

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
2012-YL-019

TÜRKİYE’NİN AKDENİZ VE EGE KIYILARINDA  
*OCHLEROTATUS ZAMMITHI*  
(DIPTERA: CULICIDAE)’NİN DAĞILIM  
ÖRÜNTÜSÜNÜN VE GENETİK YAPISININ  
BELİRLENMESİ

Sare İlknur CİHANGİR

Tez Danışmanları:  
Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK  
Prof. Dr. Celal ÜLGER

AYDIN



**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sare İlknur CİHANGİR tarafından hazırlanan Türkiye'nin Akdeniz ve Ege kıyılarında *Ochlerotatus zammitii* (Diptera: Culicidae)'nin Dağılım Örüntüsünün ve Genetik Yapısının Belirlenmesi başlıklı tez, 28.06.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı	Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	:Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI	ADÜ	.....
Üye	:Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR	HÜ	.....
Üye	:Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN	ADÜ	.....
Üye	: Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK	ADÜ	.....
Üye	:Doç. Dr. Hacı Halil BIYIK	ADÜ	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN  
Enstitü Müdürü



**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

28/06/2012

İmza

Sare İlknur CİHANGİR



## ÖZET

### TÜRKİYE'NİN EGE VE AKDENİZ KIYILARINDA *OCHLEROTATUS ZAMMITII* (DIPTERA: CULICIDAE)'NİN DAĞILIM ÖRÜNTÜSÜ VE GENETİK YAPISININ BELİRLENMESİ

Sare İlknur CİHANGİR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanları: Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK  
Prof. Dr. Celal ÜLGER  
2012, 60 sayfa

*Ochlerotatus mariae*, *Ochlerotatus phoeniciae* ve *Ochlerotatus zammitii* olmak üzere 3 türden oluşan *Mariae* grubu, Dünya genelinde sınırlı bir dağılıma sahiptir. Grubun her üç türü de sadece Akdeniz ülkelerinin kıyı hatlarındaki kayalık habitatlardan tespit edilmiştir. Türkiye’de, *Mariae* grubu türlerinden *Oc. phoeniciae* ve *Oc. zammitii* türleri bulunmaktadır. Bu araştırmada, *Oc. zammitii* türünün Akdeniz ve Ege bölgelerinde dağılım örüntüsü ve genetik yapısının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Antalya, Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir ve Çanakkale illerinin kıyısız bölgelerinde belirlenen 20 farklı kayalık lokalitede *Oc. zammitii*'nin larva ve ergin örnekleri toplanmıştır. Elde edilen örneklerden öncelikli olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonundan sonra her lokaliteye ait örneklerin mtDNA *ND4* gen bölgesi uygun primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. *Ochlerotatus zammitii* örneklerinden elde edilen *ND4* gen bölgesinin dizileriyle yapılan analizler sonucunda, türün dağılım alanında *ND4* geninin 22 haplotipi tespit edilmiştir. Coğrafik uzaklık ve  $\Gamma_{st}$  değerlerine göre 7 farklı gruba ayrılan örnekleme lokalitelerinde AMOVA yapılarak gruplar arasındaki varyasyon % 67.25, grupları oluşturan lokaliteler arasındaki varyasyon % 2.93 olarak bulunmuşken, lokaliteler içindeki varyasyon % 29.82 olmuştur. Ayrıca populasyonlar arasındaki gen akışı da hesaplanmış ve birbirlerine yakın lokaliteler arasında gen akışının yüksek, genetik uzaklık ağacına dayanılarak yapılan gruplandırmalarda ise gruplar arası gen akışının oldukça düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Ochlerotatus zammitii*, Mitokondriyal DNA, *ND4*, Akdeniz, Ege.





**ABSTRACT****DETERMINATION OF THE DISTRIBUTION PATTERN AND GENETIC STRUCTURE OF *OCHLEROTATUS ZAMMITII* (DIPTERA: CULICIDAE) IN MEDITERRANEAN AND AEGEAN COAST OF TURKEY**

Sare İlknur CİHANGİR

M.Sc. Thesis, Department of Biology  
Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK  
Prof. Dr. Celal ÜLGER  
2012, 60 Pages

The *Mariae* group, which consists of three species, namely *Ochlerotatus mariae*, *Ochlerotatus phoeniciae* and *Ochlerotatus zammitii*, has a limited distribution worldwide. All of the three species are found in the rocky habitats on the coastal areas of Mediterranean countries. *Ochlerotatus phoeniciae* and *Oc. zammitii* species of the *Mariae* group are found in Turkey. The aim of this study is to determine the distribution pattern and genetic structure of the *Oc. zammitii* species in the Mediterranean and Aegean regions. For this purpose, the larval and adult samples of *Oc. zammitii* were collected in 20 different rocky locations in the coastal regions of Antalya, Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir and Çanakkale provinces. DNA isolation was performed primarily from the obtained samples. After DNA isolation, the mtDNA *ND4* gene region of the samples, which were collected from each localities, was amplified by using suitable primers with *Polymerase Chain Reaction*. As a result of the analyses that were made with the sequences of *ND4* gene regions, which were obtained from *Oc. zammitii* samples, 22 haploptypes of the *ND4* gene were detected in the distribution region of the species. AMOVA was applied to sampling localities, separated into seven different groups depending on the geographical distance and  $\Gamma_{st}$  values. The variation between the groups was 67.25%, the variation between the locations was 2.93%, while the variation within the locations was 29.82%. Furthermore, the gene flow between the populations was calculated and it was concluded that the gene flow between the nearby locations was found to be high. Meanwhile, the gene flow between the groups was very low in the classifications based on the genetic distance tree.

**Key words:** *Ochlerotatus zammitii*, Mitochondrial DNA, *ND4*, Mediterranean, Aegean.



## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın amaçları doğrultusunda sürdürülmesinde önerileriyle destek olan danışman hocalarım Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Celal ÜLGER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımda fikir aldığım ve her konuda görüşlerini önemseydiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI ve Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN'a, Tez jürimde yer alıp tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR'a, Tez dönemimde uygun çalışma ortamı sağlayan sayın bölüm başkanım Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a, Laboratuvar çalışmalarım ve istatistiksel analizlerim boyunca beni yalnız bırakmayan ve yol gösteren Dr. Can YILMAZ'a ve Tezimin görsel içeriğinde yardımını esirgemeyen Dr. Ferhat KİREMİT'e ve Dr. Evrim DEMİR'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne (Proje no: ADÜ-BAP-FEF-11031) ve TÜBİTAK'a (Proje no: TBAG-110T593) teşekkür ederim.

Hayatta her zaman yanımda olmuş, hiçbir zaman fedakarlıklarını ve sevgilerini esirgememiş, üzerimde çok büyük emeğe sahip olan, yanlarında huzur ve mutluluk bulduğum Annem Urkiye CİHANGİR ve Babam Ali İhsan CİHANGİR'e, tez çalışmam boyunca bana hep cesaret ve güç veren, tecrübeleri ile yoluma ışık tutan Doç. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1. Aedes ve Ochlerotatus Türleriyle Yapılan Bazı Sistematik, Moleküler ve	
Populasyon Genetiği Çalışmaları.....	4
2.2. Türkiye Sivrisinek Faunasında Ochlerotatus mariae Grubu .....	9
2.3. Ochlerotatus mariae Grubunun Zoocoğrafik Dağılımı .....	11
2.4. Ochlerotatus mariae Grubunun Biyolojisi ve Vektörel Önemi .....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Araştırma Bölgesi ve Örneklem Lokaliteleri .....	14
3.2. Örneklem Çalışmaları.....	15
3.2.1. Larva Örneklemeleri .....	15
3.2.2. Ergin Örneklemeleri.....	16
3.3. Laboratuvar Çalışmaları.....	20
3.3.1. Örneklerden DNA İzolasyonu.....	20
3.3.2. ND4 Gen Bölgesi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	21
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi, PCR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	22
3.4. Veri Analizleri.....	23
3.4.1. mtDNA ND4 Geni Dizilerinin Hizalanması .....	23

3.4.2. mtDNA ND4 Geni Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği .....	24
3.4.3. Haplotip Ağının Oluşturulması .....	24
3.4.4. Nötralite Testleri ve Uyumsuzluk Dağılımı Analizi.....	24
3.4.5. Populasyonlara Ait Uzaklığa Bağlı UPGMA Ağacının Oluşturulması.....	24
3.4.6. Populasyonların Genetik Yapısı ve Gen Akışının Hesaplanması.....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. DNA İzolasyonu ve mtDNA ND4 Gen Bölgesi Dizileri.....	26
4.2. mtDNA ND4 gen Bölgesi Haplotip Dağılımları, Frekansları ve Haplotip Ağı.....	27
4.3. Haplotip ( $H_d$ ), Nükleotit Çeşitliliği ( $\pi$ ) ve Nükleotit Farklılıklarının Ortalaması (K) .....	32
4.4. Nötralite Testleri ve Mismatch (Uyumsuzluk Analizi) .....	33
4.5. Genetik Uzaklık ve UPGMA Ağacının Oluşturulması .....	34
4.6. Populasyonlar Arası Gen Akışı .....	40
4.7. Populasyonların Genetik Yapısı .....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	59

**SİMGELER DİZİNİ**

AMOVA	Moleküler Varyans Analizi
CDC	Hastalık Kontrol Merkezi
COI	Sitokrom Oksidaz I
Cytb	Sitokrom b
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
ITS2	Transkribe Edilebilen Ara Bölgeler
ND4	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz'ın 4. alt ünitesi
ND5	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz'ın 5. alt ünitesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
UPGMA	Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış İkili Grup Metodu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
II	Nükleotid Çeşitliliği





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Araştırma bölgesinde örnekleme lokalitelerinin dağılımı.....	15
Şekil 3.2. Muğla, Bodrum lokalitesi (no: 10).....	16
Şekil 3.3. Aydın, Didim lokalitesi ( no:11) .....	17
Şekil 3.4. Aydın Kuşadası lokalitesi (no: 12) .....	17
Şekil 3.5. İzmir, Alaçatı lokalitesi (no: 13) .....	18
Şekil 3.6. Balıkesir, Ayvalık lokalitesi (no: 18) .....	18
Şekil 3.7. Çanakkale, Bozcaada lokalitesi (no:19) .....	19
Şekil 3.8. Çanakkale, Gökçeada lokalitesi (no: 20) .....	19
Şekil 4.1. Lokalitelere göre mtDNA <i>ND4</i> geni haplotiplerinin istatistiksel Köksüz tutumluluk ağı.....	31
Şekil 4.2. Örnekleme lokalitelerine göre mtDNA <i>ND4</i> geni haplotip frekanslarının $\gamma_{ST}$ ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı.....	37
Şekil 4.3. Lokalitelere göre grupların ve haplotip dağılımlarının harita üzerindeki gösterimi.....	38
Şekil 4.4. Lokalite gruplarının mtDNA <i>ND4</i> gen bölgesi $\Gamma_{ST}$ ikili karşılaştırılmalarına dayalı çizilen UPGMA ağacı.....	40
Şekil 4.5. AMOVA analizi ile elde edilen gruplar arasında, populasyonlar arasında ve populasyonlar içindeki farklılaşma miktarının dağılımı.....	42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı Ochlerotatus türlerinin arbovirüs vektörlükleri.....	1
Çizelge 3.1. Örnekleme lokaliteleri .....	1
Çizelge 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımı .....	1
Çizelge 4.1. DNA izolasyonları, mtDNA ND4 dizilerine ait sonuçlar .....	1
Çizelge 4.2. Örnekleme lokalitelerine göre mtDNA ND4 gen bölgesi haplotiplerinin dağılımı .....	1
Çizelge 4.3. mtDNA ND4 gen bölgesi dizilerinde polimorfik bölgeler.....	1
Çizelge 4.4. mtDNA ND4 gen bölgesi haplotiplerine ait frekans değerleri .....	1
Çizelge 4.5. mtDNA ND4 gen bölgesi için tespit edilen haplotip ( $H_d$ ) ve..... nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ) ile nükleotid farklılıklarının ortalaması ( $K$ ) değerleri.....	1
Çizelge 4.6. Nötralite testi ve uyumsuzluk dağılımı analiz sonuçları .....	1
Çizelge 4.7. mtDNA ND4 geni genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ve $\gamma_{ST}$ ) değerleri .....	1
ile lokalitelerin ikişerli karşılaştırılmaları.....	1
Çizelge 4.8. mtDNA ND4 geni verilerine göre lokalite gruplamalarına ait..... genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ve $\gamma_{ST}$ ) değerleri ile lokalitelerin ikişerli karşılaştırılmaları.....	1
Çizelge 4.9. Gruplar arasında gen akışının $\gamma_{ST}$ değeri üzerinden .....	1
hesaplanan Nm değerleri.....	41
Çizelge 4.10. Gruplar ve lokaliteler arasında varyans analizi .....	1



## 1. GİRİŞ

Culicidae familyasını oluşturan sivrisinekler, virüs, bakteri, protozoa ya da nematod olabilen çok farklı patojen organizmalara vektörlük yapabilmektedirler. Bu nedenle, Sıtma, Filariasis, Sarıhumma, Deng Humması, Batı Nil Humması, Chikungunya Ateşi ve çeşitli ensefalitler gibi hastalıkların insan topluluklarında yayılmasını ve dünya genelinde etkili olmasını sağlayan sivrisinekler önemli bir böcek grubudur (Lehane, 1991; Kettle, 1995; Beaty ve Marquart, 1996). Diğer birçok böcek gruplarında olduğu gibi, Culicidae familyasının alt taksonlarının sistematüğinde de zaman zaman değışimler olmaktadır. Bu değışimler nedeniyle son yıllarda yapılan önemli düzenlemeler sonucunda, Culicidae familyası için geçerli kabul edilen tür sayısı 3523 olmuştur (Harbach ve Kitching, 2005; Harbach, 2007, 2011). Kayıtlı tür sayısıyla, Diptera'nın en yüksek tür çeşitliliğine sahip familyalarından biri olarak kabul edilen Culicidae familyasının yaklaşık 500 türünü kapsayan *Ochlerotatus* Lynch Arribalzaga, 1891 cinsi de familyanın en büyük taksonunu oluşturmaktadır (Reinert vd., 2008). *Ochlerotatus* cinsinin *Ochlerotatus phoeniciae* (Coluzzi ve Sabatini, 1968) ve *Ochlerotatus zammitii* (Theobald, 1903) türleri, ülkemizde varlığı henüz tespit edilmemiş olan *Ochlerotatus mariae* (Sergent ve Sergent, 1903) türü ile birlikte *mariae* grubunu oluşturmaktadırlar (Coluzzi ve Sabatini, 1968; Coluzzi ve Bullini 1971; Coluzzi vd., 1976; Bullini ve Coluzzi, 1982). *Ochlerotatus* cinsinin diğer tür gruplarına göre, *mariae* grubu dünya genelinde çok sınırlı bir bölgede dağılım yapmakta olup, grup türleri sadece Akdeniz ülkelerinin kıyı kesimlerinden bildirilmiştir. Ancak grup türlerinin üçü de Akdeniz havzasında bulunmakla birlikte, türlerin Akdeniz ülkelerindeki dağılımları oldukça farklıdır. *Ochlerotatus mariae* türü, İber Yarımadası'nın Atlantik kıyısı da dahil, Batı Akdeniz dağılımlıdır (Coluzzi vd., 1975; Encinas Grandes, 1982; Ribeiro vd., 1988; Bueno-Mari ve İmenez-Peydro, 2011). *Ochlerotatus phoeniciae* türünün dağılımı Akdeniz'in doğusunda (Coluzzi vd., 1975) olup, ülkemizin de Doğu Akdeniz kıyılarından bildirilmiştir (Coluzzi, 1974a). Bu araştırmanın hedef türü olan *Ochlerotatus zammitii*'nin dağılımı ise genel olarak Orta Akdeniz bölgelerindedir (Theobald, 1903; Labuda, 1969; Regner, 1969; Coluzzi, 1974a; Eritja vd., 2000; Ramsdale vd., 2001). Günümüzde, morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerden elde edilen sonuçlara göre, *mariae* grubu türlerinin allopatrik dağılım sergiledikleri kabul edilmiş olup, ülkemiz hariç diğer Akdeniz Bölgesi ülkelerinin hiçbirinde türlerin herhangi ikisinin kaydı verilmemiştir (Coluzzi vd., 1974b; Becker vd., 2003, Tuncay vd.,

2009). Ülkemizde de *Oc. zammitii* Antalya'nın batısında, Akdeniz ve Ege kıyılarında yayılış gösterirken, *Oc. phoeniciae* Antalya'nın doğusunda yayılış göstermekte olup, iki türün simpatrik populasyonları tespit edilmemiştir (Coluzzi vd., 1974b; Tuncay vd., 2009).

Sivrisineklerin neden oldukları vektörel hastalıklar değerlendirildiğinde, *Mariae* grubu türlerinin herhangi birinin bu hastalıkların yayılımında etkili olduklarını gösteren bir sonuca bugüne kadar ulaşılmamıştır. Bununla birlikte, son yıllarda moleküler ve biyokimyasal yeni teknik ve yöntemlerin uygulandığı araştırmalar sonucunda, daha önce vektör oldukları bilinmeyen bir çok sivrisinek türünün özellikle de *Ochlerotatus* türlerinin, Usutu ve Chikungunya gibi arbovirüslere vektörlük yapabildikleri belirlenmiştir (Gubler, 1998; Hunter, 2003; Alten vd., 2007; Çağlar vd., 2011; Jöst vd., 2011). Ayrıca, gerek çevresel tahribatlar gerekse de insan topluluklarının hareket sıklığı ve artan küresel ölçekteki ticari faaliyetler gibi nedenlerle, sivrisineklerin ve vektörlüklerini yaptıkları birçok arbovirüsün etkinliği gün geçtikçe artmakta ve zamanla yeni coğrafik bölgelerde yeni sivrisinek türlerinin vektörlüğünü ortaya koyan sonuçlara ulaşılmaktadır. Son zamanlarda elde edilen bu sonuçlara ek olarak, hem *Ochlerotatus* cinsindeki diğer türlerin çok farklı arbovirüslere vektörlükleri hem de *Mariae* grubu türlerinin antropofilik davranış göstermeleri ve dağılım alanlarının insan hareketliliğinin yoğunlaştığı liman kentlerini ve turizm alanlarını kapsamaları değerlendirildiğinde, grup türlerinin vektörlük potansiyellerinin bulunduğunu ifade etmek yanlış bir öngörü olmamaktadır. Bu nedenle, bugün için *Mariae* grubunun *Oc. zammitii* ve *Oc. phoeniciae* türlerinin bulunduğu tek coğrafik bölge konumundaki ülkemizde, grup türlerine yönelik olarak yapılabilecek evrimsel, biyolojik, populasyon genetiği ve populasyon dağılım modelleri gibi araştırmalar önem arz etmektedir. Çünkü sivrisineklerin vektörlüğünü yaptığı birçok hastalığın kontrolünde, en azından belirli bir coğrafi bölgeyi ele alarak hedef sivrisinek türünün ya da türlerinin populasyon özelliklerine, alt populasyon etkileşimlerine ve dağılım alanlarına yönelik veriler yararlı olmaktadır. Böylece, potansiyel tehdit oluşturan sivrisinek türlerinin büyük bir coğrafik bölgenin ne kadarında etkili olabilecekleri belirlenerek, vektörel hastalık tehlikesinin ortaya çıkması durumunda, hastalığın hangi alt bölgelere hızla yayılabileceğine dair öngörüler oluşturulabilecek, etkili ve zamanlaması doğru olan vektör kontrol çalışmaları sorunlar büyümeden uygulanabilecektir. Bu doğrultuda planlanan bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında, ülkemizin Antalya İli sınırlarından başlayarak, Ege ve Marmara bölgelerine kadar

uzanan araştırma bölgesinde *Mariae* grubu türlerinden *Oc. zammitii* türünün dağılımına ve populasyon genetiğine yönelik yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen verilerle, *Oc. zammitii* türünün ülkemizdeki coğrafik dağılım örüntüsü, dağılım örüntüsüne bağlı mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotip çeşitliliği ve haplotip frekanslarının belirlenmesi, böylece arbovirüslere vektörlük potansiyelini ön gördüğümüz *Oc. zammitii* türünün gelecek dönemlerde oluşturabileceği vektörel tehlikelere karşı ön tedbirlerin planlanmasına katkı sağlanarak doğru ve etkili mücadele programlarının oluşturulması için bir veri seti oluşturulmaya çalışılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *Aedes* ve *Ochlerotatus* Türleriyle Yapılan Bazı Sistematik, Moleküler ve Populasyon Genetiği Çalışmaları

*Aedes* Meigen 1818'in tanımı ilk kez yapıldığında, *Aedes cinereus* Meigen olarak isimlendirilen tek bir türü içermiştir ve tanımı oldukça açık bir şekilde yapılmıştır. Ancak zaman içerisinde bilim insanları *Aedes*'in oldukça heterojen bir cins olduğunun farkına varmışlardır. Bu konuyla ilgili bir çok araştırmacı cinsin heterojen durumunu tartışmış ve revizyon yapılması gerektiğini raporlarında bildirmişlerdir. Belkin (1962) çalışmasında *Aedes* cinsinin polimorfik bir cins olduğunu ve karakterlerin çoğunun değişken olduğunu rapor etmiştir. Mattingly (1971) tür teşhis anahtarında *Aedes* cinsi içerisinde bazı karakterlere ait çok fazla istisna olduğunu bildirmiştir. Harbach ve Kitching (1998) Culicidae sınıflandırması ve filogenisi kapsamında yaptıkları çalışmada *Aedes* cinsinin problemlerini tartışmış ve heterojen yapısı nedeniyle cinsi tanımlamakta zorlanmışlardır. *Aedes* cinsi üzerine ilk kapsamlı çalışma ise Edwards (1932) tarafından yapılmıştır. Edwards (1932) çalışmasında, *Aedes* cinsi içerisindeki türlerin birçoğunun değişken, çok azının sabit karakterler içerdiğini belirtmiştir. Ayrıca *Aedes* cinsi ile ilgili yaptığı bu geniş çaplı çalışmasında daha önce Culicidae familyasının cinsleri olarak sınıflandırılan 24 cinsi, *Aedes* cinsi içerisine alt cins olarak dahil etmiştir. Daha sonra, Edwards (1941) *Aedes* cinsini erkek genitelya ve maksillar palp oluşumlarına dayanarak iki grup altında, birkaç alt cinse ayırmıştır. Belkin (1962), tür tanımlamaları yaparken *Aedes* cinsi içerisindeki alt cinslerin hayat evrelerinde karşılaşılan bazı yanılıgıları gidermek için, cinsin erkek genitelyası ve 4. larval evrelerindeki bazı karakterlere göre yeni standartlar geliştirmiş ve bu formatı takiben ileriki yıllarda birçok araştırmacı revizyon çalışmaları yapmıştır. Reinert (1999, 2000ab) bazı düzenlemeler yaparak *Aedes* cinsi içerisinden bazı grupları çıkarmış, dişi ve erkek genitelyaları, 4. larva evresi ve pupa karakterlerindeki farklılaşmaları kullanarak *Ochlerotatus*'u *Aedes* cinsinin altcinsi seviyesinden çıkartarak ayrı bir cins olarak tanımlamıştır. Daha sonra, *Ochlerotatus* cinsini ise kendi içerisinde grup 1 ve grup 2 şeklinde tekrar gruplandırmış ve *Aedes* cinsinden aktarılan 21 altcins ile birlikte yaklaşık 500 türü içeren büyük bir kategoriye dönüştürmüştür. Reinert (2004 ve 2006) *Ochlerotatus* cinsinin yeniden sınıflandırılması gerektiğini öne sürerek gerçekleştirdiği taksonomik çalışmalarla günümüzde bu cinse ait 276 tür tanımlamaktadır. Yapılan



bu değişimlerden *Mariae* grubu da etkilenmiş ve grup türlerinin tamamı daha önce *Aedes* cinsinin türleriye, *Ochlerotatus* cinsinin türlerine dönüşmüştür. Ancak *Mariae* grubu türlerinin dağılımı ile ilgili yapılan ülkesel kayıtların hemen hemen tamamı temel olarak çok az farklılıklar sunan morfolojik karakterlere dayandığından türlerin dağılımı ile ilgili tartışmalı durumlar günümüze kadar süregelmiştir. Ülkemizde de bu durum geçerli olup, son yıllara kadar morfolojik karakterlere dayalı tek bir araştırma yapılmış (Coluzzi vd.,1974a) ve bu araştırmanın sonuçlarıyla da *Oc. zammitii* ve *Oc. phoeniciae* türlerinin ülkemizdeki varlığı ve kısmen dağılım alanları bildirilmiştir. Ancak, grup içerisinde morfolojik karakter benzerliğinin fazla olması, grup türlerinin birbirinden morfolojiye bağlı olarak ayrılmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, grup türlerine ait elde edilen bu ilk sonuçların doğrulanma gerekliliği ortaya çıkmıştır. Coluzzi ve Bullini (1971) *Mariae* grubunun iki üyesi olan *Oc. mariae* ve *Oc. zammitii* ile ilgili biyokimyasal ya da çaprazlama çalışmalarıyla güvenilir tür teşhisleri yapmaya çalışmışlardır. Adriyatik kıyısındaki Pecshici'den ve Tiran Denizi kıyısındaki Sperlonga'dan salınan *Oc. zammitii* ve zaten bu bölgelerde var olan *Oc. mariae* populasyonlarında Fosfoglutamaz enzimi polimorfizmine bakılarak hibrit bireyler tespit edilmiş ve farklı derecelerde de olsa, türler arasında hibrit kısırlıkları gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre *Oc. mariae* ve *Oc. zammitii* türlerinin hibrit erkekleri kısmen verimsizken, dişiler üretkendir. Ayrıca doğadaki hibrit sayısının az olmasının sebebi olarak eşleşme öncesi üreme izolasyonu mekanizmalarının olduğu ve birincil izolasyon mekanizmasının da türlerin üreme habitatları arasındaki kumlu kıyılara bağlı olarak ortaya çıktığı kabul edilmiştir.

*Mariae* grubu üyeleri gibi kriptik türlerin tanımlanmasında kullanılan moleküler belirteçler, populasyonların genetik olarak farklılaşmasına neden olan faktörlerin belirlenmesinde de tercih edilen kullanışlı araçlardır (Collins ve Paskewitz, 1996; Proft vd., 1999). Bu moleküler belirteçlerden ribozomal DNA ITS2 (Second Internal Transcribed Spacer 2), rDNA 28S geninin ikinci ve üçüncü domaini (D2, D3) ve mikrosatellit lokusları populasyon genetiği ve filogeni çalışmalarında yaygın olarak kullanılanlardan bazılarıdır. Jong vd. (2009) rDNA ITS2 belirtecini kullanarak arbovirüsler açısından dünya genelinde önemli bir vektör olan *Aedes albopictus*' un Korsika Adası'ndaki varlığını doğrulamışlardır. Huber vd. (2004) Dengue humması virüsünün en önemli vektörü olan *Aedes aegypti*'nin Güneydoğu Asya'daki vektörlüğünü ve genetik farklılaşmalarını belirlemek için Mikrosatellit

lokuslarını kullanmışlar ve farklılaşmanın pasif taşımayla insanlar aracılığıyla meydana geldiği sonucuna varmışlardır. Ravel vd. (2001) mikrosatellit lokusları ile AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analizleri yaparak, Meksika'daki *Ae. aegypti* populasyonlarının genetik farklılaşmalarının belirlenmesini sağlamışlardır.

Tuncay vd. (2009)'nin morfolojik ve moleküler yöntemler kullanarak yapmış oldukları araştırmada ülkemizin Akdeniz Bölgesi kıyısal alanlarının tamamını kapsayacak şekilde 24 farklı lokaliteden toplanan örneklerden elde edilen rDNA-ITS2 bölgesi dizileri karşılaştırılmış ve *Mariae* grubunun *Oc. zammitii* ve *Oc. phoeniciae* olmak üzere iki türünün ülkemizdeki varlığı doğrulanmıştır. Ancak, yapılan bu araştırmanın sonuçları türlerin dağılım modellerinin ortaya çıkarılmasında, allopatrik dağılım sergileyen populasyonların hangi faktörler tarafından sınırlandırıldığına ve populasyonların genetik farklılıklarına açıklama getirememiştir. Özellikle de, ITS2 bölgesinin tür içi varyasyonların belirlenmesinde uygun olmayan bir belirteç olması nedeniyle *Mariae* grubu populasyonlarının farklılıklarını ve bu farklılıkların nedenleri açıklanamamıştır. Diğer taraftan, Ege ve Marmara bölgelerimizde grubun tür ya da türlerinin dağılımına yönelik herhangi bir çalışma da yapılamamış olduğundan, grubun üçüncü türü olan *Oc. mariae* türünün ülkemizde bulunup bulunmadığı konusu da aydınlatılamamıştır.

Nükleer DNA'ya ek olarak, mtDNA belirteçleri de populasyon genetiği çalışmalarında, türlerin coğrafik dağılımlarının ve gen frekanslarının değerlendirilmesinde, gen akışı ve populasyon öyküsünün araştırılmasında kullanışlı belirteçlerdir (Tautz vd., 1989; Zane vd., 2002). Mitokondriyal DNA böceklerde moleküler evrim çalışmalarında da (Kambhampati 1995, Tang vd., 1996) çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü mtDNA, küçük genom yapısı, rekombinasyona uğramaması, yüksek kopya sayısı, hızlı evrimleşme özelliği ve anasal kalıtım göstermesi gibi nedenlerle populasyon genetiği ve evrimsel analizlerde oldukça yararlı olmaktadır (Krzywinski vd., 2011). Birçok hayvan gruplarında olduğu gibi sivrisineklerde de, mtDNA dizileri çeşitli düzeylerdeki farklılıkları ve ilişkileri çözmeye (Krzywinski vd., 2001; Krzywinski ve Besansky, 2003; Loaiza vd., 2010), ana soy hatlarının dallanma zamanlarını hesaplamada (Krzywinski vd., 2006; Moreno vd., 2010) ve kriptik tür gruplarında türlerin PZR'na dayalı tanımlamalarını yapmada kullanılmaktadır (Goswami vd., 2006; Dusfour vd., 2007).

Bu araştırmanın hedef türü olan *Mariae* grubu türlerinden *Oc. zammitii* ile ya da grubun diğer türleri ile hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde Mitokondriyal DNA belirteçleri kullanılarak yapılmış herhangi bir populasyon genetiği çalışması yoktur. Bu nedenle, bu araştırmanın sonuçlarının karşılaştırılabileceği doğrudan ilgili araştırma sonuçları mevcut olmadığından, araştırmanın hedef türüne sistematik olarak yakın türlere ait populasyon genetiği çalışmalarından elde edilen sonuçlardan yararlanma gereği ortaya çıkmıştır.

Kambhampati vd. (1990) *Aedes albopictus* populasyonlarının genetik yapısını ve gen akışını belirlemek amacıyla Asya ve Amerika'da RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) analizleri ile yaptıkları çalışmalarında Hong-Kong, Mauritius ve Singapur'da farklı haplotipler görülmekle birlikte çalışma alanında genel olarak çok düşük mtDNA farklılaşması olduğunu saptamışlardır. Genel olarak düşük mtDNA çeşitliliği olmasının sebebi ile ilgili olarak da *Ae. albopictus*'un Amerika ve Brezilya'ya 1980'li yıllarda giriş yaptığı ve henüz farklılaşacak kadar zaman geçmediği yorumu getirilmiştir.

Birungi vd. (2002) ABD ve Brezilya'da *Ae. albopictus* populasyonlarının genetik varyasyonunu ve orijinlerini belirlemek amacıyla *ND5* gen bölgesini kullanarak yapmış oldukları çalışmalarında nükleer DNA ile yapılan çalışmalara göre daha düşük genetik çeşitlilik belirlemişlerdir. Ayrıca ABD populasyonlarında genetik çeşitlilik frekansının düşük olduğu ve lokal olarak farklılaşmalar olduğu, bu durumun sebebinin ABD'deki populasyonların kurucu etkisinden kaynaklandığı oysa Brezilya'da ABD'nin aksine lokal farklılaşmaların olmadığı ve gen akışının halen devam ettiği sonucuna varmışlardır.

Bosio vd. (2005) Tayland'ın geniş coğrafik alanları boyunca *Ae. aegypti* türünde gen akışı modelini ve genetik farklılaşmayı karakterize etmek amacıyla Tayland'ın kuzeyindeki Chiang Mai kentinden güneyindeki Songkha'ya kadar olan 1400 km.lik alandan 19 *Aedes aegypti* populasyonu ile populasyon genetiği çalışması yapmışlardır. Analizler, bölgelerden toplanan sivrisinekler arasındaki bireysel farklılaşma, 25 km.den daha yakın bölgelerden toplanan örnekler arasındaki farklılaşma, 100 km.den daha uzak örnekler arasındaki farklılaşma olmak üzere üç düzeyde varyasyon olduğunu göstermiştir.

Mousson vd. (2005) *Ae. aegypti* ve *Ae. albopictus* örneklerinin geçmiş öyküsünü, genetik farklılaşmaya dayalı evrimsel süreçlerini ve coğrafik dağılımlarını

çalışmak amacıyla *ND5*, *COI* ve *Cytb* mitokondriyal gen bölgelerini kullanarak yapmış oldukları çalışmalarında, *Ae. aegypti* mtDNA genlerinin *Ae. albopictus*'a göre daha hızlı evrilmekte olduğu; *COI* geninin *Ae. aegypti* için en değişken, *Ae. albopictus* için en az informatif olduğu; *ND5* geninin *Ae. aegypti* için en informatif, *Ae. albopictus* için en az değişken olduğu; *Cytb* geninin *Ae. albopictus* için en değişken ve en informatif olan gen olduğu sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlara dayanarak mtDNA genlerinin polimorfizm değerlerinin türlere göre değişkenlik gösterdiği yorumunu getirmişlerdir.

Bracco vd. (2007) Amerika, Afrika ve Asya ülkelerindeki *Ae. aegypti* populasyonlarının mitokondriyal soy hattı dağılımlarını ve populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında türün 20 haplotipini belirlemişlerdir. Bu haplotiplerin 20'sinin Amerika, 4'ünün Afrika/Asya, 1'inin Amerika/Afrika ve 1'inin Amerika/Asya haplotipleri olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca Nested Clad analizleri ile Amerika'da 2 soy hattının bulunduğu, 1. klad'ın Afrika haplotiplerine, 2. klad'ın Afrika/Asya haplotiplerine yakın olduğu sonucuna varmışlardır.

Paduan ve Ribolla (2008) Brezilya'da *Ae. aegypti* populasyonlarının yapısı ve genetik farklılaşmasını karakterize etmek amacıyla mitokondriyal *ND4* ve *COI* gen bölgelerine ait dizi verilerinden yararlanmışlardır. Çalışmalarında, Brezilya'nın kuzey bölgesinde yüksek olan genetik farklılaşmayı populasyonların coğrafik olarak izole olmasıyla açıklamışlardır. Güney bölgede önemli bir liman kenti olan Santos şehrindeki farklılaşmaların ise coğrafik izolasyondan ziyade, yakın zamanda gemiler aracılığıyla farklı bölgelerden gelen populasyonlardan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Raimundo Sausa Lima Junior vd. (2009) Brezilya'daki *Ae. aegypti* 'nin genetik çeşitliliğini belirlemek amacıyla *ND4* gen bölgesi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında Brezilya'da 2 ana genetik soy hattının bulunduğu, ayrıca çalışma bölgesine uzak mesafelerde bulunan Rio ve Pacariama bölgeleri haricinde diğer lokalitelerden toplanan örneklerin genetik ve coğrafik uzaklıkları arasında ilişki olmadığı sonucuna varmışlardır. Böylece Rio ve Pacariama haricindeki bölgelerde insanlar ve ticaret gemileri aracılığıyla pasif bir yayılım olduğu, Rio ve Pacariama bölgelerindeki genetik farklılaşmanın ise coğrafik uzaklıklar nedeniyle meydana geldiği şeklinde yorum yapmışlardır.

Maia vd. (2009) mtDNA'nın *ND5* gen bölgesini kullanarak Brezilya'nın Manaus kentindeki *Ae. albopictus* popülasyonlarının genetik yapısını ve çeşitliliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda kentin genelinde H1 ve H2 olmak üzere 2 haplotipin bulunduğunu ve genetik çeşitliliğin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Genetik çeşitliliğin düşük olmasının sebebi olarak popülasyonun darboğaza girmesi veya kurucu etkisiyle kurulmuş olabileceği yorumunu yapmışlardır.

## 2.2. Türkiye Sivrisinek Faunasında *Ochlerotatus mariae* Grubu

Culicidae familyası, Anophelinae ve Culicinae alt familyaları olmak üzere 2 soy hattında, 113 cinse bağlı 3523 türü kapmakta olup, büyük ve çeşitliliği fazla bir gruptur (Harbach ve Kitching, 2005; Harbach, 2007, 2011). Dünya genelinde geçerli kabul edilen mevcut cinslerden *Anopheles*, *Aedes*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia* ve *Uranotaenia* olmak üzere sadece sekiz cins ülkemizde bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan morfolojik ve moleküler sistematik çalışmalarla ülkemizde buldukları belirlenen sekiz tür ile birlikte, Türkiye sivrisinek faunası *Anopheles* (10 tür), *Aedes* (3 tür), *Culex* (13 tür), *Culiseta* (6 tür), *Ochlerotatus* (20 tür), *Coquillettidia* (1 tür), *Orthopodomyia* (1 tür) ve *Uranotaenia* (1 tür) cinslerinde yer alan 55 türden oluşmaktadır (Parrish, 1959; Merdivenci, 1984; Kasap vd., 1997; Ramsdale vd., 2001; Aldemir vd., 2010; Şimşek vd., 2011). Bu faunanın hem 20 türünü kapsamaması hem de türlerinin ülkemizin birçok bölgesinde dağılım yapmış vektör yada potansiyel vektör olmaları nedeniyle *Ochlerotatus* önemli bir cinsdir. Uzun yıllardır *Aedes* cinsinin bir alt cinsi olarak sınıflandırılan *Ochlerotatus*, Reinert (2000c)'in çalışmaları sonucunda alt cins kategorisinden cins kategorisine yükseltilmiştir. Bu değişim sonucunda da, daha önceleri *Aedes* cinsinin alt cinsi olarak 180 türü kapsayan *Ochlerotatus*, günümüzde 21 alt cinsinde dağılmış yaklaşık 500 kadar türün gruplandırıldığı büyük bir cins olmuştur (Reinert, 2008). Ancak bu cins kapsamındaki türlerin alt cinsler düzeyine yerleştirilmeleri konusunda birçok zorlukla karşılaşmış ve türlerin grup içi yerleşimi konusundaki tartışma ve sorunlar dünya genelinde günümüze kadar süregelmiştir. Özellikle de, cins içerisindeki morfolojik heterojenitenin çok fazla olmasıyla ortaya çıkan bu durum daha sonra çözümlenecek bir sorun olarak bırakılmış ve *Ochlerotatus* türlerinden bazıları alt cins kategorilerine yerleştirilememiştir (Reinert, 2000c; Savega, 2005). Diğer taraftan bazı türlerin morfolojik benzerliklerinin fazlalığı da özel bir durum

oluşturmuş ve *Ochlerotatus* türlerinden bazıları hem türlerin benzerliklerine hem de türlerin yayılış gösterdikleri zoocoğrafik bölgelere göre Annulipes, Caspius, Communis, İntrudens, Mariae ve Punctor şeklinde isimlendirilen tür grupları altında toplanmıştır (Becker vd., 2003). Bu sistematik değişimlerin ülkemiz sivrisinek faunasındaki etkisi, *Ochlerotatus* cinsinin kapsadığı tür sayısında artma, *Aedes* cinsinin kapsadığı tür sayısında ise azalma şeklinde olmuş ve hem bu sistematik değişimlerin hem de ülkemizde son zamanlarda yapılan sistematik çalışmaların sonuçlarıyla *Ochlerotatus* cinsinin tür kompozisyonu oldukça değişmiştir. Böylece *Ochlerotatus caspius*, *Oc. cataphylla*, *Oc. communis*, *Oc. cyprius*, *Oc. detritus*, *Oc. dorsalis*, *Oc. echinus*, *Oc. excrucians*, *Oc. flavescens*, *Oc. geniculatus*, *Oc. lepidonotus*, *Oc. leucomelas*, *Oc. nigrocanus*, *Oc. phoeniciae*, *Oc. pulchritarsis*, *Oc. pullatus*, *Oc. punctor*, *Oc. refiki*, *Oc. rusticus* ve *Oc. zammitii* olmak üzere ülkemiz sivrisinek faunasının 20 türünü kapsayan *Ochlerotatus* cinsinin önemi oldukça artmıştır (Parrish, 1959; Ramsdale vd., 2001; Aldemir vd., 2009). Bu türlerden *Oc. phoeniciae*, *Oc. zammitii* ve *Oc. mariae* türü *Mariae* grubunu oluşturmaktadır. *Mariae* grubu, zoocoğrafik açıdan değerlendirildiğinde Akdeniz'i çevreleyen kıyusal bölgelerde dağılıma sahip bir tür grubu olarak kabul edilmektedir (Coluzzi ve Sabatini, 1968; Coluzzi ve Bullini 1971; Coluzzi vd., 1976; Bullini ve Coluzzi, 1982; Becker vd., 2003; Bueno-Mari ve İmenez-Peydro, 2011). Grup türleri birbirlerinden morfolojik olarak çok az farklılık göstermekle birlikte, Coluzzi vd. (1971) laboratuvar ortamında gerçekleştirdikleri çaprazlama çalışmalarında, *Oc. phoeniciae* ve grubun diğer iki üyesi arasında tam bir üreme bariyeri olduğunu göstermişlerdir. *Ochlerotatus mariae* ve *Oc. zammitii* arasında da hibrit kısırlığı tespit edilmiş olup, çaprazlamalarda F1 hibrit erkekleri kısmen kısırken, F1 hibrit dişilerinin üretken olduğu gösterilmiştir. *Ochlerotatus mariae* hariç grubun diğer iki türü ülkemizde kaydedilmiş olmakla birlikte, hem grup ile ilgili yeterli araştırma yapılmadığı hem de grup türlerinin morfolojik benzerliğinin fazlalığı nedeniyle uzun yıllar ülkemizdeki *Mariae* grubu türleri ve türlerin dağılımı ile ilgili kesin sonuçlar ortaya konulamamıştır. *Mariae* grubu ile ilgili ilk kayıt Martini (1927) tarafından verilmiş olup, Akdeniz Bölgesi'nin Adana-Mersin illeri kapsamındaki kıyusal kayalık lokalitelerde grup türlerinden sadece *Oc. mariae* türünün varlığı bildirilmiştir. Bu tespitten uzun bir süre sonra Parrish (1959) tarafından oluşturulan Türkiye sivrisinek listesinde, *Mariae* grubu türlerinden yine sadece *Oc. mariae* türünün Akdeniz kıyusal bölgelerimizde bulunduğu bildirilmiştir. Ülkemizde *Oc. mariae* türünün varlığına dair yapılan bu iki tespit, Coluzzi vd.

(1974a)'nin Akdeniz Bölgesi kıyısız alanlarından topladıkları *Mariae* grubu örneklerini morfolojik karakterlere dayanarak değerlendirdikleri çalışmaya kadar geçerli olarak kalmıştır. Araştırmacılar bu çalışmalarının sonucunda, daha önce *Oc. mariae* olarak bildirilen türün aslında *Oc. zammitii* olduğunu ve ayrıca grup türlerinden *Oc. phoeniciae*'nin de Türkiye'nin Akdeniz sahillerinde bulunduğunu bildirilmişlerdir. Ramsdale vd. (2001)'nin hazırlamış olduğu Türkiye sivrisinek faunası listesinde de bu son tespit kabul edilmiş ve ülkemizde *Mariae* grubunun *Oc. zammitii* ve *Oc. phoeniciae* olmak üzere sadece iki türünün varlığı bildirilmiştir.

### **2.3. *Ochlerotatus mariae* Grubunun Zoocoğrafik Dağılımı**

*Mariae* grubu türlerinin dünya genelinde sadece Akdeniz ülkelerinin kıyı kesimlerinde tespiti yapılabilmektedir. Romanya'nın Karadeniz kıyılarından *Oc. zammitii* türünün kaydı bildirilmişse de (Prioteasa ve Falcuta, 2010) bu kayıt doğrulanmamıştır. Grup türlerinin üçü de Akdeniz havzasında bulunmakla birlikte, türlerin Akdeniz ülkelerindeki dağılımları oldukça farklıdır. *Ochlerotatus mariae* türü, İber Yarımadası'nın Atlantik kıyısı da dahil Batı Akdeniz'de (Encinas Grandes, 1982), Cezayir, Tunus, Fas, İspanya, Tiran Denizi, Sicilya, İtalya, Balear Adaları ve Yunanistan (doğrulanmamış kayıt) dağılımlıdır (Coluzzi vd., 1975; Ribeiro vd., 1988; Bueno-Mari ve İmenez-Peydro, 2011). *Ochlerotatus phoeniciae* türünün dağılımı Akdeniz'in doğusunda (Coluzzi vd., 1975) olup, ülkemizde Doğu Akdeniz kıyıları, Güney Kıbrıs, Kıbrıs, İsrail, Lübnan ve Suriye'nin kıyısız bölgelerinden bildirilmiştir (Coluzzi, 1974a). *Ochlerotatus zammitii* türünün dağılımı genel olarak Orta Akdeniz bölgelerindedir ve İtalya'nın Adriyatik kıyıları, Balkanlar, Sicilya'nın doğusu, Malta, Yunanistan ve ülkemizin Batı Akdeniz kıyılarından kaydedilmiştir (Theobald, 1903; Labuda, 1969; Regner, 1969; Coluzzi, 1974a; Eritja vd., 2000; Ramsdale vd., 2001). Günümüzde, morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerden elde edilen sonuçlara göre, *Mariae* grubu türlerinin allopatrik dağılım sergiledikleri kabul edilmiş olup, ülkemiz hariç diğer Akdeniz Bölgesi ülkelerinin hiçbirinde türlerin herhangi ikisinin kaydı verilmemiştir (Coluzzi vd., 1974b; Becker vd., 2003; Tuncay vd., 2009). Ülkemizde *Oc. zammitii* Antalya'nın batısında Akdeniz ve Ege kıyılarında yayılış gösterirken, *Oc. phoeniciae* Antalya'nın doğusunda yayılış göstermekte olup, aynı lokalite içerisinde bu iki türün simpatrik popülasyonları tespit edilmemiştir (Coluzzi vd., 1974b; Tuncay vd., 2009). *Mariae* grubu türlerinin zoocoğrafik

dağılımıyla ilgili güvenilir sonuçlar ortaya koyabilmek için DNA temelli moleküler yöntemlerin uygulanmadığı dönemlerde daha çok biyokimyasal ya da çaprazlama çalışmalarına öncelik verilmiştir (Coluzzi ve Sabatini, 1968; Coluzzi ve Bullini 1971; Bullini ve Coluzzi, 1973; Coluzzi vd., 1976). Çaprazlama çalışmalarında farklı derecelerde de olsa, türler arasında hibrit kısırlıkları gösterilmiştir. Coluzzi ve Sabatini (1968) ve Coluzzi vd., (1971)'nin laboratuvar ortamında gerçekleştirdikleri çaprazlama çalışmalarında, *Oc. phoeniciae* ve diğer iki tür arasında tam bir hibrit kısırlığını saptanmışken, *Oc. mariae* ve *Oc. zammitii* türleri arasında sadece F<sub>1</sub> soyu hibrit erkeklerin kısır oldukları gösterilmiştir. Türlerin doğal habitatlarında *Oc. mariae* ve *Oc. zammitii* türleri arasında hibrit oluşumu test edildiğinde ise türler arasında çiftleşme öncesi çok güçlü bir izolasyon mekanizmasının olduğu belirlenmiştir (Coluzzi ve Bullini, 1971). Coluzzi ve Bullini (1971)'nin Sicilya'da yaptıkları serbest bırakma deneyleri sonucunda *Oc. zammitii* ve *Oc. mariae* türleri arasında meydana gelen hibritlerin doğada az olmasının nedeninin eşleşme öncesi izolasyon mekanizmalarının varlığı olabileceğini öne sürmüşlerdir. *Mariae* grubu türlerinin zoocoğrafik dağılımlarını etkileyen diğer bir önemli özellikleri, kıyı zonlarındaki genellikle de karstik kayalık alanlara bağımlı olan bir yaşam döngüsüne sahip olmalarıdır. Çünkü türlerin üreme habitatı bu kayalık alanlardaki küçük kaya havuzlarında deniz suyunun birikmesiyle oluşan alanlardır. Dolayısıyla, türlerin dağılım şeklini, yeteneğini, popülasyonların birbirinden ayrılığını/izolasyonunu etkileyen en önemli faktör bu kayalık habitatların belirli bir coğrafyada bulunup bulunmaması, devamlı olup olmamasıdır.

#### **2.4. *Ochlerotatus mariae* Grubunun Biyolojisi ve Vektörel Önemi**

*Ochlerotatus mariae* grubunun larvaları Akdeniz kıyı şeridi boyunca dalga etkisi altında bulunan zonlarda oluşmuş küçük kaya havuzlarını üreme alanı olarak kullanmaktadırlar. Bu havuzların tuz konsantrasyonu % 2-4 arasındadır fakat larvalar ortalama % 20 tuz konsantrasyonlarında da yaşayabilmektedirler (Rioux, 1958). Akdeniz bölgesinde *Mariae* grubu üyeleri yılda birkaç nesil verebilmektedir ve larvalar kayalık habitatlarda genellikle Mart-Ekim ayları arasında bulunabilmektedir. Kasım-Şubat aylarını kapsayan kış döneminde genellikle kurumuş kaya havuzlarında yumurta diyapozu ile kış dönemi geçirilmektedir. Yumurtalar kısa gün uzunluğu ve 16 °C'den daha düşük sıcaklıklarda inkübe edildiği zaman embriyonik diyapoz oluşmaktadır. Diyapozlu yumurtalarda



diyapozun çözülmesi ve kışlama dönemi tamamlanması ancak gün uzunluğu ve hava sıcaklığının artmasıyla gerçekleşmektedir. Kış dönemi süresince dalgaların etkisiyle birçok kez yumurtaların bulunduğu kaya havuzcukları su ile dolmasına rağmen ancak kışlama yapılan havuzcuklardaki deniz/yağmur suyunun ısınmasıyla birlikte yumurta diyapozu kırılabilen ve böylece kısa bir sürede embriyonik gelişim tamamlanarak yumurtalardan larvalar çıkmaktadır. Gün uzunluğu süresi dişilerde ovipozisyon davranışında da değişimlere neden olabilmektedir. Coluzzi vd. (1975), uzun gün uzunluğunda *Oc. mariae* dişilerinin ovipozisyona hazır olduğunu, kısa gün uzunluğunda ise ovipozisyona daha isteksiz olduklarını bildirmişlerdir. Dişiler diğer bütün sivrisinek dişileri gibi yumurta gelişimleri için kan emmeye ihtiyaç duyarlar ve insanlardan kan emme eğilimindedirler. *Ochlerotatus mariae* ve *Oc. zammitii* türlerinin kuşlarda sıtmaya neden olan *Plasmodium relictum*'a vektörlükleri bilinmektedir (Schaffner vd., 2001). Ayrıca, *Ochlerotatus* cinsi türlerinin bir çoğunun insan ve hayvanlarda önemli sorunlara neden olan arbovirüslere vektörlük yaptıkları iyi bilinmekte olup, bunlardan bir kısmı Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Schaffner vd., 2001; Becker vd., 2003). Bununla birlikte, insan sağlığı açısından *Mariae* grubu üyelerinin vektörel hastalıklarda etkin olduklarını kanıtlayacak bir sonuç bugüne kadar elde edilmemiştir. Fakat hem *Ochlerotatus* cinsindeki diğer türlerin çok farklı arbovirüslere vektörlükleri hem de grup türlerinin antropofilik davranış göstermeleri ve yayılış alanlarının insan hareketliliğinin yoğunlaştığı liman kentlerine ve turizm alanlarını sıklıkla kapsamaları nedeniyle vektörlük potansiyellerinin olması mümkün bulunmaktadır. Bu nedenle de, zaman içerisinde özellikle de arbovirüsler açısından vektörlük yeteneği kazanma riski yüksek bir sivrisinek grubu olarak kabul edilmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı *Ochlerotatus* türlerinin arbovirüs vektörlükleri

Tür	Vektörlük
<i>Oc. annulipes</i>	Tahyna virüsü doğal vektörü
<i>Oc. atropalpus</i>	Batı Nil virüsü deneysel vektörü
<i>Oc. caspius</i>	Tahyna ve Batı Nil virüsü doğal vektörü
<i>Oc. cantans</i>	Tahyna ve Batı Nil virüsü doğal vektörü
<i>Oc. dorsalis</i>	Tahyna virüsü doğal vektörü
<i>Oc. excrucians</i>	Batai, Tahyna ve Batı Nil virüsü doğal vektörü
<i>Oc. flavescens</i>	Tahyna virüsü deneysel virüsü
<i>Oc. geniculatus</i>	Sarıhumma ve Batı Nil virüsü deneysel vektörü
<i>Oc. japonicus</i>	Batı Nil virüsü doğal ve deneysel vektörü

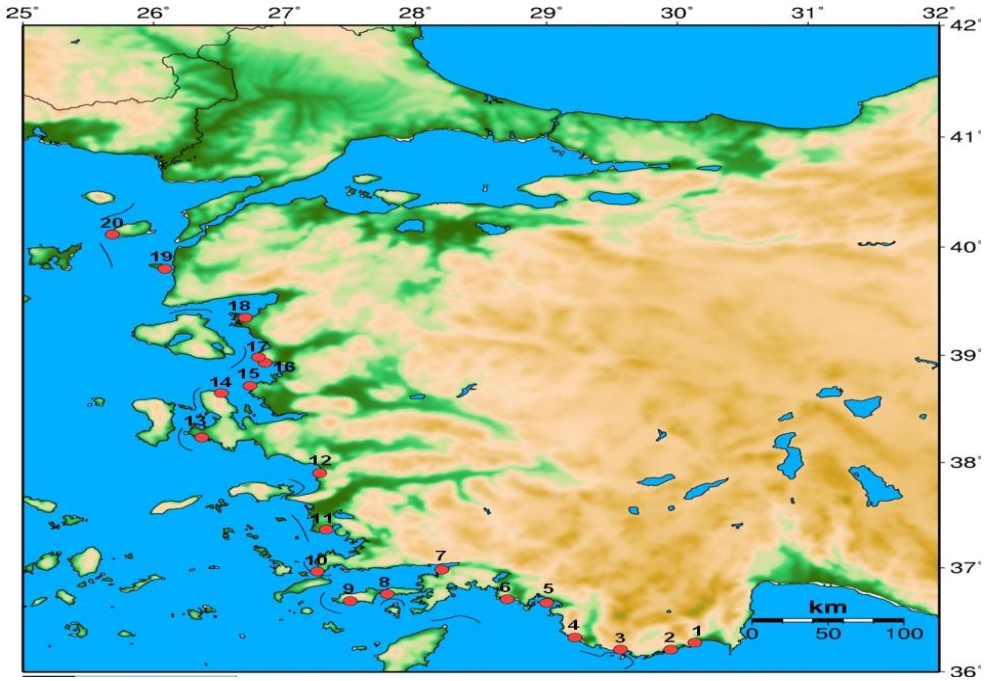
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Bölgesi ve Örneklemeye Lokaliteleri

*Ochlerotatus zammitii*, ülkemizde Antalya ilinin batısından başlayarak Ege ve Marmara bölgesine kadar dağılımı olan bir türdür. Bu nedenle, Antalya ilinin batısından başlayarak, Batı Akdeniz ve Ege Denizi kıyılarını takip eden, kuzey batıda Çanakkale İli sınırlarına ulaşan ve Bozcaada ile Gökçeada'yı da içine alan bölge araştırma alanı olarak belirlenmiştir. Ancak uzun ve dar bir kıyusal hattın oluşan bu coğrafik bölgede sadece *Oc. zammitii* türünün üreme alanı olarak kullanımına uygun olan kıyusal kayalık alanlar öncelikli olarak değerlendirilmiş ve Antalya, Muğla, Aydın, İzmir, Balıkesir ve Çanakkale illeri kapsamında türün örneklenebildiği lokaliteler araştırmaya dahil edilmiştir. Araştırma bölgesi kapsamında belirlenmiş olan 20 farklı lokaliteden *Oc. zammitii* türünün larva ve ergin örnekleri elde edilmiştir. Örneklerin alındığı lokaliteler Çizelge 3. 1'de listelenmiş, haritada (Şekil 3. 1) gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklemeye lokaliteleri

Lokalite No	Lokalite Adı	Koordinatlar	
		Kuzey	Doğu
1	Antalya-Finike	30° 08.489'	36° 16.735'
2	Antalya-Demre	29° 56.539'	36° 13.341'
3	Antalya-Kaş	29° 34.230'	36° 12.574'
4	Fethiye-Bükçeğiz	29° 13.426'	36° 19.682'
5	Muğla-Göcek	28° 51.011'	36° 39.764'
6	Muğla-Sarıgerme	28° 42.545'	36° 42.204'
7	Muğla-Marmaris	27° 47.291'	36° 45.547'
8	Muğla-Datça-1	28° 12.978'	36° 58.550'
9	Muğla-Datça-2	27° 30.902'	36° 40.655'
10	Muğla-Bodrum	27° 15.748'	36° 58.187'
11	Aydın-Didim	27° 19.261'	37° 21.885'
12	Aydın-Kuşadası	27° 16.084'	37° 54.334'
13	Çeşme-Alaçatı	26° 21.588'	38° 13.834'
14	İzmir-Karaburun	26° 31.367'	38° 38.958'
15	İzmir Yenifoça	26° 43.799'	38° 42.584'
16	İzmir-Çandarlı	26° 50.723'	38° 56.122'
17	İzmir-Denizköy	26° 47.989'	38° 59.426'
18	Balıkesir-Ayvalık	26° 41.729'	39° 20.909'
19	Çanakkale-Bozcaada	26° 04.739'	39° 48.085'
20	Çanakkale-Gökçeada	25° 40.492'	40° 07.460'



Şekil 3.1. Araştırma bölgesinde örnekleme lokalitelerinin dağılımı

### 3.2. Örnekleme Çalışmaları

Araştırma bölgesi kapsamında *Oc. zammitii* türünün hem larvalarının hem de erginlerinin örneklenmesine uygun çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, türün ekzofilik davranışlı olması, erginlerinin sadece kayalık üreme habitatlarında ya da yakınlarında saldırı yapmaları, ışık tuzaklarından ziyade konaklarına yönelme eğiliminde olmaları gibi nedenlerle ergin örnekleri larva örneklerine göre çok daha az yapılabilmektedir.

#### 3.2.1. Larva Örnekleme Çalışmaları

Araştırma bölgesi kapsamında *Oc. zammitii* türünün üreme habitatı olduğu belirlenen 20 lokalitede (Şekil 3.2-8) larva kepçeleri yardımıyla larva ve pupa örnekleri toplanmıştır. Elde edilen örnekler ayrı ayrı örnekleme kaplarına konularak, örnekleme zamanı ve koordinat bilgilerini de içerecek şekilde etiketlenmiş ve habitat suyu içeren taşıma kapları ile Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvarda canlı örneklerden bir kısmı moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere % 95'lik etil alkol

içeren örnek kaplarında etiketlenerek koruma altına alınmıştır. Kalan örneklerden seçilen IV. evre larvalar ile pupaların laboratuvar ortamında örnekleme alanlarına göre ayrı ayrı erginleştirme kaplarına alınarak erginleşmeleri sağlanmıştır. Sonuç olarak, üreme alanlarının birçoğundan hem larva-pupa hem de ergin sivrisinek örnekleri elde edilmiştir.

### 3.2.2. Ergin Örneklemeleeri

Ekzofajik ve zooantropofilik davranış sergileyen *Oc. zammitii* türünün ergin dişilerinin yakalanmasında bu davranış özelliklerinden yararlanılmış ve öncelikli olarak insan tuzaklarıyla larva örnekleme habitatları yakınlarında ağız aspiratörleriyle yakalamalar yapılmıştır. İnsan tuzaklarıyla örneklemeleeri yapılamadığı lokalitelerde ayrıca CDC (Centers for Disease Control) ışık tuzaklarıyla ergin yakalamaları yapılmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı moleküler çalışmalar için % 95'lik etil alkol içeren 1,5 ml.lik Eppendorf tüplere alınarak, bir kısmı da canlı ya da kuru örnek şeklinde laboratuvara taşınmıştır.



Şekil 3.2. Muğla, Bodrum lokalitesi (no: 10)



Şekil 3.3. Aydın, Didim lokalitesi ( no:11)



Şekil 3.4. Aydın, Kuşadası lokalitesi (no: 12)





Şekil 3.5. İzmir, Alaçatı lokalitesi (no: 13)



Şekil 3.6. Balıkesir, Ayvalık lokalitesi (no: 18)



Şekil 3.7. Çanakkale, Bozcaada lokalitesi (no:19)



Şekil 3.8. Çanakkale, Gökçeada lokalitesi (no: 20)

### 3.3. Laboratuvar Çalışmaları

Alansal örneklemelemlerden elde edilen materyalin değerdendirilmesi laboratuvar çalışmalarıyla yapılmıştır. Bu kapsamda, müze örneklerinin oluşturulması ve Leica S8 Apo stereo mikroskop ile dijital fotoğraflanması, örneklerin moleküler analizleri ve elde edilen verilerin değerdendirilmesi ile ilgili temel çalışmalar yürütülmüştür. Moleküler düzeyde, örneklerden DNA izolasyonu, elde edilen DNA'lar kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR), agaroz jel elektroforezi, örneklerin mtDNA *ND4* gen bölgesi dizilerinin ve elde edilen dizilerin analizine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Laboratuvar çalışmaları sırasında DNA'nın UV'ye, diğerd denatüre ajanlara veya herhangi bir kontaminasyona maruz kalmamasına dikkat edilmiştir. Ayrıca protein denatürasyonu, enzim inaktivasyonu gibi ürün kalitesini düşürecek kontaminasyon ve risklerden kaçınmak için buz içerisinde/üzerinde çalışılmıştır.

#### 3.3.1. Örneklerden Total DNA İzolasyonu

Örnekleme çalışmalarından elde edilen ve laboratuvar ortamında %95'lik etil alkol içeren 30 ml'lik Falcon tüplerinde +4 °C'de koruma altına alınmış olan örneklerden İnvitrogen PureLink genomik DNA kiti kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonlarında, Linton vd. (2001), Marinucci vd. (1999) ve Şimşek vd. (2011)'deki yöntemler kısmen değıştirilerek uygulanmış olup, çalışma yöntemine ait aşamalar aşağıda verilmiştir.

1. Kurutma kağıdı üzerinde birkaç dakika bekletilerek alkolü uçurulan örnekler Eppendorf tüplere alınmış ve üzerine 180 µl PureLink genomik parçalama tamponu eklenmiş ve steril makas yardımı ile mekanik olarak parçalanmıştır. Kısmen parçalanmış olan bu karışıma 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek, vorteksle karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen yeni karışım, 55 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosuna yerleştirilerek, parçalanmanın daha iyi sağlanması için bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası parçalanması tam olarak sağlanamamış büyük doku parçacıklarını uzaklaştırmak için de karışım 10.000 × g' de 1 dakika santrifüj edilmiş ve son olarak süpernatant temiz bir Eppendorf tüpe alınmıştır.

2. Parçalanma sonrası elde edilen ürünlere, önce 20 µl RNaz A (20 mg/ml) eklenmiş, vorteksle karıştırılmış ve sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe



edilmiştir. Daha sonra, 200 µl genomik parçalama/bağlama tamponu eklenerek elde edilen yeni ürün, önce homojenizasyon için, sonra da homojenize ürüne eklenen 200 µl % 96-100'lük etil alkolün karışımı için iki kez vorteks ile karıştırılmıştır.

3. Parçalama ve homojenizasyon sonrası elde edilen ve yaklaşık olarak 640 µl kadar olan karışım, PureLink genomik DNA kitinin toplama tüpü içerisindeki kolona yüklenmiştir. Daha sonra yükleme yapılan kolon 10.000 ×g' de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA'nın kolona bağlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolonun altındaki toplama kolonu ve içerisindeki sıvı kısım atılmış ve üzerinde DNA bağlı olan kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alınmıştır. Bu kolon, üzerine önce 500 µl yıkama tamponu 1 eklendikten sonra 10.000 ×g' de 1 dakika santrifüj edilmiş, sonra tekrar temiz bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu 2 eklenmiş ve maksimum hızda 3 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Son aşama olarak, kolona bağlanan DNA'yı kolondan ayırmak için kolona 50 µl yıkama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılmıştır. DNA'yı kolondan daha etkin bir şekilde ayırmak için bir kez daha 50 µl yıkama tamponu eklenip, 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından maksimum hızda tekrar 1 dakika santrifüj yapılmış ve elde edilen DNA PZR gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.3.2. *ND4* Gen Bölgesi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Moleküler analizleri yapılacak olan örneklerin DNA izolasyonları yapıldıktan sonra elde edilen total DNA'dan *ND4F* 5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3' ve *ND4R* 5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3' (Paduan ve Ribolla, 2008) primerleri kullanılarak Eppendorf marka PCR cihazında örneklerin yaklaşık 360 baz çiftinden oluşan mitokondriyal *ND4* (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz 4) gen bölgesi çoğaltılmıştır. *ND4* gen bölgesi için hazırlanan PZR reaksiyonu karışımı Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Hazırlanan PCR karışımıyla, 0.2 ml PCR tüplerinde Eppendorf marka ısı döngüleyici (thermal cycler) ile ilk denatürasyon 94 °C'de 3 dakika, daha sonra 45 döngü olacak şekilde 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye primer bağlanması (annealing), 72 °C'de 45 saniye uzama (extension) adımlarından oluşan reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 °C'de 10 dakika ekstra uzama

süresi ile reaksiyon devam ettirilmiş ve elde edilen PCR ürünü bir sonraki işleme kadar +4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu karışımı

<b>Reaktifler (Konsantrasyon)</b>	<b>Her bir PZR için hacim ( <math>\mu\text{L}</math> )</b>
Tampon (1X) [Fermentas]	2.5
dNTP (2.5 mM) [Fermentas]	5
Primerler (20 $\mu\text{M}$ ) [Bioron]	0.3
Taq DNA polimeraz (1.5 U) [Sigma]	0.2
DNA (100 ng)	2
Distile su	14.7
Toplam hacim	25

### 3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi, PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezi işlemlerinde PCR ürünlerinin 5  $\mu\text{l}$  6X yükleme tamponuyla (% 50 gliserol, 0,1M EDTA, % 1 SDS, % 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen siyanol) % 1'lik agaroz jelde, %1 etidyum bromürlü (EtBr) 1X TBE (Tris Borik Asit EDTA) tamponu kullanılarak elektroforezi yapılmıştır. % 2'lik jel hazırlanırken 2 g agaroz 100 ml 1X TBE tamponu (500 ml: 54 g Tris-base, 27,5 g Borik asit, 1,7 g Na<sub>2</sub>EDTA, pH: 8.0) içerisinde mikrodalga fırında eritilerek 40-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 1  $\mu\text{l}$  EtBr eklenerek iyice karıştırılmış ve jel kabına dökülerek katılaşması beklenmiştir. Hazırlanmış olan bu jelin ilk kuyucuğuna 5 $\mu\text{L}$  6X yükleme tamponu ve 3 $\mu\text{l}$  DNA büyüklük belirteci, diğer kuyucuklara da yine 5 $\mu\text{L}$  6X yükleme tamponu ile birlikte PCR ürünleri (5  $\mu\text{l}$  kadar) yüklenmiştir. Daha sonra, elektforez, 50 mA'de 1 saat çalıştırılmış ve ayırım sonucundaki jel görüntüsü Vilbert Lourmat görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır. Elde edilen jel görüntüsünde herhangi bir özgül olmayan bant olmadığında PZR ürünü doğrudan Invitrogen PureLink PCR saflaştırma kiti kullanılarak temizlenmiştir.

PZR ürünlerini dizi analizi öncesi temizlemek için PCR ürünlerinden yeni toplama tüplerine 40 µl alınarak üzerlerine 160 µl izopropanol içeren PureLink bağlama tamponu eklenmiş ve toplama tüpü içerisinde bulunan kolona yüklenmiştir. Örnekler 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın kolona bağlanması sağlanmış, diğer maddelerden arındırılmış ve toplama tüpü içerisindeki sıvı dökülmüştür. Daha sonra kolona etanol içeren yıkama tamponundan 650 µL eklenmiş ve 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki sıvı dökülmüştür. Kolonda kalabilecek etanolü tamamen uzaklaştırmak için de kolon tekrar maksimum hızda 3 dakika hiçbir şey ilave edilmeksizin santrifüj edilmiştir. Kolona bağlanan PZR ürününü buradan almak için kolon kitle verilen yıkama tüpleri içerisine yerleştirilmiş ve kolonun merkezine gelecek şekilde 50 µL yıkama tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra maksimum hızda 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece kolona bağlanmış DNA yıkama tamponuyla kolondan ayrılıp alttaki tüp içerisine alınmıştır.

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde tekrar yürütülmüş, temiz ürünün kalitesine kontrol edilmiştir. PCR temizleme kitinden geçirilen ve agaroz jelle kontrol edilen mtDNA *ND4* gen bölgesi PZR ürünlerinin aynı primer çifti ile enzimatik sentez yöntemi (Sanger ve Coulson, 1975) kullanılarak geliştirilmiş bir kapiller sistemle (Automatic Sequencer 3730xl) otomatik DNA dizi analizi yaptırılmıştır (Macrogen Inc., Güney Kore).

### **3.4. Veri Analizleri**

#### **3.4.1. mtDNA *ND4* Geni Dizilerinin Hizalanması**

Öncelikli olarak, ileri (forward) ve ters (reverse) PCR primerleri kullanılarak elde edilen mtDNA *ND4* gen bölgesi dizileri, BioEdit ver 7.0.9 (Hall, 1999) programı kullanılarak görüntülenmiştir. Daha sonra budiziler Clustal W çoklu dizi hizalama programı (Clustal W multiple sequence alignment program) ile hizalanmıştır. Gözle de kontrol edilen hizalama dizileri arasında uzunluk farklılıkları olması nedeniyle örneklerin başlangıç ve sonlanma noktalarından tekrar hizalamalar yapılarak diziler analizlere hazır duruma getirilmiş ve FASTA formatında kaydedilmiştir. Yapılan işlemler sonucunda, *Oc. zammitii* türü için hizalanan dizi uzunlukları 358 baz çiftinden oluşmuştur.

### 3.4.2. mtDNA *ND4* Geni Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği

*Ochlerotatus zammitii*'de mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid ( $\pi$ ) çeşitliliği (Nei, 1987) ile lokalite çiftleri arasındaki genetik farklılaşma düzeyinin göstergesi olan  $F_{ST}$  (Wright, 1951) ve  $\gamma_{ST}$  ( $\Gamma_{ST}$ ) (Nei, 1973) değerleri DNAsp ver 4.50 (Rozas vd., 2003) kullanılarak hesaplanmıştır. Daha sonra, bütün popülasyonlara ait *ND4* geni dizilerinin ortalama nükleotid çeşitliliği, haplotip sayısı, tüm popülasyonlar için polimorfik bölge sayısı, bireyler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalaması ( $K$ ), nükleotid çeşitliliği ( $\pi_1$ ) hesaplanmış ve bu nükleotid çeşitliliği Jukes ve Cantor metodu ile doğrulanmıştır ( $\pi_2$ ).

### 3.4.3. Haplotip Ağının Oluşturulması

Çalışmalar sonucunda elde edilmiş olan 126 adet hizalanmış mtDNA *ND4* geni dizi analizi veri seti ile *ND4* geni haplotipleri belirlenmiştir. Belirlenen haplotipler için, Templeton vd. (1992) de tanımlanan haplotiplerin istatistiksel “köksüz tutumluluk ağı” (Unrooted parsimony network), TCS v1.02 (Clement vd., 2000) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

### 3.4.4. Nötralite Testleri ve Uyumsuzluk Dağılımı Analizi

Popülasyonların dengede olup olmadığını ve popülasyonlarda var olan çok sayıdaki alel içerisindeki herhangi bir alel üzerinde seçim olup olmadığını test etmek amacıyla nötralite testlerine ait olan Tajima D (Tajima, 1996) ve  $F_u$ 's (Fu, 1997) istatistikleri ile popülasyonun geçmişi hakkında bilgi veren Uyumsuzluk Dağılımı Analizi Arlequin ver. 3.1 (Excoffier vd., 2006) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.4.5. Popülasyonlara Ait Uzaklığa Bağlı UPGMA Ağacının Oluşturulması

DnaSP 5.10 (Rozas vd., 2003) programı kullanılarak örnekleme lokalitelerinin ikili karşılaştırmalarına ait  $\gamma_{ST}$  değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra elde edilen  $\gamma_{ST}$  değerleri kullanılarak MEGA 5.05 (Kumar vd., 2004) programı ile UPGMA uzaklık ağacı oluşturulmuştur. Bu yaklaşımda, genetik uzaklık derecesini ifade eden ve bir lokusta iki alel olduğu zaman Wright (1951)'in  $F_{ST}$  değerine eşit olan  $\gamma_{ST}$  (Nei, 1973) değerinin 0-0.05 arasında olması, iki popülasyon arasındaki

genetik uzaklığın çok düşük; 0.05-0.25 arasında olması genetik uzaklığın orta düzeylerde ve 0.25'den daha yüksek olması ise genetik farklılaşmanın oldukça yüksek olduğunu ifade etmektedir.

#### **3.4.6. Populasyonların Genetik Yapısı ve Gen Akışının Hesaplanması**

Örnekleme lokaliteleri arasında coğrafik uzaklıklara ve istatistiksel verilere dayalı lokalite gruplamaları yapılarak, Arlequin ver. 3.1 (Excoffier vd., 2006) programı ile gruplara AMOVA (Excoffier vd., 1992) uygulanmıştır. AMOVA ile alel sıklıklarına dayalı genetik varyasyonun gruplar arasında, grup içi lokaliteler arasında ve lokaliteler içindeki dağılımı, istatistiksel önem dereceleri belirlenerek (1023 permütasyon) tespit edilmiştir. Ayrıca populasyonlar arası gen akışının matematiksel değeri olan Nm değeri DnaSP programı ile hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DNA İzolasyonu ve mtDNA *ND4* Gen Bölgesi Dizileri

Araştırma bölgesi kapsamında 20 lokaliteden toplanmış *Oc. zammitii* örnekleri kullanılarak yapılan DNA izolasyonu sonuçlarıyla, elde edilmiş *ND4* gen bölgesi dizilerine ait sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DNA izolasyonları, mtDNA *ND4* dizilerine ait sonuçlar

Lokalite No	Lokalite	<i>Ohlerotatus zammitii</i>		
		Örnek (n)	DNA	ND4
1	Antalya-Finike	11	4	3
2	Antalya-Demre	14	7	4
3	Antalya-Kaş	13	6	6
4	Fethiye-Bükceğiz	18	10	9
5	Muğla-Göcek	21	12	8
6	Muğla-Sarıgerme	36	10	8
7	Muğla-Marmaris	10	5	2
8	Muğla-Datça-1	26	10	10
9	Muğla-Datça-2	32	10	4
10	Muğla-Bodrum	19	8	6
11	Aydın-Didim	35	10	5
12	Aydın-Kuşadası	38	10	6
13	Çeşme-Alaçatı	31	10	10
14	İzmir-Karaburun	46	15	15
15	İzmir Yenifoça	13	6	6
16	İzmir-Çandarlı	26	6	4
17	İzmir-Denizköy	12	6	5
18	Balıkesir-Ayvalık	13	5	4
19	Çanakkale-Bozcaada	28	6	6
20	Çanakkale-Gökçeada	17	6	5
<b>TOPLAM</b>		<b>459</b>	<b>162</b>	<b>126</b>

Laboratuvar alışmaları sonucunda 20 lokalite kapsamında elde edilmiş örneklerden toplamda 162 DNA izolasyonu yapılmıştır. Farklı lokalite örneklerinden izole edilmiş bu 162 DNA'nın tamamı *Oc. zammitii* türünün mtDNA *ND4* gen bölgesi dizilerini elde etmek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, bazı DNA'lardan moleküler analizlerde kullanılabilirlikte ve güvenilirlikte *ND4* gen bölgesi dizilerinin elde edilememesi nedeniyle *ND4* gen bölgesi dizi sayısı, izolasyonu yapılmış olan DNA sayısından daha az olmuştur. Moleküler analizler öncesinde *ND4* gen bölgesi dizilerinin hizalanması ve analizlere uygun hale getirilmesi işlemleri sonucunda da lokaliteler genelinde, 358 baz çiftlerinden oluşan toplamda 126 adet *ND4* gen bölgesi dizisinden oluşan bir veri seti elde edilmiştir.

#### **4.2. mtDNA *ND4* Gen Bölgesi Haplotip Dağılımları, Frekansları ve Haplotip Ağı**

*Ochlerotatus zammitii* türünün mtDNA *ND4* gen bölgesi dizi analizlerinden elde edilen sonuçlar, türün dağılım yaptığı Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde *ND4* gen bölgesi için 22 haplotipe (Hap) sahip olduğunu göstermiştir. Haplotiplerin rnekleme lokalitelere göre dağılımı izelge 4.2' de verilmiştir. Tespit edilen bu haplotip dizileri 16 polimorfik, 12 parsimoni informatif bölgeden oluşmakta olup, mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotip dizilerine karşılık gelen polimorfik bölgeler izelge 4.3' de gösterilmiştir. Ayrıca, analizi yapılan 358 b. lik *ND4* gen bölgesi için nükleotid oranları, % 9.22 Sitozin (S); % 41.62 Timin (T); % 30.34 Adenin (A) ve % 18.83 Guanin (G) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Örnekleme lokalitelerine göre mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotiplerinin dağılımı

Lokaliteler	mtDNA <i>ND4</i> Haplotipler (1-22)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Finike																3						
Demre																3	1					
Kaş															1	1	2		2			
Bükceğiz	1															6	1				1	
Göcek	1				1								1	1		3						1
Sarıgerme	3								1							2		1		1		
Marmaris					2																	
Datça-1	7			2							1											
Datça-2	1									1	1	1										
Bodrum	2		1			3																
Didim	4						1															
Kuşadası	3	1	2																			
Alaçatı	6	4																				
Karaburun	10	5																				
Yenifoça	6																					
Çandarlı	1	3																				
Denizköy	4	1																				
Ayvalık	2	2																				
Bozcaada						2		4														
Gökçeada						5																
<b>Örnek Sayısı</b>	<b>51</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>



Çizelge 4.3. mtDNA *ND4* gen bölgesi dizilerinde polimorfik bölgeler

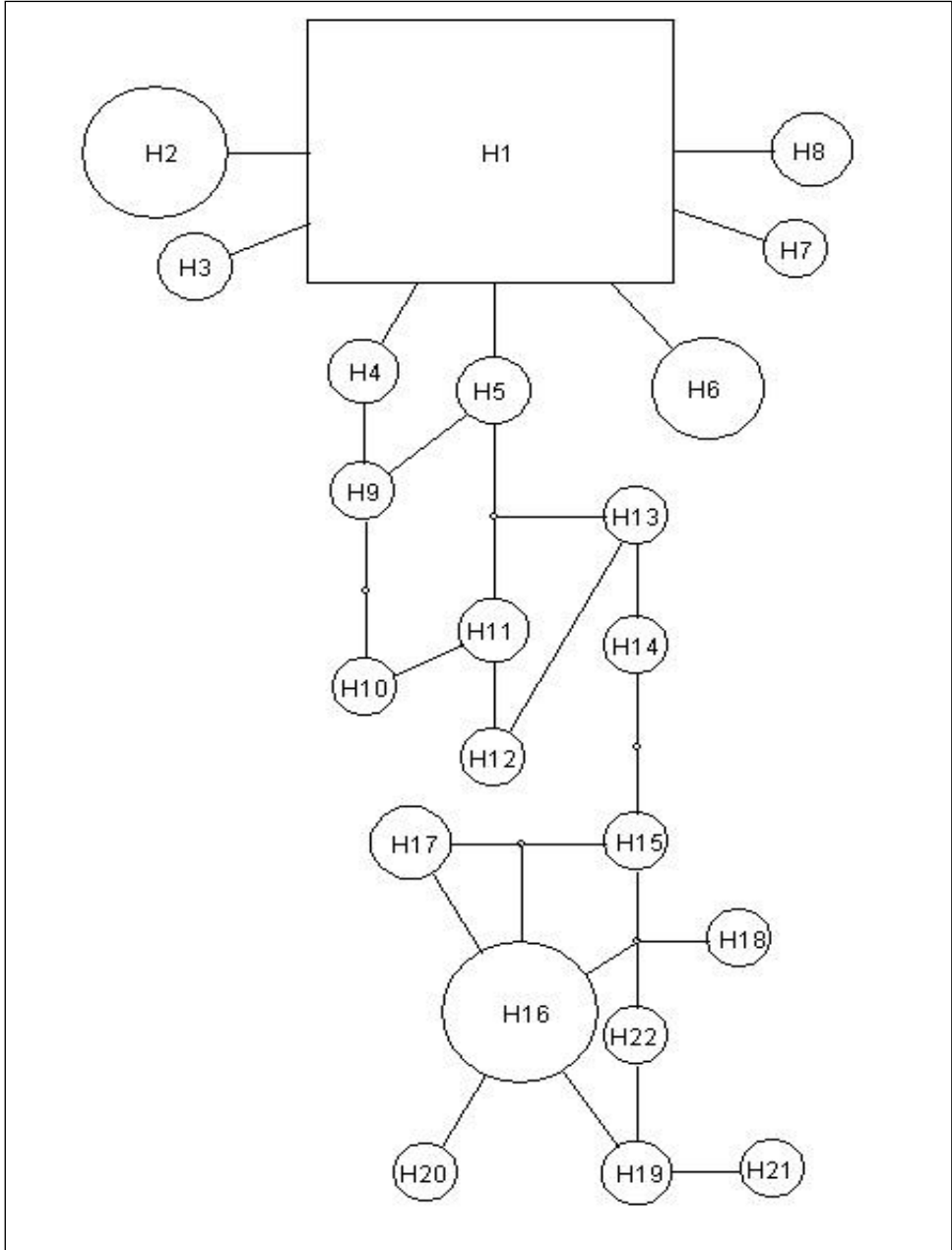
Haplotipler	Baz sırası															
	3	4	4	6	6	7	7	8	9	1	1	1	2	2	2	3
Hap1	A	G	G	A	G	T	A	G	C	A	C	G	A	A	T	T
Hap2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
Hap4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
Hap7	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Hap9	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Hap10	.	.	.	G	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
Hap11	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.
Hap12	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	T	A	.	.	.	.
Hap13	.	.	.	G	A	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.
Hap14	.	.	.	G	A	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.
Hap15	.	.	.	G	A	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap16	G	A	.	G	A	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap17	G	.	.	G	.	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap18	T	.	A	G	A	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap19	G	.	A	G	A	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap20	G	.	A	G	.	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	C
Hap21	G	.	A	G	.	.	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.
Hap22	G	.	A	G	A	C	.	.	T	.	T	A	T	.	.	.

Tespit edilen haplotipler içerisinde yüksek frekansa sahip olan haplotipler, Hap1 (% 40.47), Hap16 (% 14.28 ) ve Hap2 (% 12.69)'dir. En yüksek frekansa sahip olan Hap1, Finike, Demre, Kaş, Marmaris, Bozcaada ve Gökçeada lokaliteleri hariç, diğer 14 lokalitede bulunmaktadır. İkinci yüksek frekansa sahip olan Hap16, sadece Finike, Demre, Kaş, Bükceğiz, Göcek ve Sarıgerme'de bulunmaktadır. Üçüncü yüksek frekansa sahip olan Hap2 ise Yenifoça haricinde Bozcaada'ya kadar olan Kuşadası ve kuzeyindeki lokalitelerinin hepsinde tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek frekanslı olmasına rağmen Hap6 (%7.93) yalnızca Bozcaada, Gökçeada ve Bodrum lokaliteleri örneklerinde bulunabilmiştir. Araştırma alanı kapsamında *Oc. zammitii* popülasyonlarının mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotiplerine ait frekanslar değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. mtDNA *ND4* gen bölgesi haplotiplerine ait frekans değerleri

Haplotip	Haplotip frekansı (%)	Haplotip	Haplotip frekansı (%)
Hap1	40.47	Hap7	0.79
Hap16	14.28	Hap9	0.79
Hap2	12.69	Hap10	0.79
Hap6	7.93	Hap12	0.79
Hap8	3.17	Hap13	0.79
Hap17	3.17	Hap14	0.79
Hap3	2.38	Hap15	0.79
Hap5	2.38	Hap18	0.79
Hap11	1.58	Hap20	0.79
Hap4	1.58	Hap21	0.79
Hap19	1.58	Hap22	0.79

Örnekleme lokalitelerinin haplotip çeşitlilikleri de farklılıklar göstermiş olup, haplotip çeşitliliğinin en fazla olduğu lokaliteler, Göcek (Hap1, Hap5, Hap13, Hap14, Hap16 ve Hap22), Sarıgerme (Hap1, Hap16, Hap18, Hap19 ve Hap20), Bodrum (Hap1, Hap6 ve Hap3), Kuşadası ( Hap1, Hap2, Hap3), Kaş (Hap15, Hap16, Hap17 ve Hap19) ve Datça-2 (Hap1, Hap10, Hap11 ve Hap12) lokaliteleri olmuştur. Finike (Hap16), Marmaris (Hap5), Yenifoça (Hap1) ve Gökçeada'da (Hap6) lokalitelerinde ise tek tip haplotip tespit edilmiştir. Örnekleme lokaliteleri temelinde tespit edilen haplotip frekans ve dağılım verilerinden yararlanılarak, TCS programı ile popülasyonların haplotip ağı oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Haplotip ağına göre, ana olarak Hap1 ve Hap16 haplotipleri olmak üzere en yüksek frekansa sahip iki haplotip, iki ana grup ortaya çıkartmıştır. Oluşan bu haplotip ağına göre, ana grupları oluşturan Hap1 ve Hap16 dışındaki diğer haplotiplerden Hap2, Hap3, Hap4, Hap5, Hap6, Hap7 ve Hap8, Hap1den bir nükleotid ile farklılaşmaktadır. Hap9, Hap4 ve Hap5'in her birinden birer nükleotid ile Hap10 ise Hap9'dan iki ve Hap11den bir nükleotid ile farklılaşmaktadır.



Şekil 4.1. Lokalitelere göre mtDNA *ND4* geni haplotiplerinin istatistiksel köksüz tutumluluk ağı (Her bir haplotip frekansı ile temsil edilmektedir. Tam çizgiler haplotipleri % 95'ten daha yüksek bir olasılığa sahip olan tek bir mutasyonel değişimle bağlamaktadır).

### 4.3. Haplotip ( $H_d$ ), Nükleotit Çeşitliliği ( $\pi$ ) ve Nükleotit Farklılıklarının Ortalaması ( $K$ )

Çalışmalarla elde edilen mtDNA *ND4* gen bölgesi dizilerinin moleküler analizleri sonucunda, *Oc. zammitii* için belirlenmiş olan 22 haplotipinin, haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid ( $\pi$ ) çeşitliliği ile nükleotit farklılıklarının ortalaması ( $K$ ) için elde edilen değerler Çizelge 4.5’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre haplotip çeşitliliği 0 ile 1.000, nükleotid çeşitliliği ise 0 ile 0,01 arasındaki değerlerde kalmıştır. *Oc. zammitii* türünde en fazla haplotip çeşitliliği Datça 2 ( $H_d=1,00$ ) tespit edilmişken, nükleotit farklılıklarının ortalamasının en yüksek ( $K= 4,96$ ) olduğu sonuçlar Sarıgerme lokalitesinde bulunmuştur. Datça-2, lokalitesinin yanı sıra Göcek, Kaş, Sarıgerme, Bodrum ve Kuşadası lokalitelerinde de diğer lokalitelere göre daha yüksek haplotip çeşitliliği değerleri bulunmuştur. Finike, Marmaris, Yenifoça ve Gökçeada populasyonlarında ise sadece bir haplotip olması nedeniyle bu bölgelerde haplotip çeşitliliği ( $H_d$ ) değeri sıfır olmuştur.

Çizelge 4.5. mtDNA *ND4* gen bölgesi için tespit edilen haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ), nükleotit farklılıklarının ortalaması ( $K$ ) değerleri

Lokalite Adı	Haplotip çeşitliliği ( $H_d$ )	Nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ )	Nükleotit farklılıklarının ortalaması ( $K$ )
Datça-2	1,00	0,00698	2,50
Göcek	0,89	0,01170	4,00
Kaş	0,86	0,00447	1,60
Sarıgerme	0,85	0,01387	4,96
Bodrum	0,73	0,00261	0,93
Kuşadası	0,73	0,00240	0,86
Bükçeğiz	0,58	0,00660	2,36
Ayvalık	0,53	0,00180	1,06
Bozcaada	0,53	0,00290	1,06
Alaçatı	0,53	0,00149	0,53
Datça-1	0,51	0,00267	0,95
Çandarlı	0,50	0,00140	0,50
Demre	0,50	0,00140	0,50
Karaburun	0,47	0,00133	0,47
Denizköy	0,40	0,00112	0,40
Didim	0,40	0,00112	0,40
Gökçeada	0,00	0,00000	0,00
Yenifoça	0,00	0,00000	0,00
Marmaris	0,00	0,00000	0,00
Finike	0,00	0,00000	0,00
<b>Ortalama</b>	<b>0,79</b>	<b>0,00982</b>	<b>3,51</b>

#### 4.4. Nötralite Testleri ve Mismatch (Uyumsuzluk Analizi)

Populasyonlar içerisinde herhangi bir alel üzerinde seçim olup olmadığını gösteren Tajima D değeri; Demre, Bükçeğiz, Datça-1, Datça-2, Didim, Kuşadası, Çandarlı ve Denizköy populasyonlarında negatif olmuştur. Pozitif Tajima D değerinin bulunduğu diğer populasyonlarda da elde edilen değerler istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır ( $p>0.05$ ). Ayrıca, uyumsuzluk analizi sonuçlarına göre de Bükçeğiz ve Datça-1 ( $p<0.05$ ) populasyonları haricindeki diğer lokalitelerin hepsi nötral modeli reddetmektedir ( $p>0.05$ ). Finike, Gökçeada, Yenifoça ve Marmaris lokalitelerinde tek alel olması nedeniyle Fu değerleri ve uyumsuzluk dağılımları hesaplanamamıştır. Nötralite testi ve uyumsuzluk analizi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Nötralite testi ve uyumsuzluk dağılımı analiz sonuçları (D: Tajima's D; Fs: Fu's istatistik; SSD: sum of squared difference; p: İstatistiksel önemlilik derecesi)

Lokalite	D	p	Fs	p	SSD	p
<b>Finike</b>	0.0000	1.0000	-	-	-	-
<b>Demre</b>	-0.6123	0.3820	0.1718	0.3350	0.0219	0.6650
<b>Kaş</b>	1.1241	0.8660	-0.90929	0.1220	0.0404	0.3760
<b>Bükçeğiz</b>	-1.3208	0.08900	0.74965	0.65100	0.4459	0.0000
<b>Göcek</b>	1.4334	0.9410	-0.9591	0.2520	0.0178	0.7560
<b>Sarıgerme</b>	1.4216	0.9420	0.7760	0.6310	0.0866	0.1240
<b>Marmaris</b>	0.0000	1.0000	-	-	-	-
<b>Datça 1</b>	-1.2446	0.1020	0.3901	0.5150	0.2418	0.0010
<b>Datça 2</b>	-0.7968	0.1990	-1.5138	0.0520	0.0699	0.4570
<b>Bodrum</b>	0.3106	0.6850	-0.3041	0.21000	0.0309	0.4730
<b>Didim</b>	-0.8165	0.2850	0.0902	0.2890	0.0072	0.7730
<b>Kuşadası</b>	-0.0500	0.4450	-0.4267	0.1730	0.0636	0.2910
<b>Alaçatı</b>	1.3026	0.9380	1.0291	0.5980	0.0303	0.1600
<b>Karaburun</b>	1.1224	0.8960	1.1203	0.5980	0.0171	0.2330
<b>Gökçeada</b>	0.0000	1.0000	-	-	-	-
<b>Yenifoça</b>	0.0000	1.0000	-	-	-	-
<b>Çandarlı</b>	-0.6123	0.3810	0.1718	0.3460	0.0219	0.6480
<b>Denizköy</b>	-0.8165	0.2920	0.0902	0.3050	0.0072	0.7400
<b>Ayvalık</b>	1.6329	0.9560	0.5400	0.4470	0.0898	0.3150
<b>Bozcaada</b>	1.0319	0.8680	1.7231	0.7490	0.2036	0.2180

#### 4.5. Genetik Uzaklık ve UPGMA Ağacının Oluşturulması

Örnekleme lokalitelerinin ikili (pairwise) karşılaştırılmalarıyla elde edilen genetik uzaklık değerleri ( $\Gamma_{ST}$ ), bazı lokalitelerde yüksek derecede anlamlı farklılıkların varlığını göstermiştir ( $\gamma_{ST}$ : 0,68206;  $p < 0,01$ ). Her bir lokaliteye ait lokalitelerin genetik uzaklık derecesini ifade eden  $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$ : değerleri Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Lokalitelerin ikili karşılaştırmaları sonucunda Finike-Gökçeada; Finike-Marmaris; Finike-Yenifoça; Gökçeada-Marmaris; Gökçeada-Yenifoça ve Marmaris-Yenifoça lokalite çiftlerinin genetik olarak birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir ( $\gamma_{ST}$ : 1,000). Genetik olarak farklılaşmanın en az dolayısıyla birbirlerine en fazla benzeyen populasyonlar ise Alaçatı-Ayvalık; Alaçatı-Denizköy; Alaçatı-Karaburun; Alaçatı-Kaş; Ayvalık-Çandarlı; Ayvalık-Karaburun; Bükçeğiz-Kaş; Bükçeğiz-Demre; Bükçeğiz-Finike; Datça1-Denizköy; Datça1-Didim; Datça1-Yenifoça; Demre-Finike; Demre-Kaş; Denizköy-Karaburun; Denizköy-Kuşadası; Göcek-Sarıgerme ve Karaburun-Kuşadası populasyonlarıdır ( $\gamma_{ST}$ :  $< 0,5$ ;  $p < 0,01$ ).

Çizelge 4.7. mtDNA *ND4* geni genetik uzaklık ( $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$ ) değerleri ile lokalitelerin ikişerli karşılaştırmaları

Lokalite çiftleri	$\Gamma_{ST}$	$F_{ST}$	Lokalite çiftleri	$\Gamma_{ST}$	$F_{ST}$
Alaçatı-Ayvalık	0,00833	-0,2000	Bodrum-Datça1	0,16430	0,19048
Alaçatı-Bodrum	0,25752	0,31250	Bodrum-Datça2	0,45195	0,49756
Alaçatı-Bozcaada	0,34624	0,42857	Bodrum-Demre	0,84660	0,90652
Alaçatı-Bükçeğiz	0,71332	0,80732	Bodrum-Denizköy	0,21667	0,23077
Alaçatı-Çandarlı	0,10000	0,06061	Bodrum-Didim	0,21667	0,23077
Alaçatı-Datça1	0,14650	0,17284	Bodrum-Finike	0,86184	0,93913
Alaçatı-Datça2	0,47818	0,51852	Bodrum-Göcek	0,35768	0,48522
Alaçatı-Demre	0,87851	0,93849	Bodrum-Gökçeada	0,24510	0,30000
Alaçatı-Denizköy	0,04000	-0,0606	Bodrum-Karaburun	0,22727	0,29524
Alaçatı-Didim	0,17241	0,22222	Bodrum-Kaş	0,73793	0,81905
Alaçatı-Finike	0,88696	0,96825	Bodrum-Kuşadası	0,16923	0,14737
Alaçatı-Göcek	0,46131	0,55987	Bodrum-Marmaris	0,45098	0,72000
Alaçatı-Gökçeada	0,61702	0,80952	Bodrum-Sarıgerme	0,25629	0,35072
Alaçatı-Karaburun	0,00463	-0,0816	Bodrum-Yenifoça	0,26316	0,30000
Alaçatı-Kaş	0,00894	0,86207	Bozcaada-Bükçeğiz	0,64168	0,77204
Alaçatı-Kuşadası	0,11968	0,08696	Bozcaada-Çandarlı	0,43989	0,55238

Çizelge 4.7. devam ediyor

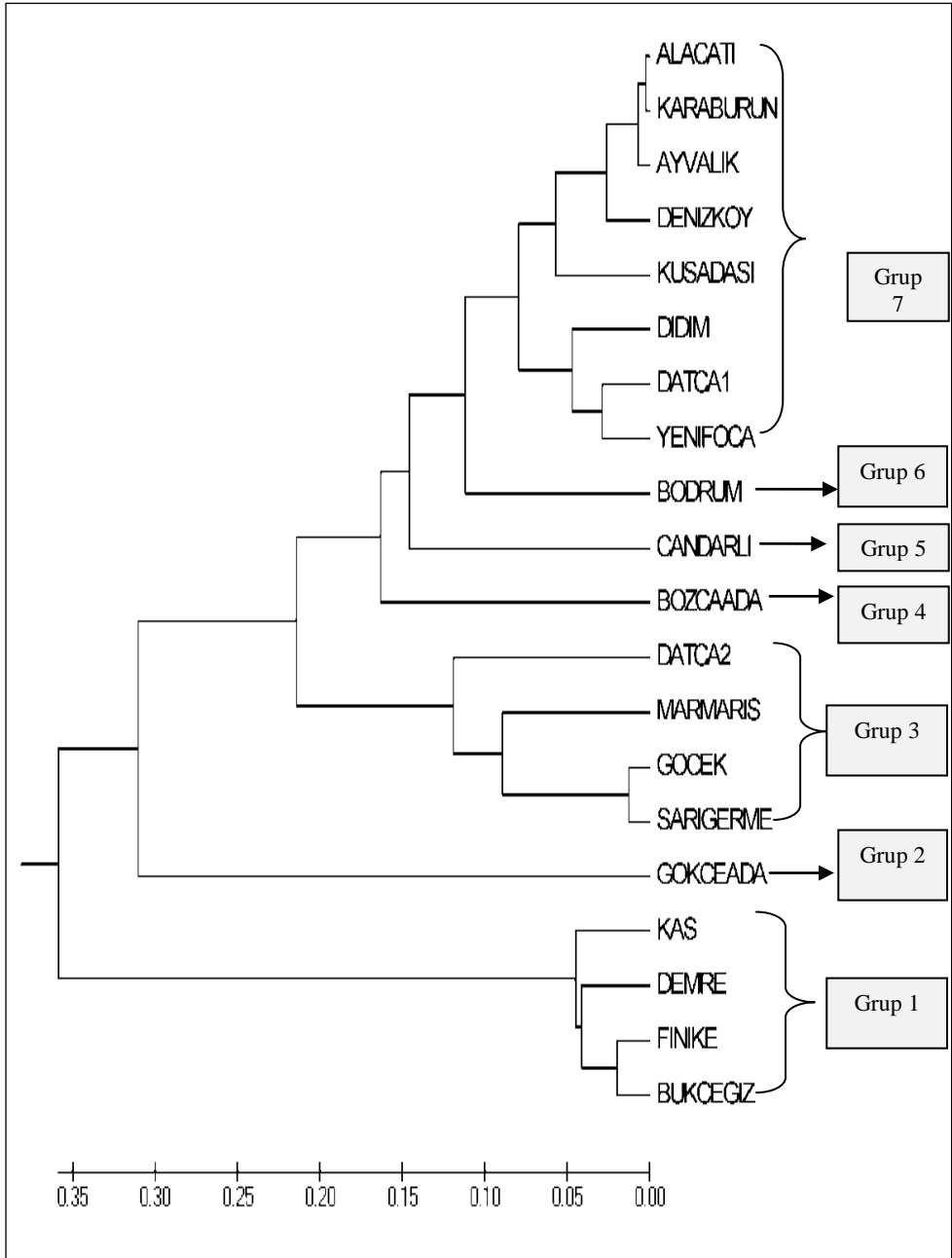
Lokalite çiftleri	Gamma <sub>ST</sub>	F <sub>ST</sub>	Lokalite çiftleri	Gamma <sub>ST</sub>	F <sub>ST</sub>
Alaçatı-Marmaris	0,44615	0,80952	Bozcaada-Datça1	0,25190	0,32593
Alaçatı-Sarıgerme	0,34688	0,42433	Bozcaada-Datça2	0,46970	0,52444
Alaçatı-Yenifoça	0,20000	0,33333	Bozcaada-Demre	0,84399	0,90600
Ayvalık- Bodrum	0,27536	0,31429	Bozcaada-Denizköy	0,31905	0,38889
Ayvalık-Bozcaada	0,34524	0,42222	Bozcaada-Didim	0,31905	0,38889
Ayvalık-Bükceğiz	0,62596	0,80109	Bozcaada-Finike	0,85542	0,93600
Ayvalık-Çandarlı	0,06667	-0,1666	Bozcaada-Göcek	0,39236	0,52500
Ayvalık-Datça1	0,14713	0,18889	Bozcaada-Gökçeada	0,47619	0,60000
Ayvalık-Datça2	0,46479	0,51282	Bozcaada-Karaburun	0,32258	0,42143
Ayvalık-Demre	0,90210	0,93137	Bozcaada-Kaş	0,74684	0,82609
Ayvalık-Denizköy	0,10000	-0,0666	Bozcaada-Kuşadası	0,30120	0,35556
Ayvalık-Didim	0,26364	0,23810	Bozcaada-Marmaris	0,46667	0,73333
Ayvalık-Finike	0,93396	0,96078	Bozcaada-Sarıgerme	0,29324	0,40189
Ayvalık-Göcek	0,36620	0,55556	Bozcaada-Yenifoça	0,38462	0,46667
Ayvalık-Gökçeada	0,73529	0,77778	Bükceğiz-Çandarlı	0,64278	0,81802
Ayvalık-Karaburun	0,01984	-0,1428	Bükceğiz-Datça1	0,65134	0,75966
Ayvalık-Kaş	0,76852	0,85532	Bükceğiz-Datça2	0,47864	0,61790
Ayvalık-Kuşadası	0,1441	0,08000	Bükceğiz-Demre	0,03965	-0,0300
Ayvalık-Sarıgerme	0,26254	0,42247	Bükceğiz-Didim	0,65688	0,81117
Ayvalık-Marmaris	0,62500	0,77778	Bükceğiz-Denizköy	0,65688	0,81117
Ayvalık-Sarıgerme	0,26254	0,42247	Bükceğiz-Didim	0,65688	0,81117
Ayvalık-Yenifoça	0,37500	0,33333	Bükceğiz-Finike	0,03955	0,03409
Bodrum-Bozcaada	0,23077	0,25000	Bükceğiz-Göcek	0,12789	0,11923
Bodrum-Bükceğiz	0,62491	0,76089	Bükceğiz-Gökçeada	0,64264	0,81360
Bodrum-Çandarlı	0,39542	0,49412	Bükceğiz-Karaburun	0,73099	0,80944
Bükceğiz-Kaş	0,03968	-0,0589	Demre-Karaburun	0,85970	0,94143
Bükceğiz-Kuşadası	0,65783	0,78796	Demre-Kaş	0,08654	-0,0080
Bükceğiz-Marmaris	0,47795	0,81360	Demre-Kuşadası	0,86742	0,91961
Bükceğiz-Sarıgerme	0,14779	0,15204	Demre-Marmaris	0,92373	0,96429
Bükceğiz-Yenifoça	0,69794	0,83398	Demre-Sarıgerme	0,21763	0,35714
Çandarlı-Datça1	0,26354	0,41778	Demre-Yenifoça	0,96154	0,96875
Çandarlı-Datça2	0,51351	0,57143	Denizköy-Didim	0,11111	0,00000
Çandarlı-Demre	0,91781	0,94286	Denizköy-Finike	0,94961	0,97561
Çandarlı-Denizköy	0,30250	0,30769	Denizköy-Göcek	0,38726	0,55556
Çandarlı-Didim	0,46346	0,52632	Denizköy-Gökçeada	0,76471	0,83333
Çandarlı-Finike	0,95139	0,97143	Denizköy-Karaburun	0,01587	-0,0952
Çandarlı-Göcek	0,39175	0,59091	Denizköy-Kaş	0,79213	0,86726
Çandarlı-Gökçeada	0,82237	0,85714	Denizköy-Kuşadası	0,09352	0,00000
Çandarlı-Karaburun	0,11837	0,16327	Denizköy-Marmaris	0,65000	0,83333
Çandarlı-Kaş	0,78507	0,87010	Denizköy-Sarıgerme	0,27523	0,41374
Çandarlı-Kuşadası	0,27083	0,31667	Denizköy-Yenifoça	0,12000	0,00000

Çizelge 4.7. devam ediyor

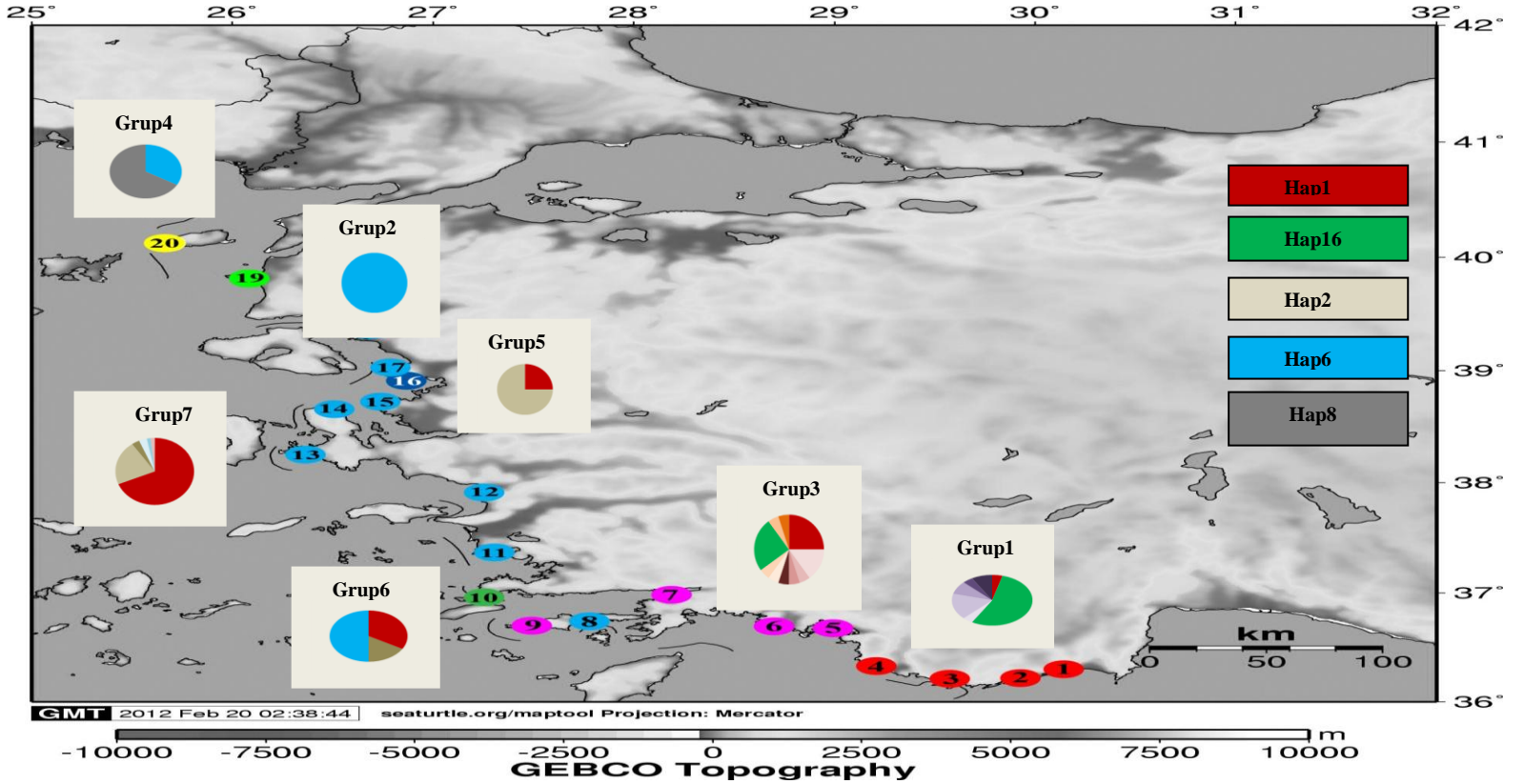
Lokalite çiftleri	Gamma <sub>ST</sub>	F <sub>ST</sub>	Lokalite çiftleri	Gamma <sub>ST</sub>	F <sub>ST</sub>
Çandarlı-Marmaris	0,73529	0,85714	Didim-Finike	0,94961	0,97561
Çandarlı-Sarıgerme	0,28922	0,46690	Didim-Göcek	0,38726	0,55556
Çandarlı-Yenifoça	0,64286	0,66667	Didim-Gökçeada	0,76471	0,83333
Datça1-Datça2	0,32108	0,36008	Didim-Karaburun	0,12057	0,17857
Datça1-Demre	0,80028	0,90548	Didim-Kaş	0,79213	0,86726
Datça1-Denizköy	0,06707	0,03175	Didim-Kuşadası	0,14123	0,09524
Datça1-Didim	0,06707	0,03175	Didim-Marmaris	0,65000	0,83333
Datça1-Finike	0,79599	0,93795	Didim-Sarıgerme	0,27523	0,41374
Datça1-Göcek	0,38199	0,47560	Didim-Yenifoça	0,12000	0,00000
Datça1-Gökçeada	0,45339	0,68148	Finike-Göcek	0,18947	0,38462
Datça1-Karaburun	0,12462	0,14095	Finike-Gökçeada	1,00000	1,00000
Datça1-Kaş	0,72843	0,81833	Finike-Karaburun	0,85882	0,97143
Datça1-Kuşadası	0,10805	0,08889	Finike-Kaş	0,14286	0,20000
Datça1-Marmaris	0,25217	0,63248	Finike-Kuşadası	0,88253	0,94902
Datça1-Sarıgerme	0,26938	0,32729	Finike-Marmaris	1,00000	1,00000
Datça1-Yenifoça	0,05753	0,04444	Finike-Sarıgerme	0,19695	0,39827
Datça2-Demre	0,71429	0,77778	Finike-Yenifoça	1,00000	1,00000
Datça2-Denizköy	0,47500	0,50847	Göcek-Gökçeada	0,37671	0,55556
Datça2-Didim	0,47500	0,50847	Göcek-Karaburun	0,48359	0,55972
Datça2-Finike	0,72656	0,81481	Göcek-Kaş	0,16556	0,19036
Datça2-Göcek	0,21402	0,27778	Göcek-Kuşadası	0,39965	0,53651
Datça2-Gökçeada	0,62500	0,66667	Göcek-Marmaris	0,20455	0,50000
Datça2-Karaburun	0,46167	0,51737	Göcek-Sarıgerme	0,02524	-0,0865
Datça2-Kaş	0,58995	0,67200	Göcek-Yenifoça	0,42353	0,57895
Datça2-Kuşadası	0,44182	0,48205	Gökçeada-Karabur.	0,55556	0,82143
Datça2-Marmaris	0,31818	0,44444	Gökçeada-Kaş	0,79439	0,87368
Datça2-Sarıgerme	0,18226	0,23443	Gökçeada-Kuşadası	0,58908	0,71111
Datça2-Yenifoça	0,53704	0,54545	Gökçeada-Marmaris	1,00000	1,00000
Demre-Denizköy	0,91842	0,94512	Gökçeada-Sarıgerme	0,28065	0,43265
Demre-Didim	0,91842	0,94512	Gökçeada-Yenifoça	1,00000	1,00000
Demre-Finike	0,12500	0,00000	Karaburun-Kaş	0,79843	0,86460
Demre-Göcek	0,20628	0,33333	Karaburun-Kuşadası	0,09766	0,07033
Demre-Gökçeada	0,95280	0,96429	Karabur.-Marmaris	0,37037	0,82143
Karaburun-Sarıger.	0,26938	0,32729	Kuşadası-Marmaris	0,44086	0,71111
Karabur.-Yenifoça	0,12500	0,28571	Kuşadası-Sarıgerme	0,29123	0,40195
Kaş-Kuşadası	0,76803	0,84255	Kuşadası-Yenifoça	0,16129	0,13333
Kaş-Marmaris	0,68000	0,87368	Marmaris-Sarıgerme	0,15244	0,39827
Kaş-Sarıgerme	0,18460	0,22773	Marmaris-Yenifoça	1,00000	1,00000
Kaş-Yenifoça	0,83333	0,89091	Sarıgerme-Yenifoça	0,30301	0,43265

Analizler sonucunda, *Ochlerotatus zammitii*'nin mtDNA *ND4* geni haplotip frekanslarına dayalı Gamma<sub>ST</sub> ikili karşılaştırma değerleri kullanılarak MEGA programıyla lokalitelerin genetik uzaklıklarını gösteren UPGMA uzaklık ağaçları oluşturulmuş, lokalitere göre türlerin gruplanması Şekil 4.2'de, haplotip dağılımlarını gösteren harita ise şekil 4.3'de verilmiştir.





Şekil 4.2. Örnekleme lokalitelerine göre mtDNA *ND4* geni haplotip frekanslarının  $\Gamma_{ST}$  ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı



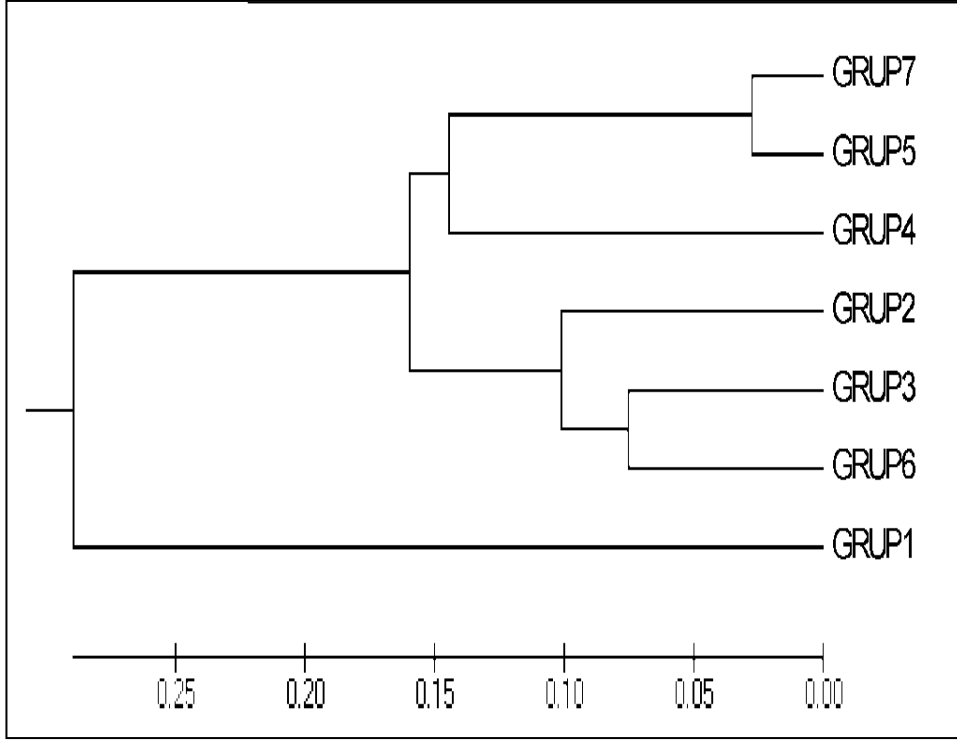
Şekil 4.3. Lokalitelere göre grupların ve haplotip dağılımlarının harita üzerindeki gösterimi (En sık görülen haplotipler sağda renkli olarak verilmektedir.)

*Ochlerotatus zammiti* türünün örneklendiği 20 lokaliteden elde edilen mtDNA *ND4* geni verilerine göre oluşturulan UPGMA uzaklık ağacında 7 grup ortaya çıkmıştır. Oluşan gruplama *Oc. zammiti* türünün coğrafik olarak dağılımını desteklemekte olsa da, coğrafik dağılıma göre önemli bulduğumuz farklılıklar da ortaya çıkmıştır. Bodrum, Çandarlı, Bozcaada ve Gökçeada olmak üzere tek bir lokaliteden oluşan dört grup vardır. Bu lokalitelerden Grup 2'yi oluşturan Gökçeada ve Grup 4'ü oluşturan Bozcaada lokalitelerinin ayrı gruplar oluşturması ve izole populasyonlar olarak uzaklık ağacında yer almaları beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte, benzer şekilde Grup 5'i oluşturan Bodrum ve Grup 6'yı oluşturan Çandarlı lokaliteleri de yakın coğrafyada bulunan diğer habitatlardan ayrılarak uzaklık ağacında ayrı dallar oluşturmuşlardır. Uzaklık ağacında 8 lokaliteyi içine alan Grup 7, diğer gruplara göre oldukça büyük bir coğrafyayı kapsamıştır.

Örnekleme lokaliteleri için oluşan yeni gruplandırmalara göre ikinci kez grupların ikiyeşerli karşılaştırmaları hesaplanmış (Çizelge 4.8) ve elde edilen gruplara ait yeni verilerle ( $\Gamma_{ST}$ ) UPGMA uzaklık ağacı tekrar oluşturulmuştur (Şekil 4.3).

Çizelge 4.8. mtDNA *ND4* geni verilerine göre lokalite gruplamalarına ait genetik uzaklık ( $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$ ) değerleri ile lokalitelerin ikiyeşerli karşılaştırılmaları

Lokalite Grupları	$\Gamma_{ST}$	$F_{ST}$	Lokalite Grupları	$\Gamma_{ST}$	$F_{ST}$
Grup1-Grup2	0,60478	0,88690	Grup3-Grup4	0,17846	0,42838
Grup1-Grup3	0,25382	0,37653	Grup3-Grup5	0,15506	0,49199
Grup1-Grup4	0,63314	0,83710	Grup3-Grup6	0,15041	0,37995
Grup1-Grup5	0,60292	0,87930	Grup3-Grup7	0,32468	0,42089
Grup1-Grup6	0,61551	0,83159	Grup4-Grup5	0,43989	0,55238
Grup1-Grup7	0,76261	0,86437	Grup4-Grup6	0,23077	0,25000
Grup2-Grup3	0,15947	0,48254	Grup4-Grup7	0,13752	0,37967
Grup2-Grup4	0,47619	0,60000	Grup5-Grup6	0,39542	0,49412
Grup2-Grup5	0,82237	0,85714	Grup5-Grup7	0,05505	0,28924
Grup2-Grup6	0,24510	0,30000	Grup6-Grup7	0,07802	0,23279
Grup2-Grup7	0,21181	0,77642			



Şekil 4.4. Lokalite gruplarının mtDNA *ND4* gen bölgesi  $\gamma_{ST}$  ikili karşılaştırılmalarına dayalı çizilen UPGMA ağacı

Grupların ikili karşılaştırmalarına ait elde edilen  $\gamma_{ST}$  değerlerine bağlı UPGMA ağacına göre Kaş, Demre, Finike ve Bükceğiz lokalitelerini içeren Grup 1, diğer gruplardan belirgin bir şekilde ayrılmaktadır. Çandarlı lokalitesini içeren Grup 5'in ise Datça1, Kuşadası, Didim, Denizköy, Karaburun, Alaçatı, Yenifoça ve Ayvalık lokalitelerini içeren Grup 7'ye genetik olarak en yakın grup olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.6. Populasyonlar Arası Gen Akışı

Gruplar arasında  $\gamma_{ST}$  ye dayalı olarak hesaplanan gen akışının göstergesi, Nm değeri 0,05 ile 4,29 arasında değişmiştir (Çizelge 4. 9). Birbirlerine genetik olarak en çok benzeyen Grup 5 ile Grup 7 ve Grup 6 ile Grup 7 arasındaki gen akışının en yüksek değer olduğu bulunmuştur ( $Nm > 1$ ). Gruplar arasında tespit edilen en düşük gen akışı ise Grup 2 ile Grup 5 arasında bulunmuştur.

Çizelge 4. 9. Gruplar arasında gen akışının  $\gamma_{ST}$  değeri üzerinden hesaplanan Nm değerleri

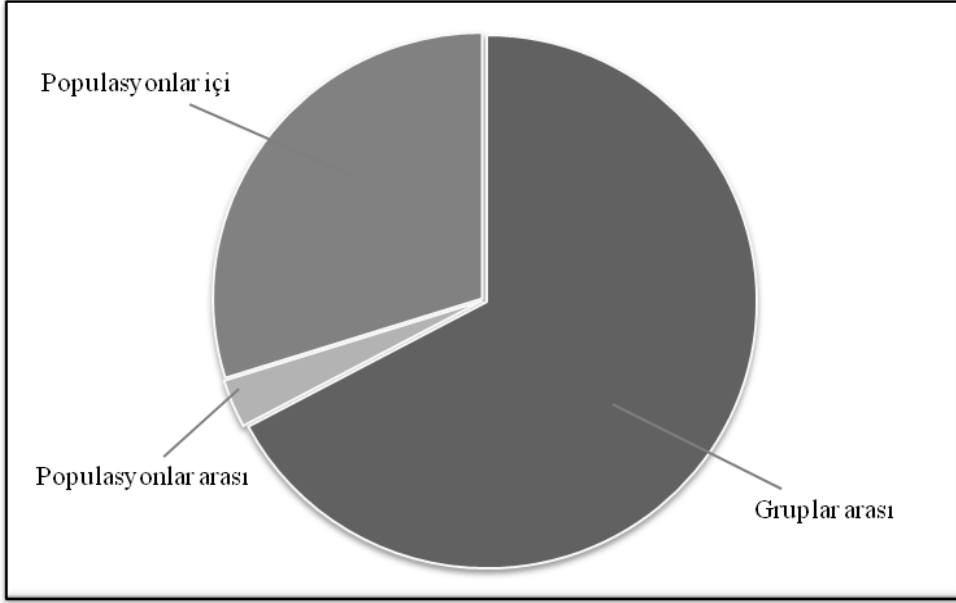
Gruplar	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
Grup 1	0,16	0,73	0,14	0,16	0,16	0,08
Grup 2		1,32	0,28	0,05	0,77	0,93
Grup 3			1,15	1,36	1,41	0,52
Grup 4				0,32	0,83	1,57
Grup 5					0,38	4,29
Grup 6						2,95

#### 4.7. Populasyonların Genetik Yapısı

*Oc. zammitii*'nin coğrafik dağılım alanlarına dayanarak oluşturulan gruplar ile yapılan AMOVA sonucunda gruplar arasında, grupları oluşturan populasyonlar arasında ve populasyonlar içinde olmak üzere üç düzeyde varyasyon tespit edilmiştir. Buna göre, gruplar arasındaki varyasyon bütün varyasyonun % 67.25'ini ( $p<0.05$ ), grupları oluşturan lokaliteler arasındaki varyasyon % 2.93'ünü ( $p<0.05$ ) ve lokaliteler içindeki varyasyon ise % 29.82'sini ( $p<0.05$ ) oluşturmaktadır (Çizelge 4. 10). Farklılaşma miktarlarının grafik üzerindeki dağılımı da Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Gruplar ve lokaliteler arasında varyans analizi (Grup sayısı:7; 1:Kaş, Demre, Finike, Bükçeğiz; 2:Gökçeada; 3: Göcek, Sarıgerme, Marmaris, Datça-2; 4: Bozcada; 5: Çandarlı; 6: Bodrum; 7: Alaçatı, Karaburun, Ayvalık, Denizköy, Kuşadası, Datça-1, Didim, Yenifoça)

<i>Oc. zammitii</i>	Varyasyon	Varyasyon Yüzdesi	Fiksasyon İndeksi	P
<b>Gruplar Arasında</b>	1.49909	67.25	0.67251 $F_{CT}$	0.00000
<b>Grup İçi Lokaliteler Arasında</b>	0.06522	2.93	0.08934 $F_{SC}$	0.02933
<b>Lokaliteler İçinde</b>	0.66480	29.82	0.70177 $F_{ST}$	0.00000



Şekil 4.5. AMOVA analizi ile elde edilen gruplar arasında, populasyonlar arasında ve populasyonlar içindeki farklılaşma miktarının dağılımı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sivrisinekler, hem kan emerek verdikleri zararlar nedeniyle hem de çeşitli patojen organizmalara vektörlükleri ile insan ve hayvan sağlığını etkileyen çok önemli canlı gruplarıdır. Bu nedenle, dünya genelinde ve ülkemizde sivrisineklerin yayılış alanlarının, biyolojilerinin, habitat özelliklerinin ve genetik yapılarının bilinmesi sivrisineklerle mücadelede önem teşkil etmektedir.

Ancak sivrisinek kökenli tehditler son yıllarda dünya genelinde artmasına karşın, ülkemizdeki sivrisinek temelli çalışmalar bu durumun aksine azalmış ya da genellikle daha önce yapılan araştırmaların bir değerlendirilmesi şeklinde (Kasap ve Kasap, 1983; Ramsdale vd., 2001) küçük ölçekli bölgesel incelemeler düzeyinde kalmıştır (Alptekin ve Kasap, 1996; Alten ve Boşgelmez, 1997; Alten vd., 2000; Şimşek, 2005; Aldemir ve Boşgelmez, 2006; Aldemir vd., 2010). Ülkemizde araştırmalar azalmış olmasına karşılık gerçekte birçok sivrisinek tür grubundaki özellikle de arbovirüslerin en önemli vektörlerini kapsayan *Ochlerotatus* türlerinin oluşturduğu gruplardaki sistematik sorunlar bugün de çözüm beklemektedir. Bu gruplardan bir tanesi *Mariae* grubudur ve gerçekleştirilen bu araştırmanın hedef türü olan *Oc. zammitii* türü ile birlikte *Oc. mariae* ve *Oc. phoeniciae* türlerini kapsar. *Mariae* grubu türlerinin zoocoğrafik dağılımına yönelik fazla araştırma yapılmamış olmakla beraber, dünya genelinde Akdeniz Havzası'nda yer alan ülkelerin kıyı bölgelerindeki uygun olan kayalık habitatlarda dağılım yapabildikleri gösterilmiştir (Coluzzi vd., 1975; Ribeiro vd., 1988; Bueno-Mari ve İmenez-Peydro, 2011). Grup türlerinin bu kısıtlı zoocoğrafik dağılımlarında belirleyici olan ve türlerin allopatrik dağılımlı olmalarını sağladığı kabul edilen en önemli etken, türlerin kıyı zonlarındaki genellikle de karstik kayalık alanlara bağımlı bir yaşam döngüsüne sahip olmalarıdır.

Çünkü türlerin üreme habitatı bu kayalık alanlardaki küçük kaya havuzlarında deniz suyunun birikmesiyle oluşan alanlardır. Dolayısıyla, türlerin dağılım şeklini, yeteneğini, popülasyonların birbirinden ayrılığını/izolasyonunu belirleyen, bu kayalık habitatların belirli bir coğrafyada bulunup bulunmaması, devamlı olup olmamasıdır. Günümüzde, morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerden elde edilen sonuçlarla, *Mariae* grubu türlerinin allopatrik dağılım sergiledikleri desteklenmiş olup, ülkemiz hariç diğer Akdeniz Bölgesi ülkelerinin hiçbirinde türlerin herhangi ikisinin kaydı verilmemiştir (Coluzzi vd., 1974b; Becker vd., 2003; Tuncay vd.,

2009). *Ochlerotatus phoeniciae* ve *Oc. zammitii* olmak üzere grubun iki türünün ülkemizde bulunması, Akdeniz Bölgesi'nin doğuda Suriye ve Ortadoğu bağlantısına ve Ege Bölgesi kıyısıal hattı boyunca Avrupa bağlantısına dayandırılabilir. Çünkü genel olarak değerlendirildiğinde *Oc. phoeniciae* türü Doğu Akdeniz, *Oc. zammitii* türü ise Batı Akdeniz ve Ege Denizi dağılımlıdır.

Bu araştırma, daha önce *Oc. zammitii* türüne yönelik yapılan araştırma sonuçları dikkate alınarak planlanmış olup, Antalya ilinin batısında Finike İlçesi'nden başlayarak Akdeniz ve Ege Denizi kıyısıal hattını izleyen, batıda Çanakkale İli sınırlarına ulaşan ve Bozcaada ile Gökçeada adalarını da kapsayan coğrafik bölgede gerçekleştirilmiştir. Bu coğrafik bölgede 20 lokaliteden *Oc. zammitii* örnekleri elde edilmiş ve bu örneklerle moleküler çalışmalar ve analizler gerçekleştirilmiştir. Araştırma bölgesi kapsamında dağılım yapan *Oc. zammitii* türünün tür içi genetik çeşitliliğini ortaya koyabilmek ve örnekleme lokalitelerine göre zoocoğrafik dağılım örüntüsünü belirleyebilmek amacıyla tür içi polimorfizmi yüksek olan mtDNA *ND4* gen bölgesi dizi verilerinden yararlanılmıştır. Mitokondriyal DNA'nın histon proteinlerinden yoksun olması, oksidatif fosforilasyon sonrası serbest radikallere maruz kalması ve etkili bir tamir mekanizmasının olmaması nedeniyle çok daha kolay mutasyona uğrayıp polimorfizm göstermektedir (Avice, 1999). Pek çok omurgalı ve omurgasız türlerinin ayırımında ve populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla tercih edilen mtDNA, araştırma türü *Oc. zammitii* ile ilgili ya da *Mariae* grubunun diğer türleri ile ilgili genetik araştırmalarda bugüne kadar kullanılmamıştır.

Ancak daha önceleri *Ochlerotatus*'un da bir alt cins olarak içerisinde yer aldığı *Aedes* cinsinin birkaç türüne yönelik yapılan populasyon genetiği çalışmalarında kullanılmıştır ve türlerin populasyon özelliklerini anlama açısından yararlı olan veriler elde edilmiştir. Paduan ve Ribolla (2008), Brezilya'da *Aedes aegypti*'nin populasyon genetiği çalışmasında mtDNA fragmentleri olan *COI* ve *ND4* gen bölgelerine ait verilerden yararlanmışlardır. Çalışmada *Aedes aegypti* populasyonlarında *ND4* gen bölgesinin 29 haplotipini tespit ederek, *ND4* gen bölgesinin, *COI* gen bölgesine göre, daha polimorfik olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, Bosio vd. (2005), Tayland'da *Aedes aegypti* mtDNA *ND4* gen bölgesine ait 7 haplotip tanımlamışlardır. Bu araştırmada da, daha önce yapılmış olan araştırma sonuçlarında polimorfik özellik gösterdiği tespit edilmiş olan mtDNA *ND4* gen bölgesinin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmış ve *Oc. zammitii*'nin populasyon genetiğine yönelik analizler mtDNA *ND4* gen



bölgesi verileri kullanılarak yapılmıştır. Bu doğrultuda, araştırma bölgesi kapsamında 20 lokaliteden elde edilen *Oc. zammitii* örneklerinin 126'sından mtDNA *ND4* gen bölgesi çoğaltılmış ve gen bölgesi içerisindeki 358 baz çiftinden oluşan diziler ile türün zoocoğrafik dağılım yaptığı örnekleme lokalitelerindeki genetik yapısına yönelik bilgiler elde edilmiştir. Dizileri elde edilen bölgenin analiz sonuçları, bölge içerisinde 342 nükleotidin korunduğunu, 16 nükleotidin polimorfizm gösterdiğini ortaya koymuştur. Polimorfizm gösteren 16 nükleotidin 12'si ise parsimoni informatif bölgelerdir.

Ayrıca, mtDNA *ND4* gen bölgesi dizilerinin analizleri sonucunda, dizi içerisinde 46 transisyon, 8 transversiyon olmak üzere toplam 54 substitisyon tespit edilmiş olup, araştırma bölgesi kapsamında 20 üreme habitatından örneklenen *Oc. zammitii*'nin mtDNA *ND4* gen bölgesi için 22 haplotip belirlenmiştir. Örnekleme lokalitelerinden Datça 2, Göcek, Sarıgerme, Kaş, Bodrum, Kuşadası ve Bükçeğiz poplasyonlarının haplotip çeşitlilikleri diğer lokalitelere göre oldukça fazla bulunmuştur. Tespit edilen bu 22 haplotip; Hap1 ve Hap16 haplotipleri olmak üzere iki ana hat oluşturmaktadır. En yüksek frekansa sahip olan Hap1 haplotipi (% 40.47) araştırma bölgesi kapsamında Finike, Demre, Kaş, Marmaris, Bozcaada ve Gökçeada lokaliteleri hariç geri kalan 14 lokalitenin tamamında bulunmaktadır. Diğer taraftan, ikinci derece yüksek frekansa sahip olan Hap16 haplotipi (% 14.28), sadece Finike, Demre, Kaş, Bükçeğiz, Göcek ve Sarıgerme lokalitelerinde bulunmaktadır. Bu lokaliteler arasındaki gen akışı verilerine bakıldığında, Finike-Demre, Demre-Kaş, Kaş-Bükçeğiz, Bükçeğiz-Göcek ve Göcek-Sarıgerme arasında gen akışının sayısal ifadesi olan Nm değerleri sırasıyla 1,75; 2,64; 6,05; 1,70 ve 9,65'dir. Nm değerinin 1.0'in üzerinde olması bu lokaliteler arasında gen akışı olduğu ve bu değerlerin artması da gen akışının fazla olduğu anlamına gelmektedir.

Diğer bir deyişle Fiksasyon İndeksi'nin düşük olması bu lokalitelerde genetik sürüklenme, kurucu etkisi, vektör kontrol çalışmaları sonrasında meydana gelen darboğaz ve coğrafik izolasyon gibi çeşitli olaylarla genetik çeşitliliğinin azalmadığı anlamına gelmektedir. En yüksek frekansa sahip Hap1 haplotipinden bir baz ile farklılaşarak 3. yüksek frekansa sahip olan Hap2 haplotipi (% 12.69), Yenifoça haricinde Kuşadası ve Kuşadası'nın kuzeyinde Bozcaada ve Gökçeada'ya kadar olan diğer 6 lokalitede bulunmakta, ancak Bozcaada ve Gökçeada'da bulunmamaktadır. Nitekim coğrafik olarak birbirlerine yakın bu 6 lokalite arasındaki gen akışı da Kuşadası-Alaçatı arasında 1,84; Alaçatı-Karaburun

arasında 53,75; Karaburun-Çandarlı arasında 1,86; Çandarlı-Denizköy arasında 1,12 ve Denizköy-Ayvalık arasında 2,25 olarak bulunmuştur. Bu 6 lokalite ile çalışma alanımız içerisinde coğrafik olarak en uzak konumda olan lokalitelerden biri olan Bozcaada arasındaki gen akışı 0,47 gibi çok düşük bir değere sahiptir. En yüksek frekansa sahip olan Hap1 haplotipinden 1 baz ile farklılaşan H6 (%7.93) haplotipi ise yalnızca Gökçeada, Bozcaada ve Bodrum lokalitelerinde ve yine Hap1'den 1 baz ile farklılaşan Hap8 haplotipi ise yalnızca Bozcaada lokalitesinde bulunmaktadır. Gökçeada ve Bozcaada arasındaki gen akışı ise 0.28dir. Bozcaada ve Gökçeada, gruplar için oluşturulan UPGMA ağacında da görüldüğü gibi diğer gruplardan ayrılmaktadır. Wright (1951)'in ada modeli, Bozcaada ve Gökçeada gibi uzaklıkla izolasyonun tespit edildiği ada populasyonlarında dışarıdan gen akışını etkileyecek bir yapay etki olmadıkça zaman içerisinde populasyonun dengeye ulaşacağını öngörmektedir. Ayrıca bu iki adanın birbirlerine yakın olmasına rağmen aralarındaki gen akışının az olması burada daha önce meydana gelmiş vektör kontrol çalışmaları ile populasyonların dar boğaza girmesi sonucu bazı alellerin kaybedilmiş olabileceği veya genetik sürüklenme ya da kurucu etkisiyle kurulmuş olabilecek bu populasyonların birbirlerinden tam olarak farklılaşacak kadar zaman geçirmiş olabilecekleri öngürüsünü oluşturmuştur.

Örneklemelerin yapıldığı 20 lokaliteye ait *Oc. zammitii* populasyonları, farklılaşma derecelerini ifade eden  $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$  değerlerine bağlı olarak oluşturulan UPGMA ağacında lokaliteler coğrafik uzaklıklarına dayanarak 7 gruba ayrılmıştır. Nitekim AMOVA sonuçlarına göre çalışma alanımız içerisinde üç düzeyde elde edilen moleküler varyans dereceleri de ortaya çıkan bu gruplandırmayı destekleyici bir şekilde; 7 grup arasındaki varyasyonun yüzdesi %67.25 ( $p<0.05$ ); grup içerisinde lokaliteler arasında % 2.93 ( $p<0.05$ ) ve lokaliteler içerisinde ise % 29.82 ( $p<0.05$ ) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu gruplamalarda da 1. grubu oluşturan ve birbirleri arasındaki gen akışı yüksek olan Finike, Demre, Kaş ve Bükçeğiz lokaliteleri dış grup olarak diğer gruplardan belirgin bir şekilde ayrılmaktadır (Bkz. Şekil 4.2). Grup 1 ve diğer gruplar arasında ise çok düşük miktarda gen akışı bulunmaktadır. Gen akışının azalmasının sebebi olarak bu lokalitelerin diğer lokalitelerden coğrafik olarak izole olması ve aralarındaki uzun kumsalların bu türler için bariyer teşkil edeceği düşünülmektedir. Coluzzi ve Bullini (1971), çalışmalarında 25 km.den daha fazla olan kumsalların türlerin farklılaşmasında rol aldığını belirtmektedirler.

Bu nedenle, Grup 1'i oluşturan Finike, Demre, Kaş ve Bükçeğiz lokalitelerinin, bu grup lokalitelerine en yakın konumda bulunan ve Grup 3'ü oluşturan Göcek, Sarıgerme, Marmaris ve Datça 2 lokalitelerinden Patara sahilleri ile ayrılmış olabileceği öngörülmüştür. Diğer taraftan, mtDNA *ND4* geni verilerine göre oluşan gruplama *Oc. zammiti* türünün coğrafik olarak dağılımını Grup 1 ve Grup 3 arasında olduğu gibi desteklese de, coğrafik dağılıma göre önemli bulduğumuz farklılıklar da ortaya çıkmıştır. Bodrum, Çandarlı, Bozcaada ve Gökçeada olmak üzere tek bir lokaliteden oluşan dört ayrı grup da vardır. Bu lokalitelerden Grup 4'ü oluşturan Bozcaada ve Grup 2'yi oluşturan Gökçeada lokalitelerinin ada olmaları nedeniyle ayrı gruplar oluşturması ve izole popülasyonlar olarak uzaklık ağacında yer almaları beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte, benzer şekilde Grup 6'yı oluşturan Bodrum ve Grup 5'i oluşturan Çandarlı lokaliteleri de yakın coğrafyada bulunan diğer habitatlardan ayrılarak uzaklık ağacında ayrı dallar oluşturmuşlardır. Uzaklık ağacında 8 lokaliteyi içine alan Grup 7, diğer gruplara göre oldukça büyük bir coğrafyayı kapsamıştır. Bu durum da, coğrafik bariyerlerin dışında *Oc. zammiti* türünün dağılım örüntüsünde antropojenik etkiler gibi başka diğer faktörlerin de etkin olabileceği öngörüsünü oluşturmaktadır. Aralarındaki coğrafik uzaklığa rağmen Grup 6'yı oluşturan Bodrum ve Grup 2'yi oluşturan Gökçeada arasındaki düşük  $F_{ST}$  değeri ve paylaşılan Hap6 haplotipi bu iki popülasyon arasında gen akışının devam ettiğinin göstergesidir. Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, Bosio vd. (2005), *Aedes aegypti* ile yaptıkları çalışmalarında uzaklıkla izolasyonun olmamasına rağmen gen akışının yüksek olmasının sebebini pasif hareket olarak tanımlanan insan hareketlerine bağlamışlardır.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile elde edilen sonuçların tamamı *Ochlerotatus zammitii* türü için ilk kez elde edilmiş verilerdir. Özellikle de *ND4* gen bölgesi için belirlenmiş haplotipler literatür açısından yeni sonuçlar olup, bu türün zoocoğrafik dağılım örüntüsü ve genetik çeşitliliği açısından önemli bir veri seti oluşturmuştur. Dünyanın diğer bölgelerinde benzer araştırmalar özellikle *Aedes* cinsi kapsamındaki vektörel açıdan önemli olan türlerle ilgili olarak yapılmıştır ve mtDNA *ND4* ya da *ND5* genleri dizi verilerine dayanan çalışmalarla farklı türler için çalışmalarımızda olduğu gibi çok sayıda *ND4* ya da *ND5* geni haplotipi belirlenmiştir. Böylece, çalışmalardan elde edilen verilerle arbovirüs vektörlükleri açısından dünyanın en tehlikeli sivrisinekleri olarak kabul edilen *Aedes aegypti* (Bosio, vd., 2005; Bracco vd., 2007; Junior ve Scarpassa, 2009), *Aedes albopictus*

(Kambhampati ve Rai, 1991; Maia vd., 2009) türlerinin populasyon genetiğine dair önemli sonuçlara ulaşılmış ve bu türlerin kontrolünde doğru mücadele stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen veriler ile de benzer şekilde ülkemizde vektörel açıdan önemli olabilecek, antropofilik eğilimi yüksek olan *Oc. zammiti* türüne yönelik önemli sonuçlara ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aldemir, A., Boşgelmez, A., 2006. Population dynamics of adults and immature stages of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in Gölbaşı district, Ankara. **Turk. J. Zool.**, 30: 9-17.
- Aldemir, A., Erdem, F., Demirci, B., Bedir, H., Koç, E., 2009. Species composition and seasonal dynamics of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in Kars plateau and six new records for Turkey. **5th Int. Cong. of Vector Ecology**, pp: 138, Antalya, Turkey.
- Aldemir, A., Bedir, H., Demirci, B., Alten, B., 2010. Biting activity of mosquito species (Diptera: Culicidae) in the Turkey-Armenia border area, Ararat Valley, Turkey. **Journal of Medical Entomology**, 47: 22-27.
- Alptekin, D., Kasap, H., 1996. Tarsus (İçel) yöresinde *Anopheles sacharovi* erginlerinin mevsimsel kan emme ve parite oranları ile ergin ve ergin öncesi populasyon yoğunluğu. **Tr. J. of Zoology**, 20: 21-26.
- Alten, B., Boşgelmez, A., 1997. Muğla İli, Ortaca ve Dalaman yörelerinde bulunan *Culex* (Diptera:Culicidae) türlerinin krepuscular-nocturnal davranışları, aktivasyon katsayıları ve vektör potansiyeli formülleri. **II. Tr. J. of Zoology**, 21: 7-19.
- Alten, B., Bellini, R., Çağlar, S.S., Şimşek, F.M., Kaynaş, S., 2000. Species composition and seasonal dynamics of mosquitoes in The Belek region of Turkey. **Journal of Vector Ecology**, 25: 146-154.
- Alten, B., Kampen, H., Fontenille, D., 2007. Malaria in Southern Europe: resurgence from the past?. *Emerging Pest and Vector-borne Diseases in Europe*, ed: Takken, W., Knols, B.G.J, Pp: 35-57, Wageningen.
- Awise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Beaty, B.J., Marquardt, W.C., 1996. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, 632, USA.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Lane, J., Kaiser, A., 2003. *Mosquitoes and Their Control*. Kluwer academic/ Plenum publishers, 219, New York.
- Belkin, J. N., 1962. *The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae)* [sic] Volumes I and II. Berkeley and Los Angeles, CA: Univ. Calif. Press

- Birungi, J., Munstermann, L.E., 2002. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial *ND5* sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 95: 125–132.
- Bosio, C.F., Harrington, L.C., Jones, J.W., Sithiprasasna, R., Norris, D.E., Scott, T.W., 2005. *Aedes Aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 72(4): 434-442.
- Bracco, J.E., Capurro, L.M., Oliveira, R.L., Sallum, M.A.M., 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 102(5): 573-580.
- Bueno-Mari, R., Jimenez-Peydro, R., 2011. First confirmed record of *Ochlerotatus mariae* (Sergent & Sergent, 1903) in the Balearic Islands (Spain) and its significance in local mosquito control programmes. **European Mosquito Bulletin**, 29: 82-87.
- Bullini, L., Coluzzi, M., 1982. Evolutionary and taxonomic inferences of electrophoretic studies in mosquitoes. Developments in the Genetics of Disease Vectors, Stipes publishing company, pp.465-482, Italy.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer programme to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9: 1657–1660.
- Collins, F. H., Paskewitz, S. M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. **Insect Molecular Biology**, 5: 1–9.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., 1968. Divergenze morfologiche e barriere di sterilita nel complesso *Aedes mariae* (Diptera: Culicidae). **Riv. Parasittologia**, 29: 49-70.
- Coluzi, M., Bullini, L., 1971. Enzyme variants as markers in the study of preopulatory isolating mechanisms. **Nature**, 231: 455-456.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Bullini, L., Ramsdale, C., 1974a. Nuovidati sulla distribuzione delle specie del complesso *mariae* del genere *Aedes*. **Rev. Parasit.**, 35: 321-330.
- Coluzzi, M., Bullini, L., Bianchi-Bullini, A. P., 1974b. Phosphoglucosomutase (PGM) allozymes in two forms of the *mariae* complex of the genus *Aedes*. **Biochem. Genet.**, 5: 253-256.

- Coluzzi, M., Di Deco, M., Gironi, A., 1975. Influenze del fotoperiodo sulla scelta del luogo di ovideposizione in *Aedes mariaae* (Diptera: culicidae). **Riv. Parasitologia**, 17: 121-130.
- Coluzzi, M., Bianchi-Bullini, A. P., Bullini, L., 1976. Speciazione nel complesso mariaae del genere *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Atti Associazione Genetica Italiana**, 21: 218-223.
- Çağlar, S.S., Şimşek, F.M., Akıner, M.M., Karacaoğlu, C., 2011. A biogeographical evaluation of the Turkish Mosquito fauna. **6th European Mosquito Control Association Workshop**, pp: 65, Budapest, Hungary.
- De Jong, L., Moreau, X., Dalia, J., 2009. Molecular characterization of the invasive Asian tiger mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Corsica. **Acta Tropica**, 112: 266-269.
- Dusfour, I., Blondeau, J., Harbach, R.E., Vythilingham, I., Baimai, V., Trung, H.D., Sochantá, T., Bangs, M.J., Manguin, S., 2007. Polymerase chain reaction identification of three members of the *Anopheles sundaicus* (Diptera: Culicidae) complex, malaria vectors in Southeast Asia. **J. Med. Entomol.**, 44:723–731.
- Edwards, F.W., 1932. Genera insectorum. Diptera, Family: Culicidae. Fascicle 194 Bruxelles. Belgium: Desmet-Verteneuil, Imprimeur- editeur.
- Edwards, F. W., 1941. Mosquitoes of the Ethiopian region III. Culicinae Adults and Pupae London, British museum (Natural History), United kingdom.
- Encinas Grandes, A., 1982. Taxonomia y Biología de los Mosquitos Del Area Salmantina (Diptera: culicidae), Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro de Edafología y Biología Aplicada Ediciones Universidad de Salamanca.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131:479-491.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2006. Arlequin v.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform**, 1:47-50.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925.

- Goswami, G., Singh, O.P., Nanda, N., Raghavendra, K., Gakhar, S.K., Subbarao, S.K., 2006. Identification of all members of the *Anopheles culicifacies* complex using alel specific polymerase chain reaction assays. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 75: 454–460.
- Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, 4: 442-450.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98)NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41:95-98.
- Harbach, R.E., Kitching, I.J., 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Svst. Entomol.**, 123:327-370.
- Harbach, R.E., Kitching, I.J., 2005. Reconsideration of Anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. **Systematics and Biodiversity**, 3: 345–374.
- Harbach, R.E. 2011. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, 1668:591–638.
- Hopkins, G.H. E., 1952. Mosquitoes of the Ethiopian region I. Larval Bionomics of Mosquitoes and Taxonomy of Culicine Larva, 2nd edition, London, United Kingdom: British Museum (Natural History).
- Huber, K., Loan, L.L., Chantha, N., Failloux, A.B., 2004. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. **Acta Tropica**, 90: 23–29.
- Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. **Journal of Applied Microbiology**, 94: 37-46.
- Jöst, H., Becker, N., Günther, S., Schmidt-Chanasit, J., 2011. The German arbovirus surveillance and mosquito monitoring program, 2009-2010. **6th European Mosquito Control Association Workshop**, pp. 29, Budapest, Hungary.
- Júnior, R.S.L., Scarpassa, V.M., 2009. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian amazon based on mitochondrial DNA *ND4* gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 32(2): 414-422.
- Kambhampati, S.W.C., Black, K., Rai, S., Sprenger, D., 1990. Temporal variation in genetic structure of a colonising species: *Aedes albopictus* in the United States. **Heredity**, 64: 281-287.



- Kambhampati, S., 1995. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 92: 2017-2020.
- Karabatsos, N., 2001. International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Virus of Vertebrates, 3rd ed., San Antonio.
- Kasap, H., Kasap, M., 1983. Türkiye Anophelinae türleri. **Türk Higj. Den. Biol. Der.**, 40:39-52.
- Kasap, H., Alptekin, D., 1997. Sivrisinekler, Vektörlükleri ve Kontrolü. Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler, (editor: M. Ali Özcel, Nilgün Daldal), Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 13, Ege Üniversitesi Basımevi, pp. 527, İzmir.
- Kettle, D. S., 1995. Medical and Veterinary Entomology. CAB International, 725, UK.
- Krzywinski, J., Wilkerson, R.C., Besansky, N.J., 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 18: 479-487.
- Krzywinski, J., Besansky, N.J., 2003. Molecular systematics of Anopheles: from subgenera to subpopulations. **Annu. Rev. Entomol.**, 48: 111-139.
- Krzywinski, J., Grushko, O.G., Besansky, N.J., 2006. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 39: 417-423.
- Krzywinski, J., Li, C., Morris, M., Jan, E., Conn, J.E., Lima, J.B., Povoia, M.M., Wilkerson, R.C., 2011. Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a neotropical malaria vector complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 58: 469-477.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analyses and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5: 150-163.
- Labuda, M., 1969. *Aedes ( Ochlerotatus ) zammitii*, member of *Aedes mariae* complex (Diptera: Culicidae) in Yugoslavia. **Bioloski vestnik**, 2: 23-27.
- Lehane, M. J., 1991. Biology of Blood-sucking Insects. Harper Collins Academic, 288, UK.

- Linton, Y.M., Harbach, R.E., Seng, C.M., Anthony, T.G., Matusop, A., 2001. Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sundaicus* (Diptera:Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. **Systematic Entomology**, 26: 357-366.
- Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Rovira, J., Conn, J.E., 2010. Evidence for pleistocene population divergence and expansion of *Anopheles albimanus* in Southern Central America. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 82: 156-164.
- Maia, R.T., Scarpassa, V.M., Maciel-Litaiff, L.H., Tadei, W.P., 2009. Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas state, Brazil based on the analyses of the mitochondrial DNA ND5 gene. **Genetics and Molecular Research**, 8 (3): 998-1007.
- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Luca, D., Severini, C., 1999. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the maculipennis complex inferred from ITS2 sequence analysis. **Insect Molecular Biology**, 8: 469-48.
- Martini, E., 1927. Über zwei neues Stechmückenarten aus Anotolien. **Archiv Für Schiffs und Tropenhygiene**, 31: 386-390.
- Mattingly, P.E., 1971. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia. XII. Illustrated keys to the genera of mosquitoes (Diptera. Culicidae). **Contrib. Am. Entomol. Hist.**, 7(4):1-84.
- Merdivenci, A., 1984. Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda Varlığı Bilinen Sivrisineklerin Biyo-morfolojisi, Biyo-ekolojisi, Yayılışı ve Sağlık önemleri). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 340, İstanbul.
- Moreno, M., Marinotti, O., Krzywinski, J., Tadei, W.P., James, A.A., Achee, N.L., Conn, J.E., 2010. Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to Anopheline divergence time. **Malaria J.**, 9:127.
- Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., 2005. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. **Genet. Res.**, 85: 1-11.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 3321, USA
- Paduan, K.D.S, Ribolla, P.E.M., 2008. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 45(1): 59-67.

- Parrish, D.W., 1959. The Mosquitoes of Turkey. **Mosquito News**, 19: 264-266.
- Proft, J., Maier, W.A., Kampen, H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera:Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. **Parasitol. Res.**, 85: 837-843.
- Ramsdale, C.D., Alten, B., Çağlar, S.S., Özer, N. 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 1: 18-27.
- Ravel, S., Hervé, J.P., Diarrassouba, S., Kone, A., Cuny, G., 2002. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from C<sup>o</sup>te d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. **Acta Trop.**, 82: 39-49.
- Regner, S., 1969. Preliminary observation on rockpools in the region of Rovinj. **Tahalassia Jugoslavica**, 5: 283-292.
- Reinert, J.E., 1999. Restoration of Verrallina to generic rank in tribe *Aedini* (Diptera: Culicidae) and descriptions of the genus and three included subgenera. **Contrib. Am. Entomol. Inst.**, 31(3): 1-83.
- Reinert, J.E., 2000a. Description of *Fredwardsius*, a new subgenus of *Aedes* (Diptera: Culicidae). **Eur. Mosq. Bull.**, 6: 1-7.
- Reinert, J.E., 2000b. Synonymy of subgenus *Sinoaedes* of genus *Aedes* with subgenus *Mattinglyia* of genus *Heizmamia*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, 16:38-39.
- Reinert, J.F. 2000c. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 16: 175-188.
- Reinert, J.F., Harbach, R.E., Kitching, I.J., 2004. Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae) based on morphological characters of all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 142: 289-368.
- Reinert, J.F., Harbach, R.E., Kitching, I.J., 2006. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 148: 1-101.
- Reinert, J.F., Harbach, R.E., Kitching, I.J., 2008. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on

- morphological data from all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 153: 29–114.
- Ribeiro, H., Ramos, H.C., Pires, C.A., Capela, R. A., 1988. An annotated checklist of mosquitos of continental Portugal (Diptera: culicidae). **Actas III. Congr. Iberico Entomol.**, pp. 233-253, Granada.
- Rioux, J.A., 1958. Les culicides du ‘Midi’ mediterranean. Etude systematique et ecologigue. **Encyc. Ent.(A)**, 35: 303.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, 19: 2496–2497.
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, 94(3): 441–448.
- Savega, H.M., 2005. Classification of mosquitoes in tribe Aedini (Diptera: Culicidae): Paraphylyphobia, and classification versus cladistic analysis. **Journal of Medical Entomology**, 42: 923-927.
- Schaffner, E., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.P., Rhaïem, A., Brunhes, J., 2001. The Mosquitoes of Europe (CD-Rom), Instut de Reserche Pour le Developpement, Montpellier, France.
- Şimşek, F.M., Kaynaş, S., Alten, B., Çağlar, S.S., 2005. Laboratory colonization of the malaria vector *Anopheles (Cellia) superpictus* Grassi, 1899 from Şanlıurfa, Turkey. **Journal of European Mosquito Bulletin**, 19: 26-30.
- Şimşek, F.M., Ülger, C., Akiner, M.M., Şenol Tuncay, S., Kiremit, F., Bardakçı, F., 2011. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. **Biochem. Syst. and Ecol.**, 39:258-265.
- Tajima, F., 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. **Genetics**, 143:1457-1465.
- Tang, J., Pmess, K., Cupp, E. W., Unnasch, T. R., 1996. Molecular phylogeny and typing of blackflies (Diptera: Simuliidae) that serves as vectors of human or bovine onchocerciasis. **Med. Vet. Entomol.**, 10: 228-234.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.**, 17: 6463-6471.

- Templeton, A. R., Crandall, K. A., Sing, C. F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data, cladogram estimation. **Genetics**, 132: 619-633.
- Theobald, F.V., 1903. Mainly compiled from the collections received at the British Museum from various parts of the world in connection with the investigation into the cause of malaria conducted by the colonial office and the royal soceity. A Monograph of the Culicidae or Mosquitoes. Volume III, British Museum, London.
- Tuncay, S.Ş., Şimşek, F.M., Ülger, C., Bardakçı, F., 2009. Molecular identification and distribution of *Ochlerotatus mariae* complex across the Northeastern Mediterranean. **11th International Congress of Zoogeography, Ecology and Evolution of Eastern Mediterranean**, pp. 196, Crete, Greece.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, 15: 323-354.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.**, 11: 1-16.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sare İlknur CİHANGİR  
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa/ 15.07.1986

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Bildiriler  
-Ulusal
- Tınaz E., Candan K., İlhan T., Cihangir S.İ., Boyacı G., Durmuş S.H. 2009. 2009 üreme döneminde dalyan kumsalında *Caretta caretta* ergin dişilerinin yuvalama potansiyelinin değerlendirilmesi ve popülasyona yönelik koruma tedbirleri. III. Ulusal Deniz Kaplumbağaları Sempozyumu, 03-05 Aralık 2009 Mersin Üniversitesi/Mersin, s.34.
- Güçlü Ö., Ülger C., Türkozan O., Reimann M., Levy Y., Gemmel R., Ergene S., Uçar A., Aymak C., Cihangir S.İ. 2009. Afrika kıtası ve Akdeniz havzası'nda yayılış gösteren Nil yumuşak kabuklu kaplumbağası (*Trionyx triunguis*)'nın mitokondriyal DNA çeşitliliği üzerine ilk değerlendirme. IX. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir Üniversitesi/Nevşehir, s.62.
- b) Katıldığı Projeler
1. Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Kıyılarında *Ochlerotatus zammitii* (Diptera: Culicidae)'nin Dağılım Örüntüsünün ve Genetik Yapısının Belirlenmesi, ADÜ-BAP-FEF-11031, 2010-2011.
  2. Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Kıyılarında *Ochlerotatus mariae* Grubunun (Diptera: Culicidae) Dağılım Örüntüsünün ve Genetik Yapısının Belirlenmesi, TÜBİTAK projesi, TBAG-110T593, 2010-2012.
  3. Aydın İli Sivrisinek Popülasyonlarında İnsektisit Direnç Düzeylerinin Analizi, ADÜ-BAP-FEF-12004, Araştırmacı, 2012-2014.

## **İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi/2010-2011  
Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi/2011-...

## **İLETİŞİM**

E-posta Adresi : sarecihangir@adu.edu.tr  
Tarih : 28.06.2012