zhao T. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. PLoS ONE, 2012, 7: 47051.
 128. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, Póvoa MM, Linton Y-M. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. Parasit Vectors, 2012, 5: 44.
 129. Saeung A, Baimai V, Otsuka Y, Rattanakul R, Somboon P, Junkum A, Tuetun B, Takaoka H, Choochote W. Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitol Res, 2008, 102: 499-507.
 130. Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MA, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. J Med Entomol, 2011, 48: 272-279.
 131. Pedro M, Sallum MA. Spatial expansion and population structure of the Neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Biol J Linn Soc Lond, 2008, 97: 854-866.
 132. Pedro P, Sallum MAM. Spatial expansion and population structure of the Neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. Biol J Linn Soc Lond, 2009, 97: 854-866.
 133. Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14812-14817.
 134. Petruschke G, Rossi L, Genchi C, Pollono F. Canine dirofilariasis in the canton of Ticino and in the neighboring areas of northern Italy. Schweiz Arch Tierheilkd, 2001, 143: 141-147.
 135. Platt K B, Tucker B J, Halbur PG, Tiawsirisup S, Blitvich BJ, Fabiosa FG, Bartholomay LC, Rowley W A. West Nile virus viremia in eastern chipmunks

- (*Tamias striatus*) sufficient for infecting different mosquitoes. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 831-837.
136. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis*, 2004, 27: 343-355.
 137. Fonseca D M, Keyghobadi N, Malcolm C A, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson R C. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*, 2004, 303: 1535-1538.
 138. Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Go´mez-Tejedor C, Jime´nez-Clavero MA. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 1915-1917.
 139. Va´zquez A, Sa´nchez-Seco M P, Ruiz S, Molero F, Herna´ndez L, Moreno J, Magallanes A, Go´mez-Tejedor C, Tenorio A. Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 549-552.
 140. Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Chi Chim WA, Flores-Flores LF, Rosado-Paredes E, Baak-Baak C, Perez-Mutul J, Suarez-Solis V, Fernandez-Salas I, Beaty BJ. Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. *J Insect Sci*, 2010, 32:1-12.
 141. Gomes B, Sousa CA, Vicente JL, Pinho L, Calderón I, Arez E, Almeida AP, Donnelly MJ, Pinto J. Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization. *Parasit Vectors*, 2013,6:93.

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

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

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

Tarih: 12.12.2012

Toplantı Sayısı: 12

Karar No: 12/123

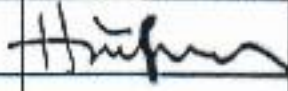
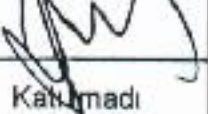
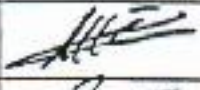
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

12.12.2012

tarhinde

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

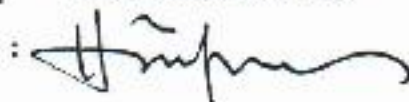
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Abdullah Incl	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özblge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Fusun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil Sanözkan	Doç. Dr.	Vet.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

Üniversitemiz Veteriner Fakültesinden **Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM** tarafından sunulan "**Kayseri Yöresinden Toplanmış Culex pipiens (Diptera : Culicidae) Türlerinin Beslenme Eğilimlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması**" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

Tarih : 12.12.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası :



ASLININ AYNIYDIR

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Seval KORKMAZ

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 5 Aralık 1988, Edremit

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 544 5900493

email: seval_0493@hotmail.com

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

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Ü. Veteriner Fakültesi	2011
Lise	Edremit Lisesi	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-2012	ERU Vet. Fak. Parazitoloji ABD	Bursiyer/TUBİTAK
2013-	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı	Veteriner Hekim

YABANCI DİL

İngilizce