

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2009-0002

**TÜRKİYE'DE *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ'NİN
(DIPTERA: CULICIDAE) MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Emel SEVGİLİ

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK**

AYDIN, 2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Emel Sevgili tarafından hazırlanan TÜRKİYE’DE *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ’NİN (DIPTERA: CULICIDAE) MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU başlıklı tez, 08.09.09 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI	Adnan Menderes Üniversitesi	
Doç. Dr. İbrahim ÇAKMAK	Adnan Menderes Üniversitesi	
Doç. Dr. Fatih M. ŞİMŞEK	Adnan Menderes Üniversitesi	

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

Ünvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

İNTİHAL VE AŞIRMA BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Emel SEVGİLİ

İmza:

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE’DE *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ (DIPTERA: CULICIDAE)’NİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Emel SEVGİLİ

Adnan Menderes Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK

Palearktikte altısı vektör on bir türü içeren *Anopheles maculipennis* kompleksi, Culicidae familyasında tanımlanan ilk sibling tür grubudur. Bu sibling türlerin sadece morfolojik verilerle tanımlanması oldukça zordur. Teşhis için, birçok araştırmacı tarafından yumurta morfolojisi kullanılmış, fakat tür içi varyasyonlar nedeniyle bu metot yeterince güvenilir bulunmamıştır. Morfolojik ve moleküler verilerin birlikte kullanılmasıyla, yakın zamanlarda üç yeni tür keşfedilmiştir. Türkiye’den komplekse ait önceki çalışmaların bir kısmı oldukça eski verilere ve diğer kısmı da yetersiz örneklem ve morfolojik karakterlere dayanmaktadır. Bu yüzden *An. maculipennis* kompleksi üyelerinin Türkiye’deki durumu yeterince aydınlatılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, *An. maculipennis* kompleksinin Türkiye’deki yayılışını ve türlerin moleküler karakterlerini açıklığa kavuşturmadır. Bu amaçla, yedi farklı coğrafik bölgeden 117 örnek toplanmış ve modern moleküler tekniklerle analizleri yapılmıştır. Örneklerin 35’inin yumurtası incelenmiş ve 117 sinin rDNA ITS2 bölgesi sekansları GenBankası sekanslarıyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak üç tür (*An. maculipennis*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi*), bunların coğrafik örüntüsü ve hiç tür içi varyasyon olmadığı tespit edilmiştir.

2009, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler:

Anopheles maculipennis kompleksi, tür teşhisi, PCR, ITS2, Türkiye

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Anopheles maculipennis*
COMPLEX (DIPTERA: CULICIDAE) IN TURKEY**

Emel SEVGİLİ

Adnan Menderes University

Graduate school of Naturel and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih Mehmet SIMSEK

Anopheles maculipennis complex consisting of eleven species, six of which are vector, in Palearctic region was the first described sibling species group in family Culicidae. Identification of these sibling species is very difficult using morphological data alone. The egg morphology has been used widely by many authors, but this method has not been satisfactory enough due to the intraspecific variations,. Three new taxa have recently been discovered by using both morphological and molecular data together. Some of the previous reports on the complex known from Turkey are based on highly dated data while the others have had insufficient sampling and inadequate morphological characters. Therefore, composition of members of *An. maculipennis* complex has not been clarified sufficiently in Turkey. The aim of the present study was to determine the distribution and molecular identification of *An. maculipennis* complex in Turkey. For this purpose, 117 specimens were collected from seven different geographical regions in Turkey and analyzed by modern molecular techniques. Eggs of 35 specimens were studied and, all specimens collected were sequenced and their rDNA ITS2 sequences compared with those stored in the GenBank database. As a result, three species of *An. maculipennis* complex (*An. maculipennis*, *An. sacharovi* and *An. melanoon*) were identified and their geographical distribution pattern in Turkey was determined.

2009, 60 pages**Key Words:***Anopheles maculipennis* complex, species identification, PCR, ITS2, Turkey

ÖNSÖZ

Ciddi sağlık sorunlarıma rağmen, bilimin heyecan verici ve asla dil, ırk, mezhep ayrımı gözetmeyen evrensel çatısı altında geçirdiğim üç yılın ürünü olan bu tezin konusunun seçiminden, yazımına kadar geçen yoğun süreçte her zaman yanımda olup beni yönlendiren, tecrübeleriyle acemiliğimi törpüleyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK'e

Özellikle moleküler teknikler konusunda bilgilerini asla esirgmeden gerektiğinde laboratuvarında benimle birlikte çalışmış değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI ve Doç. Dr. Celal ÜLGER'e

Bursiyer olarak görev yaptığım TÜBİTAK-TOVAG 1060841 nolu ve "Türkiye Akdeniz Bölgesi Sivrisineklerinin (Diptera: Culicidae) Sistematığı ve Biyolojik-Ekolojik Özellikleri" başlıklı proje nedeniyle TÜBİTAK'a ve FEF-08004 nolu ve "Türkiye'de *Anopheles maculipennis* Kompleksi (Diptera: Culicidae)'nin Sistematığı ve Biyolojik-Ekolojik Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı proje nedeniyle, ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ Rektörlüğü'ne

Tez için kullandığım örneklerin temini konusunda yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi EBAL'in vazgeçilmez üyesi Uzm. Sinan KAYNAŞ ve Arş. Gör. M. Mustafa AKINER'e

Aydın'ın en çekilmez günlerinde bile moleküler biyoloji laboratuvarını renklendiren içten dostum, Adnan Menderes Üniversitesi Doktora öğrencisi, Serap ŞENOL TUNCAY'a teşekkürü borç bilirim.

Bana sunduğu engin sevgi ve hoşgörünün yanı sıra bilimsel birikimlerini de cömertçe paylaşarak içimdeki heyecanı her zaman diri tutan değerli eşim Doç. Dr. Hasan SEVGİLİ'ye,

En önemlisi bana her zaman güvenerek maddi manevi tüm imkanlarını çizdiğim yolda yürümem için seferber eden anne-babam, mükemmel eğitimciler Neriman ve Muzaffer KABARTAN'a sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. <i>Anopheles (Anopheles) maculipennis</i> Kompleksinin Sistematığı	5
2.2. Moleküler Yöntemler Öncesi Sistemik Araştırmalar	7
2.3. Moleküler Yöntemler Sonrası Sistemik Çalışmalar	9
2.4. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksinin ülkemizdeki durumu	11
2.5. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi'nin Genel Biyolojik, Ekolojik Özellikleri	12
2.6. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksinin Palearktikteki dağılışı	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Alansal Çalışmalar	18
3.1.1. Larva Örneklemeleri	18
3.1.2. Ergin Örneklemeleri	18
3.2. Laboratuvar Çalışmaları	20
3.2.1. Yumurtaların incelenmesi	20
3.2.2. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Örneklerinden DNA İzolasyonu..	20
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforeziyle Kalitesinin İncelenmesi	23
3.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması İşlemi	24
3.2.6. DNA Dizi Verilerinin Analizi	25
3.2.7. Dendogramların Oluşturulması	25
3.3. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi'nin Dağılımının Belirlenmesi	25
4. BULGULAR	26
4.1. <i>Anopheles maculipennis s.l.</i> Yumurtalarının İncelenmesi	26
4.2. Moleküler Analizler	29
4.3. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Türlerinin Ülkemizdeki Coğrafik Dağılımı	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenine
An.	Anopheles
bç	Baz çifti
C	Cytosin
CDC	Centers for Disease Control
COI	Cytochrome Oxidase I
dd	Di distelled
DDT	Dikloro Difenol Trikloroethan
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Etilendaimin Tetra Asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
G	Guanin
GPS	Global Positioning System
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kb	Kilo Baz
KCl	Potasyum Klorür
mA	mili Amper
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ng	nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Power of hydrogen
Pl.	Plasmodium
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rDNA	Ribosomal DNA
SDS	Soydum Dodesil Sülfat
T	Thymin
TBE	Tris-Borik asit EDTA
ul	Mikro litre
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organisation
xg	Gravity

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Türkiye’de tespit edilen <i>Anopheles maculipennis s.l.</i> yumurtalarına ait fotoğraflar	27
Şekil 4.2. İki farklı türde tek bireye ait yumurtalarda gözlenen desen farklılıkları	29
Şekil 4.3. <i>An. maculipennis s.l.</i> ITS 2 Bölgesi PCR ürünlerinin Agaroz Jel elektroforez görüntüsü	30
Şekil 4.4. Tespit edilen türlerle GenBankası örneklerin karşılaştırmalı ITS2 sekansları	31
Şekil 4.5. Tespit edilen türleri gösteren UPGMA tekniğiyle hazırlanmış dendogram	32
Şekil 4.6. Tespit edilen türlerin Türkiye’de yayılışını gösteren harita	35
Şekil 5.1. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksine ait GenBankasında yer alan bazı sekanslarla tez kapsamında elde edilen türlere ait dizilerden oluşturulan topografik dendogram	42
Şekil 5.2. Sitogenetik yapısına göre açıklanan <i>An. messeae</i> formlarının dağılış haritası	45
Şekil 5.3. Türkiye ve Güney-Kafkasya’da 2003’e kadar rapor edilen otokutanöz sıtma vakaları dağılışı WHO (2005)	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Örneklem noktaları ve belirlenen türler	19
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon protokolü	22
Çizelge 4.1. Türlerle ait baz içerikleri	33
Çizelge 4.2. Tespit edilen türlerin bölgelere göre dağılımı	34
Çizelge 5.1. GenBankasından alınan dizilerin ait olduğu lokalite ve yayınların listesi	43
Çizelge 5.2. <i>An. maculipennis</i> kompleksine ait bazı türlerin vektörel karakterleri	49

1. GİRİŞ

Sivrisinekler (Diptera: Culicidae), sıtma, sarı humma, dengeu humması, ensefalitis ve lemfatik filariasis gibi tehlikeli hastalıklara vektörlük yapmaları nedeniyle dünya genelinde tıbbi, ekonomik ve ekolojik açıdan en önemli hayvan gruplarından biri olarak kabul edilmektedir (Rai, 1999). Anophelinae ve Culicinae alt familyaları olmak üzere iki soy hattını kapsayan Culicidae familyası, listelenmiş geçerli 3490 türü ile oldukça zengin ve önemli bir Diptera familyasıdır (Harbach ve Kitching, 2005).

Vektör kökenli tüm hastalıklar göz önüne alındığında mortalite ve morbitide oranları açısından insanlık tarihinin ön önemli vektörleri sivrisineklerdir ve yeryüzünde özellikle de, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan iki milyardan fazla insanı tehdit etmektedirler. Sivrisineklerin vektörlükleriyle oluşturdukları tehdidin en önemli kısmı ise *Anopheles* cinsine bağlı bazı sivrisinek türlerinin bazı *Plasmodium* türlerine vektörlük yapmalarıyla ortaya çıkan ve 100 ülkede endemik olan sıtmadan kaynaklanmaktadır (Martens ve Hall, 2000). Sıtma, tüm kontrol çalışmalarına rağmen, bugün de dünyanın en yaygın, en çok öldüren ve en önemli vektör kökenli hastalığı olma özelliğini sürdürmektedir.

Pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde de halen sıtma önemli halk sağlığı sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Ağırlıklı olarak ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde hem resmi hem de özel kuruluşlar tarafından yıllardır sıtma mücadele çalışmaları yapılmasına rağmen, sıtma eradikasyonu tam olarak sağlanamamıştır. Ülkemizde yapılmış olan sıtma eradikasyon çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde, vektör kontrolüne yönelik farklı düzeyde etki ve mekanizmalara sahip birçok yöntem uygulanmış olmasına karşılık, temel olarak kimyasal insektisit kullanımı her zaman öncelikli yöntem olmuştur. Oysa, sivrisineklerin ve sıtma gibi sivrisinek kökenli hastalıkların yayılışı, epidemiyolojisi ve mücadelesinde doğru kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için öncelikle vektör türlerin sistematik, zoocoğrafik ve biyo-ekolojik özellikleri hakkında en azından temel bilgiler gereklidir (Beebe ve Cooper, 2000). Ancak, bugün de, ülkemizde sıtma tehdidinin devam ettiğini ifade etmek yanlış olmayacaktır, çünkü, 2004-2007

yıllarını kapsayan son dört yıllık dönemde yaklaşık 10.000 kadar sıtma olgusu ortaya çıkmıştır (Alten *et al.*, 2007). Diğer taraftan, ülkemizin sıtma vektörü ya da potansiyel vektörü olan *Anopheles* türlerinin sistematik ve zoocoğrafik dağılımları hakkında yeterli bilgi düzeyine de henüz ulaşabilmiş değiliz.

Ülkemizin sivrisinek faunasının belirlenmesine yönelik araştırmalar, derlemeler yapılmış olmakla birlikte, bu çalışmalar genellikle daha önce yapılan çalışmaların bir değerlendirilmesi şeklinde (Kasap ve Kasap, 1983; Ramsdale *et al.*, 2001) ya da küçük ölçekli bölgesel incelemeler ve belirli türlerin populasyon özelliklerinin analizi biçiminde olmuştur (Aldemir ve Boşgelmez, 2006; Şimşek, 2005; Yurttas *et al.*, 2005). Bugün ise ülkemizde halen sistematik açıdan sorunlu birçok grubun bulunduğunu ve özellikle de, sıtma vektörü olan *Anopheles* türleri ile ilgili çözülmesi gereken çeşitli düzeylerde sistematik problemlerin mevcut olduğunu bilmekteyiz.

Anopheles cinsi 2004 yılı itibariyle dünya genelinde tanımlanmış ve isimlendirilmiş geçerli 444 tür ile tür komplekslerine ait henüz isimlendirilememiş 40 türü içermekte olup, bunlardan 70 kadarı doğal koşullarda sıtma parazitlerine vektörlük yapmaktadır (May, 1951; Harbach, 2004; Kiszewski *et al.*, 2004). Vektör türlerden *Anopheles superpictus* Grassi gibi her hangi bir tür kompleksine ait olmayan türlerin zoocoğrafik dağılımları, biyolojik, ekolojik ve davranış özellikleri çok iyi bilinmekte ve bu bilgilere göre de vektör kontrol yöntemleri başarıyla uygulanmaktadır. Ancak, birçok sıtma vektörünün allopatrik ya da simpatrik sibling tür komplekslerinde bulunması, uzun yıllar hangi coğrafik bölgelerde gerçekte kompleksin hangi türünün sıtma vektörü olduğunun bilinmemesine neden olmuş, buna bağlı olarak da sıtma eradikasyon çalışmalarında başarı sağlanamamıştır. Son yıllarda ise moleküler biyolojide sağlanan gelişmeler ile taksonomik açıdan problemlili sibling türlerde orta ve yüksek değişkenliği olan genom bölgelerinin dizi analizlerinin yapıldığı DNA temelli çalışmalarla sibling türler arasındaki farklılıkların saptanabilmesi mümkün olmuştur (Wilkerson *et al.*, 1993; Beebe *et al.*, 1999; Proft *et al.*, 1999; Van Bortel *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Naddaf *et al.*, 2003; Marrelli *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Le Goff *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006). Böylece, tür kompleksindeki taksonomik sorunların çözümünde önemli başarılar elde edilmiş, türlerin zoocoğrafik

dağılım alanları belirlenebilmiş ve kapsamlı sıtma eradikasyon yöntemleri uygulanabilmiştir. Bu kapsamda araştırmalara konu olan sibling tür gruplarından biri, Palearktık Bölge’de çok önemli sıtma vektörlerini içeren *Anopheles maculipennis* kompleksidir.

Anopheles maculipennis kompleksi için nükleer rDNA ITS2 (second internal transcribed spacer) ve mitokondriyal sitokrom c oksidaz geni (COI) dizileri kullanılarak yapılan moleküler çalışmalar ile İngiltere, Fransa, İtalya, Romanya, Yunanistan ve İran gibi birçok ülkede kompleksle ilgili taksonomik sorunlar büyük ölçüde çözülmüştür (Marinucci *et al.*, 1999; Proft *et al.*, 1999; Romi *et al.*, 2000; Linton *et al.*, 2001; Boccolini *et al.*, 2003, Sedaghat *et al.*, 2003, Nicolescu *et al.*, 2004).

Araştırmacılar tarafından, uzun yıllar grup türlerinin teşhisinde kısmen uygulanabilen yumurta morfolojisine bağlı ayrımların yanıltıcı olabileceği ortaya konulmuş ve uygulanan yeni moleküler teknikler ile 2003’den sonra *Anopheles maculipennis* kompleksi içerisinde 3 yeni tür ve bir çok yeni kayıt tespit edilmiştir (Sedaghat *et al.*, 2003; Gordeev *et al.*, 2005; Linton *et al.*, 2005).

Ülkemizde *Anopheles maculipennis* kompleksi ile ilgili yumurta morfolojisine yönelik, sadece belirli bölgelerden alınan örnekler kullanılarak yapılan çalışmalarda, komplekse ait *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. sacharovi*, *An. subalpinus*, *An. melanoon* ve *An. messeae* türlerinin varlığı bildirilmiştir (Parrish, 1959; Merdivenci, 1984). Ramsdale *et al.*, (2001) ise komplekse ait yalnızca *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. sacharovi*, *An. subalpinus* türlerinin ülkemizde bulunduğunu kabul etmiştir.

Bugün için yeterli araştırmalar yapılmadığı için ülkemizdeki gerçek durumu tam olarak bilememekteyiz. Oysa sıtmanın tehlikeli bir sorun olduğu ülkemizde birçoğu sıtma vektörü olan komplekse ait türlerin ve coğrafik dağılımlarının bilinmesi oldukça önemlidir. Çünkü simpatrik sibling türler olsalar da, beslenme davranışları, sıtma parazitlerine karşı duyarlılıkları ve buna bağlı olarak da vektör kapasiteleri oldukça farklılık göstermektedir (Jetten ve Takken, 1994).

Bu çalışmanın amacı Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde yayılış gösteren *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerini rDNA ITS2 bölgesinin nükleotit dizilerini karşılaştırarak moleküler düzeyde teşhis etmek ve mevcut türlerin zoocoğrafik yayılış alanlarını belirlemektir.

Elde edilen sonuçlarla önemli sıtma vektörlerini kapsayan grubun Türkiye'deki durumu ortaya konularak, sıtma eradikasyon çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Anopheles (Anopheles) maculipennis* KOMPLEKSİNİN SİSTEMATİĞİ

Insecta sınıfının Diptera takımı kapsamındaki Culicidae familyasının *Anopheles* cinsinde yer alan *Anopheles (Anopheles) maculipennis* kompleksi, 1927 yılında van Thiel tarafından tanımlanmış ilk sivrisinek tür kompleksidir. Bu tür kompleksi, Nearktik Bölge’de, yayılış gösteren *Anopheles (Anopheles) aztecus* Hoffmann, 1936, *An. (Ano.) earlei* Vargas, 1943, *An. (Ano.) freeborni* Aitken, 1939, *An. (Ano.) hermsi* Barr ve Guptavanij, 1989, *An. (Ano.) occidentalis* Dyar ve Knap, 1906 türlerinin yanı sıra, Palearktik Bölge’de, yayılış gösteren *Anopheles (Ano.) artemievi* Gordeev, Zvantsov, Goryacheva, Shaikovich ve Yezhov, 2005, *An. (Ano.) atroparvus* van Thiel, 1927, *An. (Ano.) beklemishevi* Stegnii ve Kabanova, 1976, *An. (Ano.) daciae* Linton, Nicolescu ve Harbach, 2004, *An. (Ano.) labbranchiae* Falleroni, 1926, *An. (Ano.) maculipennis s.s.* Meigen, 1818, *An. (Ano.) martinius* Shingarev, 1926, *An. (Ano.) melanoon* Hackett, 1934, *An. (Ano.) messeae* Falleroni, 1926, *An. (Ano.) persiensis* Linton, Sedaghat & Harbach, 2003 ve *An. (Ano.) sacharovi* Favre, 1903 türleriyle dünya genelinde toplam 16 türü kapsamaktadır (Kampen, 2005; Linton *et al.*, 2007).

Anopheles (Anopheles) maculipennis kompleksi van Theil tarafından tanımlandıktan sonra kompleks içerisinde hem yumurta, larva, pupa ve ergin karakterleri açısından hem de biyolojik, ekolojik ve davranışsal özellikleri açısından farklılıklar sergilediği belirlenen populasyonlar, ırk, varyasyon, biyolojik ırk, coğrafik ırk, form, alt tür gibi statülere yerleştirilmeye çalışılmıştır (Hackett ve Lewis, 1935; Hackett, 1937; Bates, 1940).

Derinleşen çalışmalarla, hem aynı hem de farklı zoocoğrafik bölgelerden tespit edilen populasyonlardaki farklılıkların ve benzerliklerin oldukça artması karşısında ortaya daha da anlaşılabilir bir sonuç çıkmıştır. Öyleki, belirli bölgedeki birkaç farklı populasyonu ayırmaya yarayabilen bir karakter başka bir bölgedeki populasyonların ayırımında yeterli olmadığı gibi, genellikle de tercih edilen karakterlerin de

polimorfik karakterler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu kapsamda, bir çok ülkede çok sayıda araştırmacı tarafından, 1920'lerden 1990'lara kadar yumurta morfolojisini (Falleroni, 1926; Corradetti, 1934;), melezleme deneylerini (de Buck *et al.*, 1934), ekolojik araştırmaları (Hackett ve Missiroli, 1935), larva, pupa ya da ergin morfolojisine yönelik değerlendirmeleri (Diemer, 1935; Bates, 1939; Boccolini *et al.*, 1986; Suzzoni-Blatger *et al.*, 1990) ve kromozom karşılaştırmalarını (Frizzi, 1952, 1953; White, 1978) kapsayacak önemli araştırmalar ile çözüm yolları aranmıştır.

Yoğun çalışmalar sonucunda bazı türler için tanımlayıcı özellikler belirlenebilmiş olmakla birlikte, komplekse bağlı tüm türlerin birbirinden ayırımını sağlayan, türlerin yayılış alanlarını belirleyen sonuçlar ancak moleküler yöntemlerin uygulanmaya başlamasıyla elde edilebilmiştir. Bu kapsamda, hangi takson için hangi DNA bölgesinin daha kesin sonuç verebileceğine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır (Kumar ve Rai, 1993; Munstermann ve Conn, 1997; Rai, 1999; Hwang ve Kim, 1999).

Harbach (2004)'te yapılan derlemede belirtilen son duruma göre *Anopheles maculipennis* kompleksi, *Maculipennis*, *Quadrinaculatus* ve *Freeborni* olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır ve *An. beklemishevi* hariç diğer tüm paleartik türler *Maculipennis* alt grubuna dahil edilmiştir. Moleküler tekniklerle de filogenetik yakınlığı ortaya koyulan (Kampen, 2005) *An. beklemishevi* türü ise *Quadrinaculatus* grubuna dahil edilmiştir.

Bugün, tarihsel süreçte uzun bir araştırma dönemini kapsayan *Anopheles maculipennis* kompleksinin sistematığına yönelik araştırmaları, moleküler yöntemlerin uygulanamadığı dönemdeki çalışmalar ve moleküler yöntemlerin uygulanabildiği dönemdeki çalışmalar olarak iki başlık altında değerlendirmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

2.2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER ÖNCESİ SİSTEMATİK ARAŞTIRMALAR

Bu kapsamda yapılan çalışmalar öncelikli olarak larva ya da erginlerde farklılıklar gösteren karakterler üzerinde yoğunlaşmış ve genellikle de farklı oldukları düşünülen popülasyonların ya da türlerin ikili ya da üçlü karşılaştırmaları yapılmaya çalışılmıştır. Bates(1939)'a göre Martini (1923), hem *Anopheles maculipennis s.s.* hem de *An. sacharovi* (*An. elutus* olarak verilmiştir) türünün larvalarındaki mandibular diş sayısını farklı üreme habitatlarından (farklı su sıcaklıklarında) farklı mevsimlerde elde edilen örneklerde karşılaştırmış ve her iki türün de mandibular diş sayısı bakımından değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir.

Van Theil (1926), *Anopheles maculipennis* kompleksindeki türleri ayırabilecek bir karakter olarak, ergin kanat uzunluğunu seçmiştir. Ancak daha sonra bu karakterin çevresel şartlardan, larval dönemdeki beslenmeden etkilendiği ve ortalama değerlerin yeni bir örneği sınıflandırmada başarısız olduğu ortaya konmuştur (Hackett, 1934). Hackett ve Missiroli (1935)'nin araştırmasında, *An. atroparvus* ve *An. messeae* türlerinin kanat uzunlukları ve mandibular diş sayısı karşılaştırılmış, farklı coğrafik alanlarda her iki karakterlerin de oldukça fazla varyasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Erkek hipopigiyumu ve larval karakterler üzerindeki çalışmalarda yalnızca *An. sacharovi* için ayırım sağlayabilecek veriler elde edebilmiştir (Denisova, 1967; Doosti *et al.*2006). De Buck ve arkadaşlarının (1930) yaptığı çalışmalarda da larva üzerinde tanımlanan kıllarda ve erkek hipopigiyumunda farklılıklar olduğu saptanmıştır. İlk kez Falleroni'nin (1926) dikkati çektiği yumurta morfolojisi üzerine yoğunlaşan Hackett (1934), yaptığı çalışmasında kompleks türlerinin ayırımında en uygun karakterlerin yumurta morfolojisi olabileceğini kabullenmiş ve bu yöntemle de *An. melanoon*'u tanımlamıştır. Ancak tanımlanan bu yeni 'ırk', sadece, Falleroni'nin (1926) koyu yumurtalı (*An. messeae*) olarak tanımladığı ırktan ayrılmayı sağlamış ve Hackett, 1934'deki bu yayınında komplekse ait sistematik sorunun çözümü için henüz çok erken olduğunu da öngörmüştür. Bu çalışmasının hemen ardından 1935'de, Lewis ile yaptığı incelemelerde yumurtaları *An. messeae* yumurtalarına benzeyen yeni bir varyete tanımlamış ve bunu *Anopheles maculipennis subalpinus* var. olarak literatüre geçirmiştir (Hackett ve Lewis, 1935).

Bundan sonra yapılan çalışmalar daha çok yumurta morfolojisini destekleyen larval karakter arayışlarına dönmüştür (Bates, 1939; Bates ve Hackett, 1939; Russel *et al.*, 1943). Bu farklı ırklara ait yumurtaların laboratuvar koşullarında yetiştirilmesiyle de hem ırkların biyolojik özelliklerinin belirlenebilmesi hem de hangi tip yumurtadan hangi karakterlere sahip larvaların geliştiğinin görülebilmesi mümkün olmuştur.

Bates (1939), laboratuvar koşullarında kurduğu kolonilerde birçok hibritleme denemesi yaparak, farklı ırklar arasındaki üreme yalıtımlarının var olup olmadığını saptamaya çalışmış ve genel olarak hibrit bireylerin kısır ya da anomalilere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmaların ardından artık taksonomik problem, bireylerin ırk veya varyasyon olarak değil, “tür” olarak adlandırılması yönünde kısmen çözülmüştür (Bates, 1940). Ancak, Bates (1940) komplekse yönelik derlediği çalışmasında *An. subalpinus*'un, yumurta rengi varyasyonundan başka ayırt edici bir karakter taşımasından dolayı *An. melanoon*'un alttürü olarak kabul edilmesini uygun görmüştür. Bu çalışmada benzer duruma *An. atroparvus* ve *An. labranchiae* için de yer verilmiş, ancak burada alt türler arasında belirgin bir geçiş formu görülmediğine ve bir kısmı kısır bireylerden oluşan hibrit koloni oluşturulabildiğine dikkat çekilmiştir. Russel ve arkadaşlarının (1943) hazırladığı kompleks türlerinin teşhis anahtarında yumurta karakterleri kullanılmış ve 1970'li yıllara kadar türlerin hem biyolojisine hem sistematik karakterleri üzerine araştırmalar devam etmiştir (Kettle ve Sellick, 1947; Denisova, 1967).

Stegnii ve Kabanova (1978)'nin yaptığı sitogenetik incelemeler sonucunda 3. politen kromozom üzerindeki farklılıkla yeni bir tür olarak *An. beklemishevi* tanımlanmıştır. Ancak, uygulanan yöntemin sahip olduğu birçok pratik kısıtlamalar nedeniyle bu yöntem yaygın bir kabul görmemiştir (Beebe ve Rowe, 2004).

An. artemievi'nin 2005'de moleküler tekniklerle tanımlanmasından sonra yapılan sitogenetik çalışmalarında türün politen kromozom özelliği bakımından *An. maculipennis* ile aynı bantlanmayı gösterdiği ortaya konmuş ve yöntemin kompleks türlerinin hepsi için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (WHO, 2008).

2.3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER SONRASI SİSTEMATİK ARAŞTIRMALAR

Dünya üzerinde ekolojik açıdan çok önemli ve yüksek çeşitliliğe sahip olan böcekler üzerinde çalışılabilecek bir çok moleküler yöntem geliştirilmiştir (Rai, 1999; Young ve Coleman, 2003; Behura, 2006)

Moleküler yöntemlerin sistematik çalışmalarda kullanılabilir olmasını takiben *Anopheles maculipennis* kompleksinin hem Nearktik Bölge türlerine (Porter ve Collins, 1991) hem de Palearktik Bölge türlerine yönelik moleküler sistematik araştırmalar hızla artmıştır. Bu kapsamda kompleksin Palearktik Bölge türlerine ilişkin ilk moleküler çalışmalar 1999 yılında yapılmış ve Marinucci *et al.*, (1999)'nin yaptığı çalışmada kompleksin 7 türünün ITS2 bölgesi kullanarak türlerin filogenetik ilişkisi belirlenmiştir. Aynı yıl, Proft ve arkadaşları (1999), kompleksin 6 türünün ITS2 bölgesi için türe özgü primerler kullanarak bu bölgenin karakterizasyonunu yapmışlar ve türler arasındaki farkın % 7,3 (*An. melanoon* ve *An. maculipennis* arasında) ile % 24 (*An. atroparvus* ve *An. sacharovi* arasında) düzeyinde değiştiği gösterilmişlerdir

Bu kapsamda yapılan diğer araştırmalarla (Walton *et al.*, 1999; Banerjee *et al.*, 2007) da ITS2 bölgesinde tür içi varyasyonun yok denecek kadar az olduğu ortaya konulmuş ve bu bölgesinin kompleks türlerinin ayırımında güvenilir bir belirteç olarak kullanımı yaygın kabul görmüştür.

Bu çalışmalara paralel olarak diğer moleküler belirteçlerden de yararlanılmış ve bu kapsamda yapılan ilk çalışmada mitokondri genomunun COI bölgesi ile kompleks türlerinden *An. maculipennis s.s.* ve *An. messeae* türlerine ait diziler incelenmiştir. Çalışma sonucunda, COI'nin *An. maculipennis s.s.* türünde saptanan 5 haplotipi ile daha yüksek değişkenliği olduğu saptanmış ve iki türün bu bölge dizileri arasında %3,4 ile %3,8 fark olduğu tespit edilmiştir. Bu farkın ve haplotiplerdeki karakterlerin belirgin olması sebebiyle COI'nin filogenetik ilişkiyi yeniden düzenlenmede kullanılabileceği vurgulanmıştır (Linton *et al.*, 2001). Böylece, *An. maculipennis* kompleksinin sistematığına yönelik olarak moleküler tekniklerin

yaygın olarak kullanılmasıyla, kompleks içerisinde önemli sistematik değişikliklere neden olan sonuçlar da elde edilmeye başlanmıştır. Bunlardan ilki yumurta morfolojisine göre daha önce *An. subalpinus* türü olarak tanımlanmış olan örneklerin moleküler analizlerle ITS2 dizileri açısından *An. melanoon* ile karşılaştırıldığında, bölgelerin yalnızca % 0,46'lık bir fark taşıdığı belirlenmiş ve buna bağlı olarak da *An. subalpinus* olarak tanımlanan türün *An. melanoon* türünün sinonimi olduğuna karar verilmiştir (Linton *et al.*, 2002). Bu sonuç daha sonra Boccolini *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmada ITS2'nin yanı sıra COI dizilerinin analiziyle de desteklenmiştir.

Anopheles beklemishevi ile yapılan ilk moleküler çalışmalarda ise tip lokalitesi Palearktık Bölgede olan bu türün, Nearktık Bölge'deki türlere daha yakın olduğunu ve Palearktık Bölge'deki diğer türlerden görece olarak uzun zaman önce ayrıldığını göstermiştir (Gordeev *et al.*, 2004; Kampen, 2005).

Filogenetik çalışmalarla beraber, eski-yeni birçok örneğin yeniden değerlendirilmesi yapılmış, Yunanistan, Bulgaristan, İran gibi komşu ülkelerde yeni kayıtların bulunması sağlanmış ve daha önce kullanılan morfolojik karakterlerin kompleks türlerinin ayırımında yetersiz kaldığı anlaşılmıştır (Linton *et al.*, 2002; Sedaghat *et al.*, 2003, Nicolescu *et al.*, 2004; Sedaghat ve Harbach, 2005; Linton *et al.*, 2007) . Öyle ki, yapılan yeni çalışmalarla, *An. maculipennis* kompleksi içerisinde üç yeni tür de moleküler olarak tanımlanmıştır:

1. *Anopheles persiensis* Linton, Sedaghat ve Harbach, 2003: ITS2 bölgesi PCR-RFLP sonuçlarına göre İran'da tanımlanan tür en yakın olduğu *An. martinius*'tan % 6,8'lik farklılıkla ayırt edilmiştir (Sedaghat *et al.*, 2003).

2. *Anopheles daciae* Linton, Nicolescu ve Harbach, 2004: Kompleks içerisinde ITS2 bölgesi bakımından en yakın ilişkinin bulunduğu *An. messeae* türünden, elektron mikroskobu yumurta görüntüleri, ITS2 ve COI dizi farklılıklarına dayanılarak Romanya'dan tanımlanmıştır (Nicolescu *et al.*, 2004)

3. *Anopheles artemievi* Gordeev, Zvantov, Goriacheva, Shaikevich and Ezhov, 2005: Yumurta yapısı olarak *An. sacharovi* ve *An. martinius*'a benzeyen türün ITS2 dizianalizi % 91 ile en fazla *An. maculipennis s.s.* türüne benzemektedir. Kırgızistan'da bulunan bu tür, kompleks için tespit edilen son yeni türdür (Gordeev *et al.*, 2005).

Bugün de, *Anopheles* cinsine ait bir çok kompleks ve türün akrabalık ilişkileri ve lokal karakterizasyonlarını açığa çıkarmak için özellikle ITS2 bölgesinin kullanıldığı moleküler çalışmalar hızla devam etmektedir (Marrelli *et al.*, 2005; Ree *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005; Foley *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2007; Bezzhonova ve Goryacheva, 2008).

2.4. *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ'NİN ÜLKEMİZDEKİ DURUMU

Parrish (1959)'in ülkemizin pek çok bölgesini kapsayan çalışmasında, *An. maculipennis* kompleksine ait *An. maculipennis s.s.*, *Anopheles maculipennis melanoon* ve *An. maculipennis messeae* olarak bir tür, iki de alttürün varlığı bildirilmiştir.

Postiglione *et al.*, (1970) göre, Akalan (1936) *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. messeae*, *An. melanoon* ve *An. subalpinus*'un ülkemizde bulunduğunu bildirmiştir. Türkiye Anophelinae faunası üzerine Postiglione *et al.*, (1973) tarafından yapılan kapsamlı çalışmada, *An. maculipennis* kompleksine ait, Türkiye'de yayılış gösteren tür/alttüre ilişkin morfolojiye dayalı taksonomik değerlendirmeyle birlikte, Türkiye yayılışları da ele alınmıştır. Bu çalışmada daha önce Türkiye'den kaydı verilen *An. messeae* ve *An. melanoon* türlerinin hatalı teşhise dayandığı belirtilmiş ve daha önce *An. elutus* olarak verilen *An. sacharovi*'nin varlığı desteklenmiştir. *An. maculipennis s.s.* türünün özellikle Kuzey, Kuzeybatı, Orta ve Doğu Anadolu bölgelerinde yoğun olmak üzere Türkiye'nin büyük bir kısmında, *An. sacharovi*'nin ise tipik olarak Göller Bölgesi ve Orta Anadolu'nun güneyleri ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, araştırmacılar, *An. subalpinus*'un da *An. melanoon*'un alt türü olarak Göller Bölgesi, Marmara ve Orta Karadeniz bölgesinde

sınırlı habitatlarda bulunduğunu ifade etmişlerdir. Taksonomik değerlendirmede ergin dişi, larva ve yumurta morfolojilerine ait diyagnostik karakterlerin kullanıldığı bu çalışmada komplekse ait taksonlardan *An. melanon* ve *An. subalpinus* türlerinin sistematik sorunlarına bir çözüm getirilememiştir.

Ülkemizde daha sonra yapılan çalışmalar ise daha çok bir derleme şeklinde ele alınmış olup *An. melanoon*'nun varlığı şüphesini korumuştur (Kasap ve Kasap, 1983; Ramsdale ve Snow, 2000; Alten *et al.*, 2000; Ramsdale *et al.*, 2001). Nitekim *An. messeae*, *An. melanoon* ve *An. subalpinus* yumurtaları arasındaki benzerliklerin teşhiste sık sık karışıklıklara yol açması (Hackett, 1934; Hackett ve Lewis, 1935; Postiglione *et al.*, 1970; Linton *et al.*, 2002a, Linton *et al.*, 2002b; Bezzhonova *et al.*, 2008) nedeniyle elde edilen sonuçlara dayalı olarak hazırlanan türlerin dağılım haritalarına da hep şüpheyle bakılmıştır.

2.5. *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ'NİN GENEL BİYOLOJİK, EKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

***Anopheles artemievi*:** *An. artemievi* daha önceki çalışmalarda *An. martinius* olarak yanlış tanımlanmıştır. Yeni bir tür olarak 2005'deki teşhisten sonra sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda bu türün dağlar arasındaki alçak kesimlerde daha baskın olduğu tespit edilmiştir. Yumurtlamak için bataklık gibi, durgun ve yavaş akan, iyi ısınan, çakıllı dere yataklarını tercih ettikleri bildirilmiş olup, *An. martinius* türünün biyo-ekolojik özelliklerini taşıdığı kabul edilmektedir (WHO, 2008).

***Anopheles atroparvus*:** Zoofilik olmasına rağmen, özellikle yoğun popülasyonlara ulaştığında oldukça önemli bir vektör tür olan *An. atroparvus*, Riga (Letonya)-Astrakhan (Rusya) hattının batısında yayılış göstermektedir (WHO, 2005). Üreme habitatı olarak, floral yönden zayıf, mineralce zengin nispeten acı ve soğuk suları tercih etmesine rağmen tatlı sularda da bulunabildiği rapor edilmiş olup, temiz, pH 6.0–8.0 aralığındaki akışkan sularda bulunmaktadır. *An. atroparvus*, tuz konsantrasyonundaki ani yükselmelere karşı *An. messeae*'den daha dayanıklıdır. Çiftleşmeleri daha çok ahır duvarlarında gözlenen bu türün erkeklerinin çiftleşme

kümesi oluşturduğuna rastlanmamıştır (De Buck *et al.*, 1930). Hibernasyon için ılık yerleri tercih eden *An. atroparvus* sıcağa karşı da oldukça dirençli olup, kış boyunca nadiren kan emer ve havaların ısınmasıyla *An. messeae* ve *An. maculipennis s.s* türlerine göre daha kısa sürede aktif hale gelir (Hackett ve Missiroli, 1935; Cambournac *et al.*, 1938).

***Anopheles beklemishevi*:** *An. maculipennis s.s.* ile allopatrik olarak dağılım gösterir (Stegnii ve Kabanova, 1976). Soğuk seven bir türdür ve dünya üzerindeki dağılışı da güney sınırı 60° Kuzey enlemi olacak şekilde tayga ormanları ve yüksek ovalardır (Ramsdale ve Snow, 2000).

Bu bölgelerde organik kirlenme gösteren, durgun ve soğuk sulara yumurta bırakırlar, *An. maculipennis s.s.*'da olduğu gibi tam bir hibernasyon gösterirler. Zoo-antropofilik (kan emmek için hem insan hem hayvanları tercih etme) özelliği göstermeleri bakımından insan sağlığının yanı sıra hayvan sağlığı açısından da önemli bir yer tutmaktadır (White, 1978).

***Anopheles labranchiae*:** Yumurtlamak için tuzlu suları tercih etmesi yönüyle *An. atroparvus*'a benzese de farklı iklimik bölgelere özelleşmişlerdir. Ancak, farklı türlerle rekabetin olduğu durumlarda tatlı suları da tercih edebilmektedirler. Hem laboratuvar hem doğal koşullarda kış durgunluğu (diapoz) karakteristik olsa da sıcaklığın yükselmesiyle hibernasyon kırılabilen ve kışın da yumurta bırakabilmektedir. Çiftleşme sırasında çiftleşme kümesi oluşturmaktadırlar. Endofilik karakterde olup uygun koşullarda ekzofilik özellik de gösterir (Kettle ve Sellick, 1947).

***Anopheles maculipennis s.s.*:** Kışın başlamasıyla vücutlarında yağ biriktirir ve soğuk ahırlarda gerçek bir diapoz gösterir. Daha düşük sıcaklıklarda daha hızlı yumurta geliştirip bırakabilmesi bu türün soğuk iklim bir diğer adaptasyonu olarak gösterilmiştir (Kettle ve Sellick, 1947). *An. maculipennis s.s.* dişilerinin her bir yumurta bırakma döneminde *An. messeae*'ye göre daha az yumurta bıraktığı bildirilmiştir. *An. messeae* daha sakin sulara yumurta bırakmayı tercih ederken, *An. maculipennis s.s* hafif akıntının olduğu oksijence zengin suları tercih ederler (Hackett

ve Missiroli, 1935; White, 1978). Yoğun populasyonlarına deniz seviyelerinde rastlansa da 2300 m yüksekliğe kadar çıkabilmektedir (Postiglione *et al.*, 1973).

Anopheles melanoon: *An. maculipennis s.s.* ve *An. messeae*'ye göre tuzluluğa direnci fazla olsa da *An. sacharovi* kadar dayanıklı değildir (Bates ve Hackett, 1939). Vejetasyonca zengin, aşırı sulak, tarıma elverişsiz arazilerde veya güneş alan bataklık ve pirinç tarlalarında yumurtlarlar. Zoofilik özellikte olmasına rağmen etkili bir vektör olduğu düşünülmektedir (WHO, 1989).

Anopheles messeae: Kuzey Avrupa'da baskın bir türdür. Yumurtlamak için genellikle durgun, soğuk suları tercih etmektedir. Dar alanda, küçük boyutlu kafeslerde çiftleşmelerinin zor olduğu, oluşturulan kültürlerde tespit edilmiştir. Erkekler sıklıkla çiftleşme kümesi oluşturmaktadır. Kışları soğuk ahırlarda tamamen hibernasyona girerek beslenmesini ve eşeyssel aktivitesini durdurur (Hackett ve Missiroli, 1935). Avrupa'daki en önemli vektör olarak bilinmektedir (WHO, 1988).

Anopheles martinius: Tür, güneyde 46° Kuzey enlemini sınır alacak şekilde Türkmenistan, Özbekistan ve Kazakistan'da yayılış göstermektedir. Genellikle vejetasyon oranı yüksek durgun sulara yumurta bırakırlar. Larvaların tuzluluğa direnci yüksektir. Ergin sinekler, sıcak sevmektedirler ve kan emmek için hayvanlardan çok insanları tercih etmektedir. Kışlama davranışları *An. messeae*'ye benzer. Eylül- Şubat ayları arasında diyapozaya girerler (WHO, www.who.int/whr/en/index.html).

Anopheles sacharovi: *An. labranchiae* ile karşılaştırılacak olursa, üreme alanları benzerlik gösterse de larvaların tuz konsantrasyonuna toleransı daha yüksektir. Güneşe açık, durgun, yoğun vejetasyonlu suları tercih eder. Erkekler doğada çiftleşme kümesi oluşturur.

An. labranchiae'da olduğu gibi ısıya duyarlı bir hibernasyon gözlenir (Hackett ve Missiroli, 1935). *An. sacharovi*, *An. melanoon* ve *An. maculipennis s.s.* türlerine göre saklanmak için hayvan barınakları yerine evleri daha çok tercih etmekte olup, vektörel bakımdan bu durum oldukça önemlidir (Postiglione *et al.*, 1973).

Yaz başlarında, *An. maculipennis s.s.* tarafından tercih edilen, yosunlu ve gölgesiz göletler, yaz sonlarına doğru havaların ısınmasıyla *An. sacharovi* tarafından işgal edilmektedir (Hackett ve Missiroli, 1935).

Anopheles persiensis: Kompleksin son yıllarda tanımlanmış yeni bir türüdür ve sıklıkla kıyı bölgelerindeki uygun habitatları tercih etmektedir. *An. melanoon*'un yumurta morfolojisinin bu yeni türün yumurtalarına çok benzediği bildirilmiştir (WHO, 2008). Bu durum, daha önce İran ve Azerbaycan'ın bazı bölgelerinden *An. melanoon* olarak bildirilen populasyonların aslında bu yeni türe ait olduğunu göstermektedir. Ancak, bu türün bu bölgelerde öncelikli habitat tercihlerinin ne olduğuna ilişkin yeterli bilgi yoktur ve henüz biyo-ekolojik özellikleri konusunda ayrıntılı bilgi elde edilememiştir.

An. daciae için de durum benzerdir. Ve *An. daciae* da *An. messeae* ile benzerlik göstermektedir. Moleküler yakınlıkları da oldukça yüksektir ve hatta tür statüsü konusunda bazı tartışmalar devam etmektedir (Nicolescu *et al.*, 2004; Bezzhonova ve Goryocheva, 2008; WHO, 2008).

Vektörel özellik konusunda değinilmesi gereken önemli husus, türlerin kan emme davranışlarıyla ilgilidir. Türler bu davranışlarına göre ikiye ayrılmaktadır: antropofilik (kan emmek için insanı tercih eden) ya da zoofilik (hayvanı tercih eden).

Kiszewski *et al.* (2004) vektör *Anopheles* türlerinde emilmiş olan kanların analizleriyle, insan kanı ortanca (medyan) değerlerini türler arasında 0.01 ile 0.98 arasında değiştiğini tespit edilmiştir. Bu çalışmada *An. maculipennis* kompleksine ait türlerin durumu şu şekilde verilmiştir: *An. atroparvus*: 0.245, *An. labranchiae*: 0.151, *An. messeae*: 0.172, *An. sacharovi*: 0.087. Şimşek (2006), İran'da ve Türkiye'de (Şanlıurfa) ev ve ahırlardan daha önceden tespit edilen tür yoğunluğundaki farklılığı dikkate alarak türlerin beslenme eğiliminin buldukları ortama göre önemli ölçüde değiştiğini belirtmiştir.

Linton *et al.* (2007) 'nin derlediği bilgilere göre de *An. atroparvus*, *An. labranchiae* ve *An. sacharovi* Avrupa için en etkin vektörler olarak gösterilirken, *An. messeae*'nin

de Rusya ve Ukrayna için potansiyel bir vektör olduğuna işaret edilmiştir. Ülkemizde *An. superpictus* ve *An. claviger*'in de önemli vektörler olduğu tespit edildiyse de *An. sacharovi* özellikle yaz aylarındaki yoğunluğuyla en etkin sıtma vektörüdür (Şimşek, 2005; Djadid *et al.*, 2007; WHO, 2008).

2.6. *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ'NİN PALEARKTİKTEKİ DAĞILIŞI

Türlere göre www.mosquitocatalog.org ve www.who.int/en/index.html veri tabanı kaynakları esas alınarak hazırlanmış liste aşağıdaki gibidir:

***Anopheles artemievi* Gordeev, Zvantsov, Goryacheva, Shaikevich ve Yezhov, 2005:** Kırgızistan

***Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927:** Avusturya, Belarus, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İrlanda, İtalya, Litvanya, Letonya, Moldova, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsviçre, Ukrayna, İngiltere, Sırbistan, Karadağ.

***Anopheles beklemishevi* Stegnii ve Kabanova, 1976:** Finlandiya, Rusya, İsviçre.

***Anopheles daciae* Linton, Nicolescu ve Harbach, 2004:** Romanya, Fransa.

***Anopheles labranchia* Falleroni, 1926:** Cezayir, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Fransa, Yunanistan, İtalya, Libya, Fas, Romanya, İspanya, Tunus.

***Anopheles maculipennis* Meigen, 1818:** Arnavutluk, Ermenistan, Avusturya, Belarus, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Gürcistan, Almanya, Yunanistan, Hırvatistan, İran, Irak, İtalya, Litvanya, Letonya, Luksemburg, Makedonya, Moldova, Hollanda, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsviçre, İsveç, Suriye, Tacikistan, Türkiye, Ukrayna, Birleşik Arap Emirliği, Sırbistan, Karadağ

Anopheles martinius Shingarev, 1926: Afganistan, İran, Kazakistan, Kırgızistan, Özbekistan.

Anopheles melanoon Hackett, 1934: Bosna - Hersek, Bulgaristan, Yunanistan, İtalya, Makedonya, Romanya, Rusya, İspanya.

Anopheles messeae Falleroni, 1940: Arnavutluk, Avusturya, Belarus, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İrlanda, İtalya, Kazakistan, Kırgızistan, Letonya, Litvanya, Makedonya, Moldova, Mongolya, Hollanda, Norveç, Polonya, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İsviçre, İsveç, Ukrayna, İngiltere.

Anopheles persiensis Linton, Sedaghat ve Harbach, 2003: İran, Azerbeycan.

Anopheles sacharovi Favre, 1903: Afganistan, Arnavutluk, Ermenistan, Avusturya, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Fransa, Yunanistan, İran, Irak, İsrail, İtalya, Ürdün, Lübnan, Makedonya, Polonya, Rusya, Suriye, Tacikistan, Türkiye, Sırbistan, Karadağ.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ALANSAL ÇALIŞMALAR

Araştırma alanı olarak belirlenmiş olan bölgelerde coğrafik-ekolojik bir yaklaşımla ayrıntılı olarak Haziran 2007-Haziran 2008 tarihleri arasında ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinin 37 lokalitesinde *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin larva-pupa ya da erginleri için örnekleme çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmaların yapıldığı lokaliteler kodlanarak yüksekliği ve koordinatları GPS ile belirlenerek kaydedilmiştir.

Araştırma süresince örnekleme yapılan lokaliteler (tez içerisinde kullanılan kodlarıyla birlikte), tarihler ve toplanan örnek sayıları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.1.1. Larva Örnekleme

Arazi çalışması kapsamındaki bölgelerde bulunan göl, gölet, akarsu, dere, bataklık, kuyu ve havuz gibi doğal ya da yapay, sivrisineklerin üremesi için uygun alanlar taranmıştır. Larva kepçeleri ve pipetler ile larva ve pupa örnekleri alınmıştır. Her bir üreme alanından toplanan örnekler ayrı ayrı örnekleme kaplarına konularak, tarih ve yeri belirtecek şekilde etiketlenmiştir.

3.1.2. Ergin Örnekleme

Ergin örnekleme karanlık (günbatımından gündeğümüne kadar) ve aydınlık (gündeğümünden günbatımına kadar) olmak üzere iki dönemde, CDC (Centers for Diseases Control)-ışık tuzakları (John W. Hock, Florida) ve ağız aspiratörleri kullanılarak yapılmıştır. CDC-ışık tuzakları örnekleme lokalitelerinde sivrisineklerin aktif oldukları akşam saatlerinde hem ahır ev gibi kapalı alanlara hem de açık alanlara kurulmuştur. Işık tuzakları tüm gece boyunca çalıştırılarak ergin sivrisinekler yakalanmıştır. Açık ve kapalı alanlara kurulan tuzaklarla endofil veya ekzofil davranış eğilimi olan türlerin tümü için uygun bir örnekleme yapılabilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.1. Örneklem noktaları ve belirlenen türler

No	Kod	Şehir	Lokalite Adı	Belirlenen türler (örnek sayısı)
1	AH	Adana	Herekli	<i>An. sacharovi</i> (6)
2	AT	Adana	Tepecikören	<i>An. sacharovi</i> (1)
3	AK	Adana	Kapıkaya- Çiftlik	<i>An. sacharovi</i> (5)
4	AyBk	Aydın	Bıyıklı köyü	<i>An. sacharovi</i> (1)
5	AyB	Aydın	Belevi	<i>An. sacharovi</i> (5)
6	AyTb	Aydın	Tuzburgazı	<i>An. sacharovi</i> (5)
7	BuC	Burdur	Çine köyü Ağlasun	<i>An. maculipennis</i> (1)
8	BK	Burdur	Karakent köyü	<i>An. sacharovi</i> (2)
9	BuG	Burdur	Göhlisar	<i>An. maculipennis</i> (1), <i>An. melanoon</i> (5)
10	BI	Burdur	İlyasköy	<i>An. sacharovi</i> (1)
11	CH	Çankırı	Hacılar -Kızılırmak	<i>An. maculipennis</i> (10), <i>An. sacharovi</i> (1)
12	EAK	Edirne	Alibeyköy	<i>An. maculipennis</i> (1), <i>An. melanoon</i> (2)
13	EAv	Edirne	Avarız	<i>An. melanoon</i> (1)
14	EC	Edirne	Çukurköy	<i>An. melanoon</i> (1)
15	EGg	Edirne	Gala gölü	<i>An. melanoon</i> (2)
16	EI	Edirne	İpsala	<i>An. sacharovi</i> (1)
17	IK	Iğdır	Küllük	<i>An. maculipennis</i> (3)
18	IP	Iğdır	Pirli	<i>An. maculipennis</i> (3)
19	IS	Iğdır	Söğütlü	<i>An. maculipennis</i> (3)
21	KA	Konya	Afşar	<i>An. maculipennis</i> (6)
22	KBg	Konya	Beyşehir Gölü	<i>An. maculipennis</i> (1),
23	KDh	Konya	Doğanhisar	<i>An. maculipennis</i> (1)
24	KeB	Kırklareli	Beypınar	<i>An. maculipennis</i> (2)
25	KeDk	Kırklareli	Dereköy	<i>An. maculipennis</i> (6)
26	KBd	Kırklareli	Böcek deresi	<i>An. maculipennis</i> (1)
27	MeH	Mersin	Hurma köyü	<i>An. sacharovi</i> (5)
28	MA	Muğla	Akçapınar	<i>An. sacharovi</i> (1)
29	MK	Muğla	Kapıkargın	<i>An. sacharovi</i> (4)
30	SC	Samsun	Çarşamba	<i>An. maculipennis</i> (2)
31	SD	Samsun	Dereköy	<i>An. maculipennis</i> (2)
32	ST	Samsun	Taflan	<i>An. maculipennis</i> (1)
33	SM	Samsun	19 mayıs	<i>An. maculipennis</i> (3), <i>An. sacharovi</i> (2)
34	SY	Samsun	Yörükler	<i>An. melanoon</i> (1)
35	SuCd	Şanlıurfa	Çamlıdere	<i>An. sacharovi</i> (5)
36	SuI	Şanlıurfa	İncirli Köyü	<i>An. sacharovi</i> (6)
37	SuP	Şanlıurfa	Pamuklu	<i>An. sacharovi</i> (4)

Aydınlık dönemde ise ağız aspiratörleri, endofil dinlenme davranışının yaygın olduğu bu grupta hayvan barınakları, kiler, depo, ev gibi kapalı alanlarda hem üreme döneminde hem de kışlama dönemlerinde oldukça etkili bir yakalama aracı olmuştur. Bu yöntemle özellikle hayvan ahırlarından hem kan emmiş ya da gravid (yumurta geliştirmiş) ergin dişiler hem de erkekler yakalanmış olup, dişilerden yumurta bırakabilecek durumda olanlar yumurtlatma kaplarına alınarak yumurtlamaları sağlanmıştır. Elde edilen diğer ergin bireyler ise %80 etil alkol içeren tüplere alınarak etiketlenmiş ve arazi tipi termoslarda laboratuara getirilmiştir.

3.2. LABORATUAR ÇALIŞMALARI

3.2.1. Yumurtaların İncelemesi

Arazi çalışmalarında yakalanmış ve henüz yumurta bırakmamış olan kan emmiş ya da gravid dişi bireyler, laboratuvar ortamında içerisinde 100 ml distile su bulunan, 200ml'lik silindirik, plastik yumurtlatma kaplarına alınmıştır. Birkaç gün içerisinde yumurta bırakan dişilerin yumurta kaplarından alınarak örnekleme lokalitesine göre kodlandırılmış ve %80 etil alkol içeren 1,5 ml'lik eppendorf tüplere konularak +4°C'de DNA izolasyonunun gerçekleştirileceği tarihe kadar saklanmıştır.

Elde edilen yumurtaların morfolojik özellikleri Leica marka ışık mikroskobu ile incelenmiştir. İncelenen yumurtalar Casio Exilim dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanarak bilgisayar ortamına aktarılmış, kodlanarak arşivlenmiştir.

3.2.2. *Anopheles maculipennis* kompleksi örneklerinden DNA izolasyonu

Arazi çalışmalarıyla elde edilmiş ve laboratuvar ortamında %80'lik etil alkol içeren 1,5 ml'lik mikrosantrifuj tüpleriyle +4°C'de koruma altına alınmış olan örneklerden E.Z.N.A. Tissue DNA isolation kiti (Omega) kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş olup, DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin aşamaları aşağıda verilmiştir;

1. Eppendorf tüplere (1,5 ml'lik) alınmış ve üzerine 200 ul tampon TL eklenmiş örnekler mekanik olarak parçalanmıştır.

2. Elde edilen karışımın üzerine 25ul OB proteaz eklenmiş ve hafifçe vortekslenen karışım tüpü lizis işlemi için ısıtma bloğunda 2 saat 55°C'de tutulmuştur.
3. 2 saat sonrasında 220 ul BL tampon eklenip vorteksle tekrar karıştırılmış ve 70°C'de 10 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır.
4. 14000 g'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant alınmış, süpernatant üzerine 220ul mutlak etanol ekleyip vorteksle karışması sağlanmıştır.
5. 14500 g'de 2 dakika santrifüjle peletin tamamen çökmesi sağlanmıştır.
6. Süpernatantı kolon takılmış tüpe aktardıktan sonra 10000 g de 1 dakika santrifüjleyerek DNA'nın kolona tutulması sağlanmıştır.
7. İçerisinde gereksiz moleküllerin bulunduğu toplama tüpü değiştirilerek 500 ul HB tamponu eklenmiştir.
8. 10000 xg'de 1 dakika santrifüj yapılmış ve toplama tüpü tekrar değiştirilmiştir.
9. Yıkama amaçlı olarak etanol eklenmiş 700 ul DNA'ya yıkama tamponu eklenmiş, tekrar 10000 xg de santrifüj yapılarak ürünün temizlenmesi sağlanmış ve aynı tüpü kullanarak yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
10. Maksimum hızda 2 dakika daha santrifüj edilerek etanol tamamen uzaklaştırılmıştır.
11. Kolon yeni, temiz toplama tüpüne alındıktan sonra 100 ul 70°C'deki elusyon tampon kolonun tam ortasına eklenmiş ve yaklaşık 3 dakika DNA'nın bu çözeltide çözünmesi beklenmiştir.
12. Çözünme işleminden sonra 13000 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA geri kazanılmıştır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA izolasyonları sonrasında elde edilen genomik DNA'dan 28SR 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3' ve 5.8SF 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' primerleri (Biobasic) kullanılarak (Collins ve Paskewitz, 1996) Eppendorf marka PCR makinasında örneklerin ITS2 bölgesi çoğaltılmıştır. Reaksiyonda herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını görmek amacıyla bir tüpe de 1ul DNA yerine steril distile su koyulmuştur. Reaksiyon için hazırlanan karışım Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon protokolü (*, kontrol karışımında steril distile su kullanılmıştır)

Reaktifler [konsantrasyon]	Her bir PCR için hacim
Tampon [10 X (Bioron)]	2,5 µL
MgCl ₂ [25 mM] (Bioron)	1,5 µL
dNTPs [0,5 mM] (Fermentas)	2 µL
Primerler [20 M]	0,625 µL
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U/ mL)(Bioron)	0,1 µL
DNA *	1 µL (50ng)
dd H ₂ O	17,275 µL

DNA çoğaltımı:

Hazırlanan PCR karışımı 0.2ml PCR tüplerinde Eppendorf marka PCR makinası ile ilk denatürasyon 94°C'de 5 dakika, daha sonra 25 döngü olacak şekilde 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 53°C'de 45 saniye primer bağlanması (annealing), 72°C'de 45 saniye uzama (extension) gerçekleştirilmiştir. Son olarak tamamlanmamış olabilecek dizilerin tamamlanması için fazladan 72°C'de 10 dakika uzama olacak şekilde reaksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen PCR ürünü sonraki işleme kadar +4°C'de tutulmuştur.

3.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel elektroforeziyle Kalitesinin İncelenmesi

Elde edilen PCR ürünleri 4 µL 6X yükleme tamponuyla birlikte (%50 gliserol, 0,1 M EDTA, % 1 SDS, % 0,1 bromfenol mavisi, ksilen siyanol) %2'lik agaroz (Sigma) jelde, %1 etidyum bromürlü (EtBr) 1X TBE tamponu kullanılarak GeneRuler marka Low Range (Fermentas) DNA büyüklük belirteci (sırasıyla 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 bp parçalar içermektedir) ile birlikte elektroforez yapılmıştır. Bu işlem için aşağıdaki sıra izlenmiştir:

1. 2 g agaroz (Sigma) 100 mL 1X TBE tamponu [5 L: 54 g Tris-base, 27,5 g Borik asit, 3.72 g EDTA (sulu), pH: 8.0] içerisinde homojen halde eritilerek 60°C'ye kadar soğutulmuştur.
2. 3 µL EtBr(Etidyum bromür) (5 mg/mL; 50 mg EtBr, 10 mL Distile su) eklenerek iyice karıştırılmış ve içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel kabına dökülerek soğutulmuştur.
3. Hazırlanmış olan jele, her bir PCR ürününden 5 µL kadar yüklenmiş, son kuyucuğa DNA yerine steril distile su kullandığımız negatif kontrol yüklenmiştir.
4. İlk kuyucuğa 4µL Fermentas marka DNA büyüklük belirteci yüklenmiştir.
5. Elektroforez, güç kaynağı ile 80 mA'de 1 saat çalıştırılmış ve ayrışım sonucundaki jel görüntüleme sistemi (Vilbert Lourmat) ile görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

Görüntü sonucunda herhangi bir özgül olmayan bant gözlenmemesi sonucu PCR ürünü doğrudan Gen Elute PCR saflaştırma kiti (Sigma) kullanılarak temizlenmiş ve 50ul elusyon tamponunda sağaltılmıştır.

3.2.5 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması İşlemi

1. Santrifuj tüplerinde hazırlanmış olan kolonların her birine 0,5 ml ‘hazırlık çözeltisi’ eklenip, 12000 xg'de 45 saniye santrifuj yapıldıktan sonra toplama tüpü değiştirilmiştir.
2. Hacmen 1X PCR ürününe 5X ‘bağlanma çözeltisi’ karıştırıp bu kolona yüklenmiştir.
3. 14000 xg'de 1 dakika santrifuj yapıldı ve tekrar toplama tüpü değiştirilmiştir.
4. 0,5 ml ‘yıkama tamponu’ kullanılarak maksimum hızda santrifujle PCR ürünü yıkanmış ve ardından 2 dakika maksimum hızda santrifuj yapılmıştır.
5. Toplama tüpünü son kez değiştirdikten sonra 50 ul ‘geri kazanım tamponu’ ekleyerek DNA'nın çözünmesi için 3–5 dakika bekleyerek maksimum hızda santrifuje tabi tutulduktan sonra DNA geri kazanılmıştır.

Geri kazanılan ürün, kalitesini saptamak için daha önceden yoğunlukları saptanmış DNA örnekleri (marker) ile eşit hacimde agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. UV ışığı altında DNA bantları yoğunluklarıyla orantılı olacak şekilde ışığa yaptıkları için istenilen yoğunluğa sahip referans DNA ürünüyle aynı kalitede olup olmadığı ve DNA'nın bir hasar görüp görmediği de bu şekilde tespit edilmiştir.

50–250 ng/ul DNA içeren ürünler, PCR primerleri kullanılarak DNA dizilemesi yapılması için MacroGen (Seul, Güney Kore) firmasına gönderilmiştir. Firmadan gelen dizi sonuçları bilgisayar ortamında incelenmiştir.

Bütün bu laboratuvar işlemleri sırasında, DNA'nın UV'ye veya denatüre edici ajanlara maruz kalıp bozulmamasına dikkat edilerek, proteinlerin denatürasyonu ya da erken aktivasyonunu önlemek için buzda, kontaminasyonu önlemek amacıyla da steril malzemeler kullanarak, pudrasız lateks eldivenle Laminair Flow kabinde çalışılmasına özen gösterilmiştir.

3.2.6. DNA Dizi Verilerinin Analizi

Çalışılan rDNA ITS2 genom bölgesi hem ileri (forward) hem de tersine (reverse) PCR primerleri ile dizlenmiştir. Elde edilen nükleotit dizileri Bioedit ve Chromas Lite bilgisayar programları ile tersine DNA nükleotit dizileri ters komplementer diziye dönüştürülmüş ve bu diziler bire bir karşılaştırılarak her bir bireye ait dizilerin doğruluğu kontrol edilmiştir. Her bir bireye ait nükleotit dizilerinin hizalanması için BioEdit programı kullanılmıştır. Özellikle primer bağlanma bölgelerinde oluşabilecek yanlış baz okumalarına karşı kromatogramlarda yapılan kontrollerle dizilerdeki hatalar düzeltilmiş ve fazla uzamadan kaynaklı 3' uçlardaki fazlalıklar eşitlenerek ham veri kullanılabilir hale getirilmiştir.

Elde edilen her DNA dizisi fasta formatında kaydedilip, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> web sitesi üzerinden GenBank'ta bulunan dizilerle karşılaştırılmış ve GenBank'ta en yüksek benzerlik gösteren diziler seçilerek BioEdit programında ClustalW çoklu eşleme yöntemi ile elde ettiğimiz dizilerle birlikte analize alınmış, benzerlik oranları ve baz kompozisyonları ortaya konulmuştur.

3.2.7. Dendogramların Oluşturulması

Hizalanmış DNA dizisi veri seti diziler arasındaki genetik ilişkiyi karşılaştırmak için CLC DNA Workbench programı kullanarak 100 tekrara dayalı ve topografik bir UPGMA dendogramı oluşturulmuştur. Elde edilen dendogram nexus formatında kaydedilerek TreeViewX programında düzenlenmiştir.

3.3. *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ'NİN DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

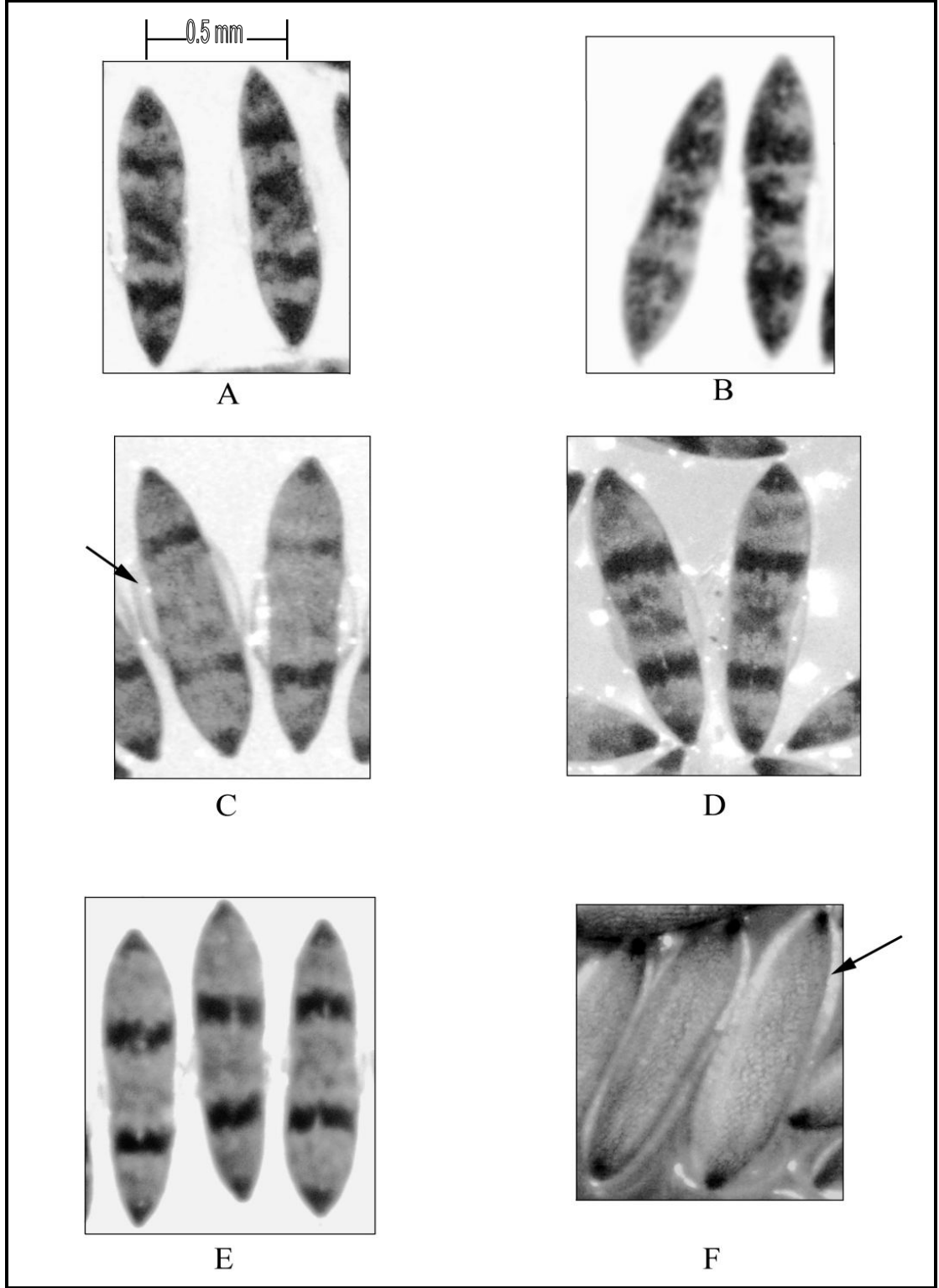
Versamap programı kullanılarak hazırlanmış olan Türkiye haritası üzerinde hem örnekleme lokaliteleri hem de örnekleme lokalitelerinde moleküler yöntemlerle tespit edilen türlerin dağılımı verilerek, türlerin allopatrik simpatrik durumları gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Anopheles maculipennis* s.l. YUMURTALARININ İNCELENMESİ

Anopheles maculipennis kompleksi türlerinin ayırımında uzun yıllar kullanılan yumurtaların yüzgeç yapısı, desen şekli, bantlanmanın olup olmaması gibi yumurta karakterleri bugün dahi moleküler yöntemler uygulanamıyorsa geçerli olarak kabul edilmektedir. Ancak, bazı türlerin yumurtaların birbirine çok yakın karakterler taşıması, bazı türlerde de yumurtaların polimorfik özellik göstermesi, ayrıca, yumurta karakterlerinin sıklıkla yumurtanın bırakıldığı ortam koşullarına bağlı olarak değişebilmesi gibi nedenlerle yumurta karakterleri tür teşhisinde karışıklıklara neden olmaktadır. Araştırmamız kapsamında komplekse ait bir türün hem yumurta morfolojisinde farklılıkların olup olmadığını belirleyebilmek hem de yumurta morfolojisi ile moleküler analizlerin örtüşüp örtüşmediğini saptayabilmek amacıyla yumurta morfolojileri incelenmiştir. Bu amaçla araştırma alanı kapsamında 37 farklı lokaliteden yakalanan komplekse ait 35 dişi bireyin laboratuvar ortamında yumurtlatılması sağlanmış ve bu yumurtalar ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Değerlendirmelerimiz sonucunda temel olarak 3 farklı karaktere sahip yumurta tipi belirlenmiş olmakla beraber, bu tiplerden farklılıklar gösteren yumurta örnekleri de elde edilmiştir. Bu yumurta tiplerine ait örnekler Şekil 4.1’de verilmiştir.

Yumurta karakterlerinden yüzgeçlerin olup olmaması *An. maculipennis* kompleksi türlerinden *An. sacharovi* için kesin bir ayrımı sağlayabilmektedir. Çünkü kompleks içerisinde sadece bu türün yumurtasında belirgin yüzgeç oluşumu yoktur (Şekil 4.1, F). Kompleks türlerinin diğerlerinde ise yumurtanın iki yanında ve merkezde dışa doğru kıvrım yapmış belirgin bir yüzgeç oluşumu vardır (Şekil 4.1, C ve D). Ancak, yüzgeçler, yüzgeçli yumurta oluşturan kompleksin diğer pek çok türünü birbirinden ayırmaya yeterli değildir. Bu durumda desen ve bantlanma şekillerine başvurulmaktadır. Fotoğraflar üzerinde bu karakterleri değerlendirdiğimizde, *An. maculipennis* s.s. ve *An. melanoon* yumurtaları için tür tespitinin kolay olmadığı görülmektedir.

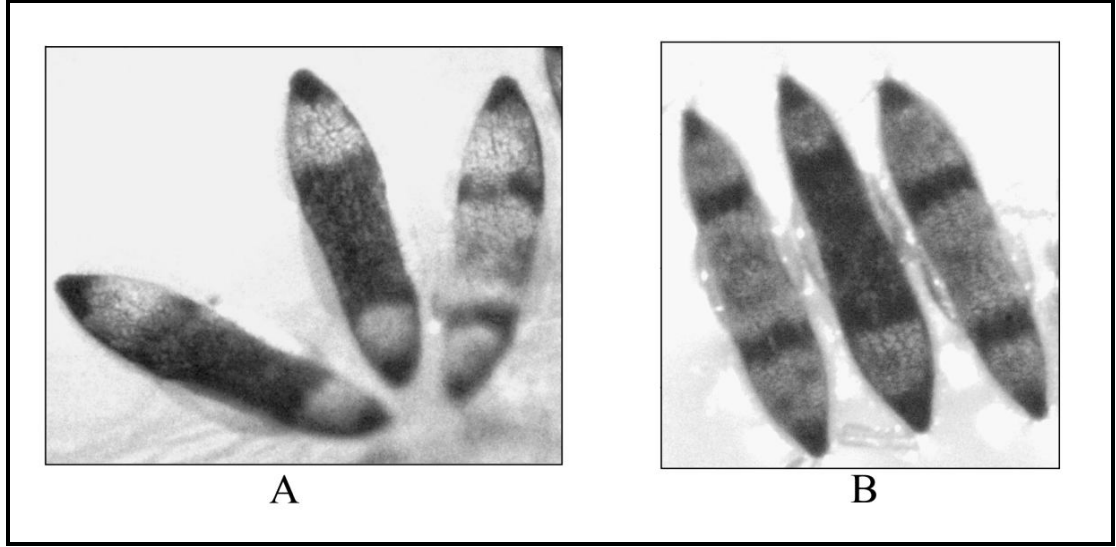


Şekil 4.1. Türkiye’de tespit edilen *Anopheles maculipennis s.l.* yumurtalarına ait fotoğraflar. (A, ve B, *An. melanoon*; C, D, E, *An. maculipennis s.s.* ; F, *An. sacharovi* yumurtası. Ok ile belirtilen yerler yumurtaların yüzgeç kısımlarını işaret etmektedir)

Bu yumurtalarda standart bir renklenmenin aksine populasyonlara özgü bazı değişiklikler göze çarpmaktadır. “Herhangi bir desenlenme olmadan tamamen koyu renkli” şeklinde tanımlanan *An. melanoon* yumurtasına araştırmalarımızda hiç rastlanmamıştır. “iki bant arasında renklenmelerin olduğu” tip yumurta olarak tanımlanan *An. melanoon* yumurtası [(yayında bu farklılıktan dolayı *An. subalpinus* olarak tanımlanmıştır (Lewis ve Hackett, 1935)] için yapılmış olsa da, A, B ve D ile gösterilen *An. melanoon* ve *An. maculipennis* yumurtaları bu “tip”e dahil edilebilir. B ile gösterilen *An. melanoon* yumurtasında desenlenme şekli A ile benzer olsa da ifadede geçen “iki bant” belirgin değildir. D ile gösterilen *An. maculipennis* yumurtasında ise belirgin olan iki bant arasında *An. maculipennis s.s.* türüne özgü yumurtada beklenmeyecek lekeler görülmektedir. Öyle ki, klasik *An. maculipennis s.s.* yumurtası olarak tanımlanan yüzgeçlerin bitim bölgesinde net iki koyu renk banda sahip yumurta tanımlamasına, şekilde en çok E harfiyle gösterilen yumurtaya uymaktadır. C ile gösterilen yumurtada bu bantlanmaların silik olabildiğini görmekteyiz. F ile gösterilen *An. sacharovi* yumurtasına bakacak olursak, korionda herhangi bir pigment birikimi bulunmadığından diğer fotoğraflarda görüldüğü gibi koyu bir renklenme veya bantlanma bulunmamaktadır. Hem bu karakterler hem de yüzgeç bulundurmaması göz önüne alındığında *An. sacharovi*'nin moleküler farklılığının yanı sıra türün teşhisi için yumurta morfolojisinden de yararlanılabileceği görülmektedir.

Yumurtlatma çalışmalarında belirlemiş olduğumuz diğer önemli bir sonuç da bir tek bireyin bıraktığı yumurtalar arasında da bazı anormal desen, renk ve bantlı farklı yumurtaların olmasıdır (Şekil 4.2). Görüldüğü gibi hem *An. melanoon* hem de *An. maculipennis s.s.* türüne ait bir tek bireyin oluşturduğu yumurtalar arasında da türün yumurta karakterinden sapmalar gösteren yumurta desenlenmeleri bulunabilmektedir.

Sonuç olarak incelemiş olduğumuz 35 bireye ait yumurta karakterleri göz önüne alındığında renklenmenin, gözlem ve ön değerlendirmede kullanılabilecek bir karakter olabileceği düşünülse de, tür içi varyasyonlardan dolayı *An. maculipennis* kompleks türlerinin teşhisi için güvenilir bir karakter olmadığı ortaya konmuştur.

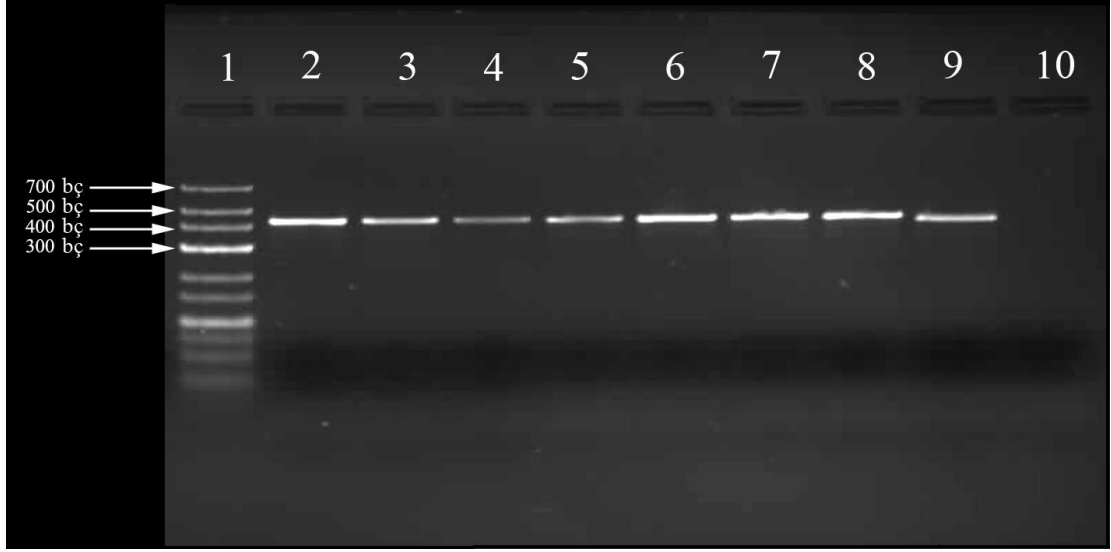


Şekil 4.2. İki farklı türde tek bireye ait yumurtalarda gözlenen desen farklılıkları [A, *An. melanoon* (Edirne); B, *An. maculipennis* (Iğdır)]

4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

Araştırmalarımız sonucunda ülkemizin farklı coğrafik bölgelerini temsil edecek şekilde 37 farklı lokaliteden *An. maculipennis* kompleksine ait 117 sivrisinek örneği toplanmıştır. Bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmış, rDNA ITS2 bölgesi çoğaltılmıştır. Elde edilen nükleer DNA'dan çoğaltılan PCR ürünlerinin (ITS2 bölgesi) % 2'lik Agaroz jelde elektroforezi yapılmıştır. DNA belirteciyle beraber elde edilen jel görüntüsünde farklı türlere ait ürünlerin bant pozisyonu bakımından varyasyon göstermediği ve bu nedenle de jel görüntüsüyle türler arasında ayırım yapılamayacağı belirlenmiştir (Şekil 4. 3).

DNA izolasyonu çalışmaları sonucunda elde edilen genomik DNA'lardan çoğaltılan ITS2 bölgelerinin nükleotit dizileri GenBank'taki dizilerle eşleştirilerek tür tanımlamaları yapılmış ve *An. maculipennis* kompleksi türlerinden *An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi* olmak üzere üç tür tespit edilmiştir. Dizileri karşılaştırılan 117 örneğin 15'inin *An. melanoon*, 47'sinin *An. maculipennis s.s.* ve 55'inin de *An. sacharovi* dizileriyle uygunluğu belirlenmiştir. Bu türlerden, en sık bulunan türün % 47'lik bulunma oranıyla *An. sacharovi* türü olduğu, bunu % 40'lik oranıyla *An. maculipennis s.s.* türünün izlediği ve *An. melanoon* türünün de % 13'lük oranıyla nadiren bulunan tür olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. *An. maculipennis s.l.* ITS 2 Bölgesi PCR ürünlerinin Agaroz Jel elektroforez görüntüsü. 1. Fermentas Gen Ruler Low Range DNA Ladder, 2. SuP1 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 3. SuP2 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 4. EAK1 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 5. KBg1 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 6. KBg2 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 7. CH7 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 8. CH8 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü, 9. KeDK4 kodlu örneğe ait ITS2 PCR ürünü 10. PCR'a kontrol olarak DNA yerine steril distile su içeren PCR karışımı 10. kuyucukta herhangi bir bant görülmemesi PCR karışımında bir kontaminasyon olmadığını işaret etmektedir. Diğer bantlar ladder ile karşılaştırıldığında 400 ile 500 bp arasında ürünler olduğu görülmektedir.

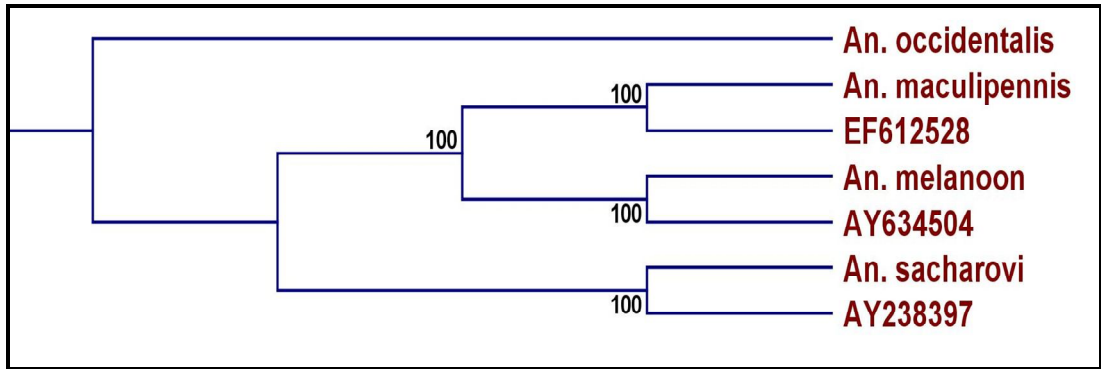
Dizilerin Gen Bankasındaki mevcut dizilerle karşılaştırılması sonucunda *An. melanoon* türüne ait dizilerin GenBankası AY634504 numaralı (Nicolescu *et al.*, 2004) dizisiyle, *An. maculipennis s.s.* dizilerinin GenBankası EF612528 numaralı (Djadid *et al.*, 2007) dizisiyle ve *An. sacharovi* türüne ait dizilerin GenBankası AY238397 numaralı dizisiyle (Di Luca *et al.*, 2004) ile %100 uyumlu olduğu belirlenmiştir. Araştırmalarımız sonucunda elde ettiğimiz örneklerimize ait ITS2 Bölgesine ait her bir türü temsil edecek şekilde seçilen birer örneğin ITS2 bölgesi dizi sonuçları ile GenBank'ta bulunan dizilerin eşleştirilmesi Şekil 4.4.'de sunulmuştur. Nokta (.) ile işaretli yerler üst sırada gösterilen referans türle aynı baz dizilimini [Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C)] işaret etmektedir. Dizide referans diziden farklı olan bazlar yine kısaltmalarla [Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C)] gösterilmektedir. (-) işareti ise bulunduğu diziye ait, türde referans alınan türe ait bireyin dizisine denk gelen noktada bir boşluk (insersiyon/delesyon) olduğunu gösterir. Dizinin sarı renk ile vurgulanan kısmı ITS2 bölgesini, altı çizili bazlar ise primer bağlanma bölgesini göstermektedir.

	10	20	30	40	50	
MEL-AY634504	TGTGAACATGC	AGGACACATG	AACACCCGATA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA	50
Eak1	50
MAC-EF612528	-----	-----	-----	-----	-----	45
BuG6	50
SAC-AY238397	50
AH1	50
	60	70	80	90	100	
MEL-AY634504	TCGCTCGGACA	CAGCTCGATG	TACACATTTT	TGAGTGCCCTA	TATTTGACTA	100
Eak1	100
MAC-EF612528	---	93
BuG6	---	98
SAC-AY238397T.....C.	100
AH1T.....C.	100
	110	120	130	140	150	
MEL-AY634504	TCC-AAGTCA	AAC TACGT--	AC-----	--CTCCGTGT	ACGTGTAT-G	136
Eak1	136
MAC-EF612528	-.G.....G..C..-	128
BuG6	-.G.....G..C..-	133
SAC-AY238397	..AG.....CG G.	--GG.GCC.C..A.	140
AH1	..AG.....CG G.	--GG.GCC.C..A.	140
	160	170	180	190	200	
MEL-AY634504	ATGATGAAAG	AGTTTGGAAA	---CACCATC	CT-TCTCTTG	CATTGAA-AG	181
Eak1	---	181
MAC-EF612528	---A	172
BuG6	---A	177
SAC-AY238397T.....G.C	GTAA.A....CA.....T.C	190
AH1T.....G.C	GTAA.A....CA.....T.C	190
	210	220	230	240	250	
MEL-AY634504	CGCAGCGTGT	AGCAGCCCCA	GGTTTCAACT	TGCAAAGTGG	CCATGGGGCC	231
Eak1	231
MAC-EF612528A.....T	222
BuG6A.....T	227
SAC-AY238397	..T..T....A..-	AG..C.....A.....	239
AH1	..T..T....A..-	AG..C.....A.....	239
	260	270	280	290	300	
MEL-AY634504	GACACCTCAC	CACCATCAGC	GTGC-TGTGT	AGCGTGTTCG	GCCCAGTTTCG	280
Eak1	280
MAC-EF6125	271
BuG6	276
SAC-AY238397	A.....T....G.....	T-T.....A.....T.....T..C.T.	288
AH1	A.....T....G.....	T-T.....A.....T.....T..C.T.	288
	310	320	330	340	350	
MEL-AY634504	GTCAATCGTGA	GGCGTTACCT	ATCGGGGAAG	CACA-CCCTG	TTGCGCGTAT	329
Eak1	329
MAC-EF612528A.....G.-A..	320
BuG6A.....G.-A..	325
SAC-AY2384	..T.A.....AAC..A	..CG.A.....ATA.AA	C.....	338
AH1	..T.A.....AAC..A	..CG.A.....ATA.AA	C.....	338
	360	370	380	390	400	
MEL-AY2384	CTCATGGTT-	--ACCTAACC	ATAGCAGCA-	GAGTTACAAC	ACCAGCTTCT	375
Eak1	375
MAC-EF6125C.....A.....G..C..	366
BuG6C.....A.....G..C..	371
SAC-AY238397C TA..C.....A..-A.....C.....	387
AH1C TA..C.....A..-A.....C.....	387
	410	420	430	440	450	
MEL-AY2384	AGCAGCGGGA	GCTCATGGGC	CTCAAATAAT	GTGTGACTAC	CCCCTAAATT	425
Eak1	425
MAC-EF612528	..T.....	---C.....	410
BuG6	..T.....	---C.....	415
SAC-AY2384	..TA.....	..TA..A..A.....	437
AH1	..TA.....	..TA..A..A.....	437
	500					
MEL-AY2384	TAAGCAT--	432				
Eak1--	432				
MAC-EF612528A-	418				
BuG6--	422				
SAC-AY238397--	444				
AH1--	444				

Şekil 4.4. Tespit edilen türlerin GenBankasındaki örneklerle eşleştirilmiş ITS2 dizileri

Moleküler analizleri yapılan 117 örneğimize ait dizi sonuçları değerlendirildiğinde, ITS2 bölgesinin uzunluğu ya da kompozisyonu bakımından tür içi herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir. Farklı bölgelerden toplanan *An. maculipennis*, *An. sacharovi* ve *An. melanoon* türleri kendi içerisinde %100 uyum göstermiştir. Bu sonuç, UPGMA tekniğiyle hazırlanmış dendogramda da görülmektedir (Şekil 4.5).

PCR fragmentlerinin primer bağlanma bölgeleriyle birlikte uzunlukları şu şekildedir: *An. maculipennis* için 422 bç, *An. melanoon* için 432 bç ve *An. sacharovi* için 444 bç. ITS2 bölgelerinin türlere göre uzunlukları da sırayla, 303, 308 ve 322 bç.'dir. Ayrıntılı baz kompozisyonu Çizelge 4.1.de verilmiştir.



Şekil 4.5. Tespit edilen türleri gösteren UPGMA tekniğiyle hazırlanmış dendogram *An. occidentalis* dış grup olarak alınmıştır. Dendogram oluşturulurken GenBank'tan birer dizi ve *An. maculipennis*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi* için tez kapsamında toplanan örneklerden her türü temsilen alınan bir dizi kullanılmıştır.

Dizilerin karşılaştırılması yapıldığında birbirine en yakın iki türün % 3.64 farklılıkla *An. maculipennis s.s.* ve *An. melanoon* türleri olduğu saptanmıştır. *An. sacharovi* ile *An. maculipennis s.s.* arasında % 14.7, *An. sacharovi* ile *An. melanoon* arasında % 15.2 fark saptanmıştır.

Bu sonuçlarla, kompleks içerisinde hem yumurta hem ergin morfolojisi açısından diğer türlerden belirgin farkları bulunan *An. sacharovi* türünün moleküler olarak da önemli farklılığa sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.1. Türlerle ait baz içerikleri

Tür (Toplam ürün bç)	G (%)	C (%)	A (%)	T (%)	G+C (%)	A+T (%)
<i>An. maculipennis s.s</i> 422 bç	100 (23,70)	113 (26,78)	110 (26,07)	99 (23,46)	50,47	49,53
<i>An. melanoon</i> 432bç	102 (23,61)	113 (26,16)	111 (25,69)	106 (24,54)	49,77	50,23
<i>An. sacharovi</i> 444 bç.	100 (22,52)	110 (24,77)	130 (29,28)	104 (23,42)	47,3	52,7

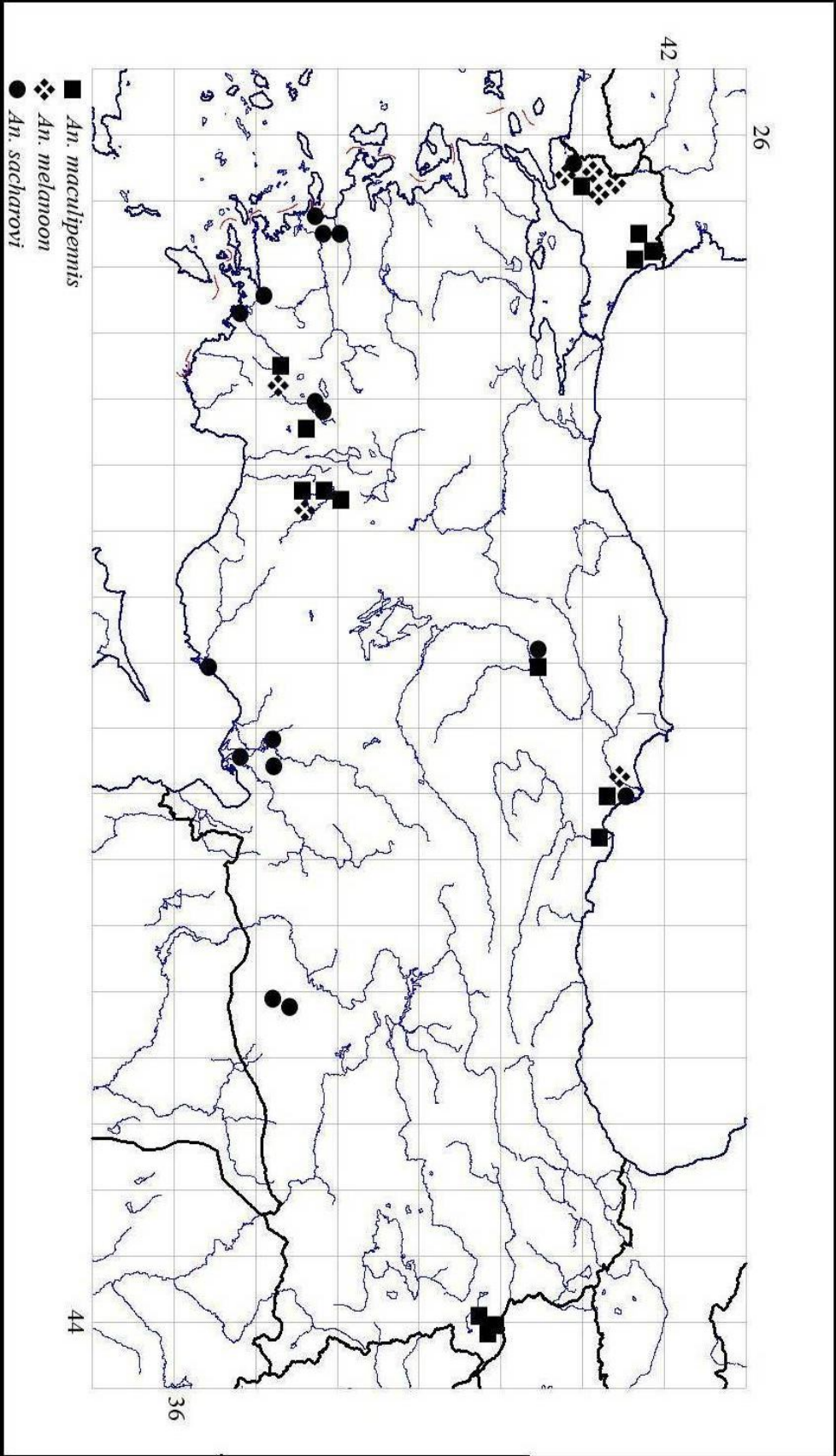
4.3. *Anopheles maculipennis* KOMPLEKSİ TÜRLERİNİN ÜLKEMİZDEKİ COĞRAFİK DAĞILIMI

Araştırma kapsamında belirlenen lokalitelerden toplanan örneklerin moleküler yöntemlerle teşhisi gerçekleştirildikten sonra, elde edilen veriler doğrultusunda, tespit edilen türlerin ülkemizdeki bölgelere göre dağılımı ortaya konulmuştur. (Çizelge 4.2., Şekil 4.6) Bu veriler bize daha detaylı çalışmalarla türlerin ekolojik isteklerinin belirlenmesine olanak sağlayacaktır. Bunun yanı sıra zoocoğrafik açıdan bir ön değerlendirme yapılabilecek bir ön değerlendirme aşağıda maddeler halinde yazılmıştır:

1. Akdeniz, Karadeniz ve Trakya bölgelerinde, çalışmada tespit edilen üç tür de bulunmuştur. Önceki yayınları da (Postiglione *et al.*, 1973; Linton *et al.*, 2007) destekler nitelikte, bu türlerin simpatrik olarak dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir.
2. Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde örnekleme lokaliteleri sonuçlarına göre yalnızca *An. sacharovi* türünün bulunduğu, tespit edilmiştir. Akdeniz Bölgesi'nin Toros Dağları'nın kuzeyini kapsayan lokalitelerde *An. maculipennis s.s.* ve *An. melanoon* türleri tespit edilmiş olmakla birlikte, Akdeniz bölgesi sahil kesiminde sadece *An. sacharovi* türü bulunabilmiştir.

Çizelge 4.2. Tespit edilen türlerin bölgelere göre dağılımı

Bölgeler	İller	<i>An. maculipennis</i> s.s	<i>An. sacharovi</i>	<i>An. melanoon</i>
Akdeniz Bölgesi	Adana, Mersin, Muğla, Burdur, Konya	10 (% 23)	25 (% 58)	8 (% 19)
Ege Bölgesi	Aydın	–	11 (% 100)	–
İç Anadolu Bölgesi	Çankırı	10 (% 91)	1 (% 9)	–
Karadeniz Bölgesi	Samsun	8 (% 73)	2 (% 18)	1 (% 9)
Doğu Anadolu Bölgesi	Iğdır	9 (% 100)	–	–
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Şanlıurfa	–	15 (% 100)	–
Trakya	Edirne, Kırklareli	10 (% 59)	1 (% 6)	6 (% 35)
Toplam		47 (% 40)	55 (% 47)	15 (% 13)



Şekil 4.6. Tespit edilen türlerin Türkiye’de yayılışını gösteren harita

3. Türkiye genelinde de en yüksek oranda (% 47) örneklenmiş olan *An. sacharovi* türünün özellikle de sıcaklığın yıl içerisinde yüksek seyrettiği, Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Akdeniz ve Ege bölgelerinde daha yoğun bulunduğu, Trakya, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde ise yoğunluğun (sırasıyla % 6, % 9 ve % 18)diğer bölgelere kıyasla oldukça düşük olduğu saptanmıştır.

4. *An. maculipennis s.s.* türü ise, *An. sacharovi*'den sonra en geniş dağılıma sahip tür olup (% 40), Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde oldukça baskındır. Akdeniz'in kuzeyinde *An. melanoon* ile simpatrik dağılımı belirlenmiştir.

5. *An. sacharovi*'nin Doğu Anadolu bölgesi hariç tüm bölgelerde var olduğu moleküler analizlerle tespit edilmiştir. Ancak analize alınan ergin bireyler arasında bu türe rastlanmasa da Iğdır'dan toplanan yumurta örnekleri içerisinde *An. sacharovi* yumurtası karakterine sahip yumurtalar bulunmuştur. Bu durum, yumurta morfolojisiyle de ayırt edilebildiği diğer bölgelerde yapılan analizlerde ortaya konan bu türün, az bir yoğunlukta olsa da bölgede bulunduğuna işaret etmektedir. Bu alanda daha detaylı arazi çalışmaları yapılması gerekmektedir.

6. *An. melanoon* türü ise örnekleme lokalitelerine göre ülkemizde en düşük yoğunluğa sahip türdür (% 13). Trakya bölgesinde en yoğun tür *An. maculipennis s.s.* türü olsa da Avrupa kökenli olan *An. melanoon*'un bu bölgede tespit edilen yoğunluğu (% 35) bölgelere göre en üst seviyededir . Ülkemize Trakya'dan girdiği düşünülen Boreal kökenli *An. melanoon*'un buradan Karadeniz ve Akdeniz bölgelerine dağıldığını, güneyde de bulunan son noktasının Burdur (Göhlisar) olması sebebiyle, Toros Dağları'nı aşırp sahil şeridine inemediği kabul edilmektedir. Türün izlediği zoocoğrafik yolun belirlenmesi açısından özellikle Ege bölgesinin kuzey bölümünden de örneklem alanlarının seçilerek araştırmanın genişletilmesi mümkündür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yakın bir tarihte ayrılmaya başlamış olan türler çoğunlukla atasal polimorfik karakterleri taşımaktadır ve bazı türler arasında halen tam olmayan çiftleşme sonrası izolasyon sebebiyle F₁'de erkekler kısır olsa da, bazı dişi bireyler sayesinde gen akışı kısmen devam etmektedir (Krzywinsky ve Besansky, 2003). Bu sibling tür grupları sıkça incelenmekte ve türler arasındaki karmaşık ilişki çözülmeye çalışılmaktadır (Thomas ve Aitken, 1939; Steyskal, 1972; Adamovic, 1979; Proft *et al.*, 1999; Harbach ve Kitching, 1998; Anthony *et al.*, 1999; Bickfort *et al.*, 2006). Günümüzde, PCR tekniğiyle çoğaltılan nükleer rDNA'nın kullanıldığı teşhis metotları, *Anopheles* cinsine bağlı komplekslerde de devam eden sistematik karmaşanın çözümlenmesinde önemli bir güç sağlamaktadır (Colins ve Paskewitz, 1996).

An. maculipennis kompleksinin sistematik sorununun çözümü için 1926 yılında Falleroni ile başlayan yumurta morfolojisi çalışmaları, uzun yıllar boyunca bir "altın" anahtar olarak kullanılmış ve *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin yumurta özelliklerine dayalı tür teşhis anahtarlarında özellikle koriondaki renklenme üzerinde durulmuştur. Korion özelliklerine göre bantlı olanlar/olmayanlar, iki bant arasında renklenme olanlar, yalnızca iki bantlı olanlar, kesilmiş siyah beneklere benzeyen renklenmeleri bulunanlar ve herhangi bir desenlenme olmadan tamamen koyu renkli görülenler şeklinde yumurta karakterlerine yer verilmiştir (Hackett ve Missiroli, 1935; Hackett, 1937; Bates, 1940; Nicolescu *et al.*, 2004). Bu şekilde *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. subalpinus* (syn. *An. melanoon*), *An. typicus* (syn. *An. maculipennis s.s.*), *An. atroparvus*, *An. labranchiae* ve *An. elutus* (syn. *An. sacharovi*) türlerinin yumurta morfolojisine göre tür teşhis anahtarı hazırlanmıştır (Hackett, 1937). Ancak, farklı coğrafik bölgelerde, farklı mevsimlerde yapılan çalışmaların zamanla artışına bağlı olarak yumurta morfolojisinde özellikle de türüçi önemli varyasyonların tespit edilmesi, sadece yumurta morfolojisinin kompleks türlerinin teşhislerinde yeterli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Bates, 1940; Boccolini *et al.*, 2003; Nicolescu *et al.*, 2004). Ayrıca, yumurta morfoloji ile birlikte son yıllarda uygulanmaya başlanan moleküler tekniklerle de bu sonuç desteklenmiş ve yumurta morfolojisine bağlı karakterlerin güvenilir olmadığı açıklık kazanmıştır.

Bu yaklaşımla yapılan bu çalışmada da moleküler olarak değerlendirilmeden önce ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan kan emmiş ergin dişi *An. maculipennis s.l.* bireylerinden bir kısmının laboratuvar ortamında yumurta bırakması sağlanarak, yumurta bırakan her bir bireylerin yumurta morfolojileri ile moleküler verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Böylelikle tür içi ve türler arası yumurta morfolojisindeki varyasyonlar ortaya konmuş ve nicel bir değer olmayan yumurta renk ve desenlenmesinin hem tür içi varyasyonlara hem de türler arası benzerliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda son yıllarda yapılan birçok araştırmada (Linton *et al.*, 2001; Linton *et al.*, 2002a; Sedaghat *et al.*, 2003; Nicolescu *et al.*, 2004; Sedaghat ve Harbach, 2005; Linton *et al.*, 2007) olduğu gibi bu tez çalışmasında da, *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin teşhisinde en yararlı verinin DNA'ya bağlı moleküler veriler olduğu belirlenmiştir.

Bu kapsamda incelenen örneklerde tipik *An. maculipennis s.s.* yumurtası olarak tanımlanan yüzgeçlerin bitim bölgesinde net iki koyu renk banda sahip yumurtalar, 2 bant arasında başka lekelenmeler olan *An. maculipennis s.s.* türüne göre daha koyu renkli yumurtalar ve *An. sacharovi*'ye ait yüzgeç bulundurmeyen açık renkli yumurtalar tespit edilmiştir. Ancak yakın populasyonlarda bile bu bantların açıklık/koyuluğunun değişken olduğu tespit edilmiş, hatta bazı bireylerde çok silik bantlar gözlenmiştir (bkz. Şekil 4.1).

Elde edilen bu bulgular, yumurta morfolojisi karakterlerinin ülkemizde *An. maculipennis* kompleksi türlerinden hangilerinin bulunduğu dair bir ön değerlendirme konusunda kısmen yardımcı olabileceği göstermekle birlikte, mevcut varyasyonların da tür teşhislerinde yanıltıcı olabileceğini ortaya koymuştur. Böylece, özellikle de tür teşhislerinin kesin karar aşamasında yumurta morfolojisinin yanı sıra farklı analizlerin de kullanılmasının gerekliliği gösterilmiştir.

Özellikle de Anadolu'nun kısa mesafelerde oldukça farklı habitat tiplerini barındırması ve buna bağlı olarak ekolojik faktörlerin organizmalar üzerine farklı etkileri dikkate alındığında, yumurta renklenmesi ve desenlenmesine bağlı taksonomik karakterlerin ülkemizde *An. maculipennis* kompleksi türlerinin tür teşhisinde tek başına kullanımının yeterli olmayacağı açıktır.

Bu nedenle, yapılan bu çalışmada *Anopheles maculipennis* kompleksinin sistematik sorunlarının çözümü için son yıllarda birçok ülkede uygulanmış olan moleküler teknikler kullanılmıştır. Böylece elde edilen sonuçlarla komplekse ait üç türün ülkemizdeki varlığı belirlenmiştir. Bu türler, önemli bir sıtma vektörü olan *An. sacharovi*, WHO verilerine göre potansiyel sıtma vektörü olarak kabul edilen *An. maculipennis s.s.* ve daha önceden yumurta morfolojisindeki varyasyonlar nedeniyle ülkemizdeki varlığı doğrulanamamış olan *An. melanoon*'dur. Araştırmamızla belirlenen *An. maculipennis* kompleksi türlerinin kısmen de olsa ülkemizdeki yayılış alanları da saptanmış ve böylelikle tespit edilen türlerin biyolojik-ekolojik özelliklerine yönelik araştırmalar için de bir temel oluşturulmuştur. Araştırmamızında, ülkemizde mevcut olan *An. maculipennis* kompleksi türlerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan ITS2 bölgesi moleküler analizleri, *Anopheles* cinsi içerisinde yer alan diğer bir çok tür komplekslerinde son yıllarda sıklıkla uygulanmıştır (Beebe *et al.*, 1999; Marrelli *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Le Goff *et al.*, 2006; Banerjee *et al.*, 2007). Böylece, *Anopheles* cinsi tür komplekslerinde uygulanan analizlerle belirlenen tür içi ve türler arası varyasyon sınırları değerlendirilerek, uzun yıllardır çözülemeyen taksonomik pek çok sorunun çözümü sağlanmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen önemli verilerden biri DNA'nın ikincil yapısı üzerinde önemli etkisi olan ürünün guanin-sitozin (GC) içeriğidir (Bebe ve Cooper, 2000; Banerjee *et al.*, 2007). Bu alanda ilk çalışmalardan biri *An. punctulatus* kompleksinde Beebe *et al.* (1999) tarafından yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre GC yüzdesi *An.s punctulatus* kompleksi içerisinde % 61-71 arasında değişmektedir. Bu oran *An. gambiae* kompleksinde % 55 iken, *An. maculipennis* kompleksinde % 45 ile 60 arasında bulunmaktadır. (Beebe ve Cooper, 2000; Proft *et al.*, 1999; Kampen, 2005; Linton *et al.*, 2007). Proft *et al.* (1999)'nin yapmış oldukları araştırmada, *An. maculipennis* kompleksinde bulunan 6 türün (*An. atroparvus*, *An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon*, *An. sacharovi*, *An. messeae*, *An. labranchiae*) GC içeriği %50–60 arasında olduğu tespit edilmişken; Marinucci *et al.* (1999) tarafından yapılan bir diğer çalışmada Palearktikten 7 tür incelenmiş (*An. atroparvus*, *An. maculipennis s.s.*, *An. martinius*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. labranchiae*, *An. sacharovi*) ve en yüksek GC içeriği %54,1 ile *An. atroparvus*'ta, en düşük değer ise % 49,4 ile *An. sacharovi*'de tespit edilmiştir.

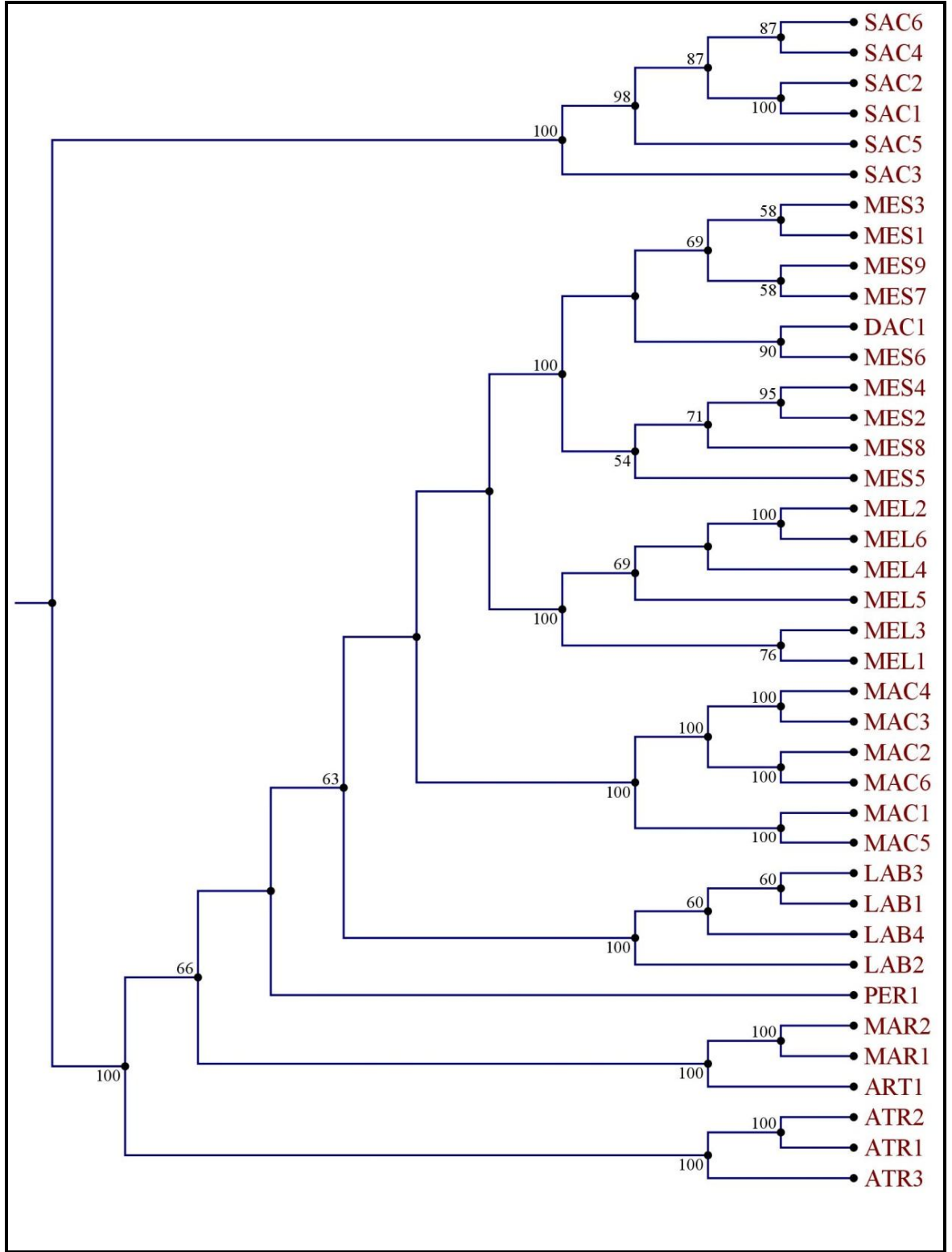
Kampen (2005), o zamana kadar değerlendirilmemiş olan *An. beklemishevi*'de bu oranın % 46,6 olduğunu; Djadid *et al.* (2007) İran'dan toplanan 6 tür (*An. atroparvus*, *An. maculipennis s.s.*, *An. messeae*, *An. labbranchiae*, *An. persiensis* ve *An. sacharovi*) arasında GC içeriğinin %49,33 ile % 54,76 ile değiştiği sonucuna işaret etmiştir. Linton *et al.* (2007), Yunanistan örnekleriyle yaptığı araştırmasında GC oranının *An. maculipennis s.s.* türünde % 50,8, *An. melanoon*'da %51,1, *An. sacharovi*'de % 48 olduğunu belirlemişlerken, Djadid *et al.* (2007)'nin İran'dan toplanan örneklerle yaptıkları çalışmada, GC oranının *An. maculipennis s.s.* türünde %53,35, *An. sacharovi*'de % 49,33 olduğunu bulmuştur. İran'da yapılan bir diğer çalışmada Ghavami *et al.* (2008), *An. maculipennis s.s.* için bu oranı % 50,3 olarak vermiştir. Bu tez çalışması kapsamında yapılan değerlendirmede ise PCR ile çoğaltılan bölgede (422 bç) GC oranı *An. maculipennis s.s.* türünde % 50,47, *An. melanoon*'da (432 bç) % 49,77 ve *An. sacharovi*'de (444 bç) % 47,3 olarak bulunmuştur.

Pek çok ülkede yapılan araştırmalarda *Anopheles* tür komplekslerinin moleküler analizlerinde kullanılan bir diğer önemli veri, türler arasındaki genetik uzaklık olmuştur ve bu değer çalışılan DNA bölgesi için türe özgü bir sınır oluşturarak çeşitli tür gruplarında yer alan türlerin ayrımı için yararlı olmuştur. Örneğin, *An. annularis* grubunda, türler arasındaki farklılık gruptaki en yakın iki tür arasında % 10,23 iken, en uzak türler arasında bu oran %18,81 olarak saptanmıştır (Walton *et al.*, 2007). *An. maculipennis* kompleksi için Proft *et al.* (1999)'ne göre, bu fark kompleks içerisinde %7,3 ile % 24 arasında değişmektedir. Marunicci *et al.* (1999)'a göre farklılık, en düşük değer olan % 5 (*An. maculipennis s.s.* ile *An. messeae* arasında) ve en yüksek değer olan % 25,2 (*An. atroparvus* ile *An. sacharovi* arasında) arasında değişmektedir. Nicolescu *et al.*, (2004) Romanya'da yaptıkları çalışmada COI bölgesi moleküler analizine dayanarak tanımlanan yeni tür *An. dacia* ile *An. messeae* arasında ITS2 bölgesi genetik uzaklığı bakımından yalnızca %1 fark olduğu tespit edilmişken, *An. melanoon* ile *An. maculipennis s.s.* arasında ise %3,4'lük bir farklılık olduğu saptanmıştır. Linton *et al.* (2007)'nin çalışmasında, ITS2 bölgesi genetik uzaklığı bakımından *An. melanoon* ve *An. maculipennis s.s.* arasında, % 3,8, *An.*

melanoon ve *An. sacharovi* arasında % 14'lük bir fark tespit edilmiş olup, bu çalışmada tespit edilen oranlar ise sırasıyla % 3,6 ve % 15 olmuştur.

Görüldüğü gibi yapılan çalışmalardaki değerlendirmeler hem GC içeriği için hem de türler arasındaki farkları işaret eden moleküler uzaklıklar dikkate alındığında türlerin ilişkisinde birbirini destekler sonuçlar ortaya çıkmaktadır, ancak verilen değerlerde farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu sapmalar farklı primerler kullanılması ve dolayısıyla 3'-5' uçlarda daha fazla/az bazın çoğaltılmasından kaynaklanabilmektedir. Bu sebeple her bir çalışmayı kendi içerisinde değerlendirmeli ve sonraki detaylı bir incelemede asıl değerlendirmenin çoğaltılan bu kısım içerisinde yer alan ITS2 bölgesinde yapılması gerekmektedir. Bu amaçla diğer çalışmalarda toplanan örnekler ile ülkemizden toplanan örneklerin ITS2 dizi analizlerini aynı standartta inceleyebilmek için *An. artemievi*, *An. atroparvus*, *An. daciae*, *An. maculipennis s.s.*, *An. martinius*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. labbranchiae*, *An. persiensis*, *An. sacharovi* türlerinin farklı araştırmacılar tarafından GenBank'a eklenmiş dizileri eşleştirilmiş ve ülkemizde tespit ettiğimiz üç tür de bu eşleştirmeye katılarak UPGMA tekniğiyle oluşturulan bir dendogram Şekil 5.1.'de verilmiştir. Şekilde kullanılan dizilere ait kodlar, yayınlar ve Gen Bank numaraları da Çizelge 5.1.'de açıklanmıştır.

Oluşturulan dendogramda *An. daciae* haricindeki tüm türler bir klad oluşturmuştur. Ancak *An. daciae*, *An. messeae* türü ile aynı kladda yer almaktadır. Zaten bu iki türün ayrımında ITS2 bölgesi moleküler analizlerinin sorunu çözmekte yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Bezzhonova ve Goryacheva, 2008). Ayrıca yapılan bu analizde ülkemizde tespit edilen *An. maculipennis s.s.* ve *An. melanoon* türleri Romanya örnekleriyle, *An. sacharovi* ise Yunanistan örneği ile yakın görünmektedir. *An. martinius* ile *An. artemievi*'nin yakın ilişkisi ve *An. sacharovi*'nin diğer türlerden uzaklığı da dikkat çekmektedir.



Şekil 5.1. *Anopheles maculipennis* kompleksine ait GenBankasında yer alan bazı dizilerle tez kapsamında elde edilen türlere ait dizilerden oluşturulan dendrogram.

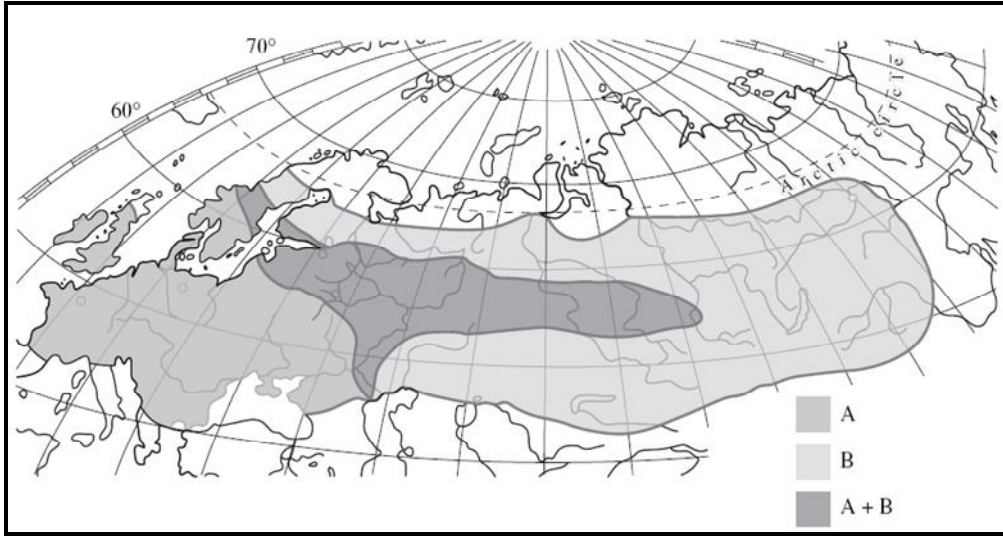
Çizelge 5.1. GenBankasından alınan dizilerin ait olduğu lokalite ve yayınların listesi

Kod	GenBank No.	Lokalite	Yayın
LAB1	Z50102	İtalya	Marinucci <i>et al.</i> , 1999
MES1	Z50105	İtalya	Marinucci <i>et al.</i> , 1999
SAC1	Z83198	Türkiye	Marinucci <i>et al.</i> , 1999
MAR1	AJ224329	Özbekistan	Marinucci <i>et al.</i> , 1999
MEL1	AJ224330	İtalya	Marinucci <i>et al.</i> , 1999
ATR1	AY365007	? ¹	Proft <i>et al.</i> , 1999
MAC1	AF455818	Yunanistan	Linton <i>et al.</i> , 2003
SAC2	AF485806	Yunanistan	Linton <i>et al.</i> , 2003
ATR2	AY634523	Romanya	Nicolescu <i>et al.</i> , 2004
MAC2	AY634551	Romanya	Nicolescu <i>et al.</i> , 2004
MEL2	AY634504	Romanya	Nicolescu <i>et al.</i> , 2004
MES2	AY648982	Romanya	Nicolescu <i>et al.</i> , 2004
DAC1	AY634470	Romanya	Nicolescu <i>et al.</i> , 2004
MES3	AM409797	Rusya (Moskova)	Bezzhonova ve Goryacheva, 2008
MES4	AM409775	Rusya (Tomsk)	Bezzhonova ve Goryacheva, 2008
MAC3	AY730264	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
SAC3	AY533852	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
PER1	AY730269	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
ATR3	AY050640	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
MES5	AY050639	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
LAB2	AY842516	İran	Djadid <i>et al.</i> , 2007
MAC5	AF455821	Yunanistan	Linton <i>et al.</i> , 2007
MEL4	AF452389	Yunanistan	Linton <i>et al.</i> , 2007
LAB3	AY232827	İtalya	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MAC4	AY238424	İtalya	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MEL3	AY238409	İtalya	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MES6	AY238412	İngiltere	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MES7	AY238415	İtalya	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MES8	AY238422	Kazakistan	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MES9	AY238418	İtalya	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
SAC4	AY238397	Yunanistan	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
MAR2	AY238406	Özbekistan	Di Luca <i>et al.</i> , 2004
SAC5	AY365012	? ¹	Proft <i>et al.</i> , 1999
MEL5	AY365009	? ¹	Proft <i>et al.</i> , 1999
LAB4	AY365008	İtalya	Proft <i>et al.</i> , 1999
ART1	AJ849886	Kırgızistan	Gordeev <i>et al.</i> , 2004
SAC6 ²		Türkiye	
MEL6 ²		Türkiye	
MAC6 ²		Türkiye	

¹ Araştırmacılar *An. sacharovi* türü için Türkiye ve Yunanistan, *An. melanoon* türü için İtalya ve Yunanistan, *An. atroparvus* türü için de Portekiz, Yunanistan, Avusturya, İspanya örneklerinden yararlandıklarını belirtmişlerdir. Kullanılan dizinin hangi lokaliteye ait olduğu belirtilmemiştir.

² Tez çalışması sırasında kullanılan örneklerdir.

Araştırmamız kapsamında analiz edilen ITS2 gen bölgesizileri de karşılaştırılmış ve çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu ve baz kompozisyonu bakımından kendi içerisinde üç tür için de %100 uyumlu bulunmuştur. Linton *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmada, Yunanistan örneklerinin (*An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon*, *An. sacharovi*, *An. messeae*); Linton *et al.* (2002)'nin yaptığı çalışmada da İngiltere örneklerinin (*An. messeae* ve *An. atroparvus*) aynı şekilde bu bölge için varyasyonel olmadığı belirtilmiştir. Sedaghat *et al.*, (2003)'tarafından analiz edilen İran *An. sacharovi* örnekleri ile daha önceden Djadid tarafından analiz edilen *An. sacharovi* örnekleri karşılaştırılmış, ITS2 bölgesi dizileri açısından % 99,4'lük benzerlik göstermiştir. Marinucci *et al.*, (1999), 7 türü değerlendirdikleri çalışmalarında tür içi varyasyonun en az olduğunu tespit ettikleri *An. maculipennis s.s.* ve *An. labranchiae*'da bu farkın ancak % 0.35'e kadar çıkabildiğini, *An. messeae*'de ise %1.36'yı bulabildiğini göstermişlerdir. Birçok ülkede elde edilerek değerlendirilen bu oranlarla ITS2 bölgesinin *An. maculipennis* kompleksi gibi tür gruplarında sistematik problemlerin çözümünde önemli bir araç olabileceği ortaya konulmuştur. Diğer taraftan, *An. messeae* gibi özellikle geniş bir coğrafik dağılıma sahip türlerde söz konusu gen bölgesinin kullanılmasında dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koyan veriler de elde edilmiştir. Örneğin, Nicolescu *et al.* (2004) tarafından *An. messeae* örnekleri içerisinde COI ve ITS2 bölgesi moleküler analizleri ile morfolojik çalışmaların bir arada yapıldığı araştırmada, yeni bir tür olarak tanımlanan *An. daciae* ile *An. messeae* türü arasında ITS2 dizi analizi bakımından sadece %1 fark olduğu bulunmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda *An. messeae* türünde ITS2 bölgesi dizi analizi bakımından varyasyonunun yüksek olduğu ve özellikle de türün yayılış alanının uç bölgelerinden alınarak analiz edilen örnekler arasında bu farkın artabileceği bildirilmiştir (Gordeev *et al.*, 2004). Nitekim Novikov ve Shevchenko (2001) yaptıkları kromozomal analizlerle tür içerisinde A ve B olarak adlandırılan iki form tespit etmişlerdir. Bu formların inversiyona bağlı bir genetik değişikliğe olduğu vurgulanmış ve dünya üzerindeki dağılımlarını gösteren bir haritayla tür içerisindeki ilişki gösterilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Sitogenetik yapısına göre açıklanan *An. messeae* formlarının dağılışı haritası (Novikov ve Shevchenko, 2001)

Gordeev *et al.* (2004) doğu ve batı populasyonları arasında fark bulunmadığını ancak özellikle kuzeyde tayga zonlarında bulunan kuzey populasyonlarıyla güneydeki populasyonların dizi analizinin incelenmesi gerektiğini vurgulamıştır. Di Luca *et al.* (2004)'nin *Anopheles maculipennis* kompleksine ait 6 türün (*An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon*, *An. martinius*, *An. messeae*, *An. labranchiae* ve *An. sacharovi*) ITS2 bölgesi dizi analizi ile populasyonlar arasındaki farklılıkların araştırıldığı çalışmalarında *An. maculipennis s.s.*, *An. martinius*, *An. labranchiae* ve *An. sacharovi* türlerinde tür içi farklılık olmadığını ancak *An. melanoon*'da % 0,12 farklılıkla "İtalyan" ve "Balkan" haplotipleri olarak adlandırdıkları iki grup olduğunu belirtmişlerdir. *An. messeae*'de ise ikisi İtalya'dan (biri kuzey, biri merkez), biri Kazakistan ve Hollanda'dan, biri Yugoslavya'dan ve bir diğeri de İngiltere'den olmak üzere 5 farklı haplotip olduğu bulunmuştur. *An. messeae* örneklerinde COI analizlerini de yapan araştırmacılar bu bölgeye bağlı 12 haplotipi de tanımlamıştır. Tanımlanan 5 ITS2 haplotipine ait örneklerin GenBankası'ndaki ITS2 dizi sonuçlarıyla karşılaştırılması sonucu % 100 ile % 90,07 arasında değişen moleküler uzaklık değerleri olduğu ortaya konmuş, ITS2 gen bölgesinin COI'ye göre daha kullanışlı bir genetik belirteç olduğu vurgulanmıştır. Ancak *An. maculipennis* kompleksi içerisinde en geniş coğrafik dağılıma sahip tür olan *An. messeae*'nin *An. dacia* türü ile ayrımında görüleceği gibi ITS2 dizi analizinin belirteç olarak kullanılması şüpheye yol açmıştır (Bezzhonova ve Goryacheva, 2008).

Ülkemizde yapılan bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar en batısından en doğusuna, en kuzeyinden en güneyine toplanan örneklerin ITS2 analizlerinde kendi içerisinde herhangi bir fark ya da haplotip bulundurmadığını ortaya koymuş ve ITS2 bölgesinin ülkemiz *Anopheles maculipennis* kompleksi türlerinin tür ayırımında iyi bir moleküler belirteç olabileceğini kanısına ulaşılmıştır. Linton *et al.*, (2007) tarafından Yunanistan'da yapılan çalışma da elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. Öyle ki, Yunanistan'ın Trakya sınırimızda yer alan Evros şehrinde bizim Trakya'da tespit ettiğimiz tür yoğunluğuna benzer şekilde sırasıyla *An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi* türleri tespit edilmişken, sahil şeridinde *An. sacharovi* baskın tür olmuştur. Yunanistan'da bu üç türün yanı sıra ülkenin kuzey batısında yalnızca iki örnek de olsa *An. messeae* türü bulunmuştur.

İran'da ise Sedaghat *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmada da ülkemiz sınırına yakın lokalitelerden toplanan örneklerin moleküler analizi yapılmış ve bu örneklerin *An. maculipennis s.s.* ile *An. sacharovi* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda ise Iğdır Bölgesinden elde edilen örneklerin analiziyle sadece *An. maculipennis s.s.* türünün bu bölgedeki varlığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmanın amacı, komplekse ait türlerin Türkiye'deki son taksonomik durumunu ve moleküler karakterlerini belirlemeye yönelik olduğu için tez süresince kısıtlı tutulan zaman ve imkanlar bu durumu en iyi açıklayabilecek şekilde mümkün olan en yüksek arazi ve örnek sayısına ulaşılmaya çalışılacak şekilde değerlendirilmiştir. Yine de ülkemizin geniş ve kısa mesafelerde çok farklı bir coğrafyaya sahip olduğu gerçeği göz önüne alınarak, sonraki çalışmalarda zoocoğrafik örüntünün tam olarak netliğe kavuşturulabilmesi için arazi bölgesinin genişletilmesi ve düşük popülasyon değerleri dikkate alınarak, mümkün olan tüm tekniklerle çok sayıda örnek toplanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bir diğer önemli husus, türleşmede en önemli faktörler arasında yer alan çiftleşme mekanizmalarındaki izolasyonlardır. Özellikle morfolojik olarak bu kadar birbirine benzer karakterler taşıyan sibling türlerde bu daha da önem kazanmaktadır. Bu nedenle türler arasındaki farklılıkların net olarak ortaya konulması için moleküler analizlerin gerekliliğinin yanı sıra, türlerin bütün lokal popülasyonlarını kapsayacak

şekilde ekolojik verilerin elde edilmesi ve davranışsal karakterlerin de hassasiyetle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Geçmişte yapılan çalışmalarda moleküler tekniklerle teşhis yapılmaması sebebiyle türlerin karıştırılmış olabileceği göz önüne alındığında, bu tez çalışmasından elde edilen veriler ile türlerin coğrafik dağılımının nispeten ortaya konmuş olması bundan sonraki çalışmalarda önemli bir yol gösterici olacaktır. Ayrıca, *An. maculipennis* kompleksi türlerinin farklı vektörel karakterlere sahip olması nedeniyle, doğru tür teşhisi ve türlerin coğrafik dağılımının belirlenmesi özellikle de ülkemiz gibi sıtmanın önemli bir sağlık sorunu olduğu bölgelerde sıtma hastalığına karşı entegre sıtma mücadele programları açısından oldukça önemli olduğunu da belirtmek gerekir.

Ayrıca, özellikle iklimsel değişiklikler, küresel ısınma gibi etkilerin, vektör türlerde ve bazı türlerin popülasyonlarında artışa neden olacağı da genel kabul görmektedir (Snow, 2000). Bu kapsamda, ülkemiz ve yakın bölgelerde görülen otokutanöz (yerli) sıtma vakaları haritası Şekil 5.3’de verilmiş olup yapılan çalışma ile elde edilen veriler bu açıdan da ayrı bir önem kazanmaktadır.



Şekil 5.3. Türkiye ve Güney-Kafkasya’da 2003’e kadar rapor edilen otokutanöz sıtma vakaları dağılışı (WHO, 2005)

Bu nedenle araştırmamızda tespit edilen türlerin vektörel kapasitelerine yönelik yapılan değerlendirmelere de değinmek gerekmektedir.

Jetten ve Takken (1994), *An. atroparvus*, *An. sacharovi* ve *An. labbranchiae*'nin Palearktikte en önemli vektörler olduğunu, Avrupa'da en etkin vektörün ise *An. messeae* olduğunu belirtirken, Nikolaeva (1996), bu türün Ukrayna ve Rusya'da da vektörel önemini vurgulamıştır. Proft *et al.* (1999)'da Jetten ve Takken (1994)'e göre hazırladığı tabloda bazı türlerin vektörel özellikleri Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

Çizelgeye göre *An. melanoon*'un vektörel özellik taşımadığı gösterilse de WHO (2008) tarafından özellikle Gürcistan'da vektörel karakter gösterebildiği söylenmektedir.

Türkiye'de varlığı ortaya konmuş olan türler birincil ve ikincil vektör olarak tanımlanan türler arasındadır.

Elde edilen verilere göre ülkemizde sıtmanın en yaygın olduğu Güney Doğu Anadolu bölgesinde yalnızca *An. sacharovi*'nin bulunması, bu türün en etkin vektör olduğuna bir kez daha dikkatleri çekmektedir. Alten *et al.* (2000) Çanakkale Biga Ovası'nda *An. maculipennis s.s* ve *An. melanoon*'un (*An. subalpinus* olarak verilmiştir) potansiyel vektör olabileceğini belirtmişlerdir. Bu durumun ancak populasyon yoğunluğunun çok yüksek olduğu zamanlarda olabileceği kabul edilmektedir (Linton *et al.*, 2007).

Özellikle Akdeniz, Ege ve Karadeniz bölgelerine, Güney Doğu Anadolu'dan yoğun mevsimsel işçi göçü verildiği göz önünde bulundurulursa, *An. sacharovi*'nin yoğun olduğu Akdeniz ve Ege bölgelerinin de sıtma açısından önemli noktalar olduğu ve kontrol altında tutulması gerektiği görülmektedir.

Üç türü de barındıran Trakya, Linton *et al.* (2007) tarafından Yunanistan'da bir vektör kontrol programının geliştirilmesi gerekliliğini vurguladığı gibi Bulgaristan'daki ekonomik zorluklar ve Türkiye'de hali hazırda varlığını koruyan sıtma vakaları göz önüne alındığında riskli bir bölge olmaktadır.

Çizelge 5.2. *An. maculipennis* kompleksine ait bazı türlerin vektörel karakterleri (Proft *et al.* 1999)

Tür	Vektörel kapasite
<i>An. atroparvus</i>	++
<i>An. sacharovi</i>	+++
<i>An. maculipennis</i>	+
<i>An. messeae</i>	+
<i>An. labbranchiae</i>	+++
<i>An. beklemishevi</i>	-
<i>An. melanoon</i>	-

An. maculipennis s.s. türünün de yoğun populasyonlar halinde bulunduğu zaman vektörel özellik gösterebileceği değerlendirildiğinde Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgeleri de önem kazanmaktadır. Karadeniz bölgesinde, özellikle arazi çalışmasının yapıldığı Samsun'da geçmişte yoğun bir mücadele yapılarak sıtmanın önüne geçilmiştir. Ancak potansiyel tehlike unutulmamalı ve bu bölgelerde de vakaların düzenli olarak kontrol edilmesi gerekmektedir.

Sonuçta, ülkemizde ilk kez moleküler teknikler kullanılarak incelenen *An. maculipennis* kompleksine ait üç türün (*An. sacharovi*, *An. maculipennis* ve *An. melanoon*) varlığı kesin olarak ortaya konmuş, rDNA ITS2 bölgesi karakterleri açıklığa kavuşturularak ülkemizdeki dağılışı ve yoğunlukları belirlenmiştir. Gelecek çalışmalara ışık tutacağını umduğumuz bu sonuçlar, dünya çapında araştırılan vektörel ve sistematik öneme sahip bu kompleksin Avrupa ile Asya arasında önemli bir geçiş noktası olan Türkiye'deki boşluğunu tamamlayarak, çözüme bütünsel bir bakış sağlayabilmesi açısından yararlı olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adamovic, Z.R. 1979. Sibling species of the *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) in Macva and Pocerina, Serbia. **Acta Parasitologica Iugoslavica**, 10: 21-26.
- Aldemir, A., & Boşgelmez, A. 2006. Population dynamics of adults and immature stages of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Gölbaşı district, Ankara. **Turkish Journal of Zoology**, 30: 9-17.
- Alten, B., Çağlar, S.S. and Özel, O. 2000. Malaria and its vectors in Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 7: 27–33.
- Alten, B., Kampen, H. and Fontenille, D. 2007. Malaria in southern Europe: resurgence from the past? In: Emergin pests and Vector-Borne Diseases in Europe. Takken, W. and Knols, B.G.J. (eds), Wageningen Academic Publishers, vol. 1, pp. 35-58, Wageningen, The Netherlands.
- Anthony, T.G., Harbach, R.E. and Kitching, I.J. 1999. Phylogeny of the *Pyretophorus* series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology**, 24: 193-205.
- Banerjee, A.K., Arora, N. and Murty, U.S. 2007. Stability of ITS2 secondary structure in *Anopheles*: what lies beneath? **International Biology of Integrative Biology**, 1 (3): 232-238.
- Bates, B.M. 1938. Hybridization experiments with *Anopheles maculipennis*. **The American Journal of Hygiene**, 29 (1): 1-6.
- Bates, B.M. 1939. Variation in the antepalpmate hairs of larvae of the *Anopheles maculipennis* complex. **Rivista di Malariologia**, 5: 299-312.
- Bates, B.M. 1940. The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. **Annals Entomological Society of America**, 33: 343-356.
- Bates, M. and Hackett, L.W. 1939. The distinguishing characteristics of the populations of *Anopheles maculipennis* found in southern Europe. Verh. VII. Int. Kongr. Entom., (1938, vol. 3), pp. 1555-1569, Berlin.
- Bates, M. 1939. Variation in the antepalpmate hairs of larvae of the *Anopheles maculipennis* complex. **Rivista di Malariologia**, 18: 299-312.

- Beebe, N.W., Ellis J.T., Cooper, R.D. and Saul, A. 1999. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. **Insect Molecular Biology**, 8 (3): 381-390.
- Beebe, N.W., & Cooper, R.D. 2000. Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group. **International Journal for Parasitology**, 30: 1-17.
- Beebe, T.J.C., & Rowe, G. 2004. An Introduction to Molecular Ecology, Oxford University Press, 370 pp, New York.
- Behura, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, 15: 3087-3113.
- Bezzhonova, O.V., & Goryacheva, I.I. 2008. Intragenomic heterogeneity of rDNA Internal Transcribed Spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, 45 (3): 337-341.
- Bickfort, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. and Das, I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22 (3): 149-154.
- Boccolini, D., Sabatini, A. and Coluzzi, M. 1986. Valore diagnostico del numero dei rami delle setole antepalmate per l'identificazione delle specie italiane del complesso *Anopheles maculipennis*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, 22: 201-204.
- Boccolini, D., Di Luca, M., Marinucci, M. and Romi, R. 2003. Further molecular and morphological support for the formal synonymy of *Anopheles subalpinus* Hackett and Lewis with *An. melanoon* Hackett. **European Mosquito Bulletin**, 16:1-5.
- Cambournac, F.J.C., & Hill, R. B. 1938. The Biology of *Anopheles maculipennis*, Var. *atroparvus* in Portugal. **Tropical Medicine and Malaria**, 2: 178-184.
- Chen B., Harbach R.E. and Butlin R.K. 2002. Molecular and morphological studies on the *Anopheles minimus* group of mosquitoes in southern China: taxonomic review, distribution and malaria vector status. **Medical and Veterinary Entomology**, 16: 253-265.
- Chen, B., Butlin, R.K., Pedro, P.M., Wang, X.Z. and Harbach, R.E. 2006. Molecular variation, systematics and distribution of the *Anopheles fluviatilis* complex in southern Asia. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 33-43.

- 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.
- Corradetti, A. 1934. Ricerche sugli incroci tra le varietà di *Anopheles maculipennis*. **Rivista di Malariologia**, 13: 707-720.
- De Buck, A., Schoute, E. and Swellengrebel, N.H. 1930. Racial differentiation of (*Anopheles maculipennis*) in Netherlands and its relation to malaria. **Rivista di Malariologia**, 9: 97-110.
- De Buck, A. Schoute, E. and Swellengrebel, N. H. 1934. Cross-breeding experiments with Dutch and foreign races of *Anopheles maculipennis*. **Rivista di Malariologia**, 13: 237- 263.
- Denisova, Z.M. 1967. Variations of the male hypopygium in subspecies of *Anopheles maculipennis* Mg. (Diptera, Culicidae). **Entomological Review**, 43 (4): 416-420.
- Di Luca, M., Boccolini, D., Marinucci, M. and Romi, R. 2004. Intrapopulation polymorphism in *Anopheles messeae* (*An. maculipennis* complex) inferred by molecular analysis. **Journal of Medical Entomology**, 41 (4): 582-586.
- Diemer, J. 1935. La methode de Heincke de combinaison des caracteres pour la determination raciale d'un exemplaire isole *Anopheles maculipennis*. **Bulletin de la Societe de Pathologic Exotique**, 28: 932-936.
- Djadid, N.D., Gholizadeh, S., Tafisiri, E., Romi, R., Gordeev, M. and Zakeri, S. 2007. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. **Malaria Journal**, 6 (6): 1-10.
- Doosti, S., Azari-Hamidian, S., Vatandoost, H., Oshagi, M.A. and Hosseini, M. 2006. Taxonomic differentiation of *Anopheles sacharovi* and *An. maculipennis* s.l. (Diptera: Culicidae) larvae by seta 2 (Antepalpmate hair). **Acta Medica Iranica**, 44 (1): 21-27.
- Falleroni, D. 1926. Fauna anofelica italiana e suo "habitat" (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. **Rivista di Malariologia**, 5: 553–559.
- Foley, D.H., Wilkerson, R.C., Cooper, D., Volovsek, E. and Bryan, J.H. 2007. A molecular phylogeny of *Anopheles annulipes* (Diptera: Culicidae) sensu lato: The most species-rich anopheline complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 43: 283–297.
- Frizzi, G. 1952. Symposia Genetica, 3: 231-265.

- Frizzi, G. 1953. Extension of the salivary chromosome method to *Anopheles claviger*, *quadrifasciatus* and *aquasalts*. **Nature** (Lond.), 171: 1072.
- Gordeev, M., Goriacheva, I., Shaikevich, E. and Ejov, M. 2004. Variability of the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA among five Palaearctic species of Anopheline mosquitoes. **European Mosquito Bulletin**, 17: 14–19.
- Gordeev, M., Zvantov, A.B., Goriacheva, I.I., Shaikevich, E.V. and Ezhov, M.N. 2005. Description of the new species *Anopheles artemievi* sp.n. (Culicidae). **Medical Parazitology**, 74: 4-5.
- Ghavami, M.B., Dinparast-Djadid, N. and Haniloo, A. 2008. Molecular characteristics of *Anopheles maculipennis* Meigen in Zanjar, Northwest of Iran, inferred from ITS2 sequence analysis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 11 (4): 539-545.
- Hackett, L.W. 1934. The present status of our knowledge of the sub-species of *Anopheles maculipennis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 28 (2): 109-128.
- Hackett, L.W. 1937. Recent additions to our knowledge of "*Anopheles maculipennis*" races. **Bulletin of the Health Organisation of the League Nations**, 6 (1): 1-16.
- Hackett, L.W., & Lewis, D.J. 1935. A new variety of *Anopheles maculipennis* in southern Europe. **Rivista di Malariologia**, 14: 1-10.
- Hackett, L.W., & Missiroli, A. 1935. The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. **Rivista di Malariologia**, 14: 1-67.
- Harbach, R.E., & Kitching, I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, 23: 327-370.
- Harbach, R.E. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, 94: 537-553.
- Hwang, U-W., & Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. **The Korean Journal of Parasitology**, 37: 215-228.
- Jetten, T.H., & Takken, W. 1994. Anophelism without malaria in Europe. A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Wageningen

Agricultural University, Wageningen University Papers, pp. 94–95, The Netherlands.

- Kampen, H. 2005. Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palearctic *Anopheles maculipennis* sibling species. **Parasitological Research**, 97: 113-117.
- Kasap, H., & Kasap, M. 1983. Türkiye Anophelinae (Diptera: Culicidae) türleri. **Türkiye Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi**, 40 (1): 39-52.
- Kettle, D.S., & Sellick, G. 1947. The duration of the egg stage in the races of *Anopheles maculipennis* Meigen (Diptera, Culicidae). **The Journal of Animal Ecology**, 16: 38-43.
- Krzywinski, J., & Besansky, N.J. 2003. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. **Annual Review of Entomology**, 48: 111-139.
- Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S.E. and Sachs, J. 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70 (5): 486–498.
- Kumar A., & Rai, K.S. 1993. Molecular organization and evolution of mosquito genomes. **Compared. Biochemical Physiology**, B106: 495-504.
- Le Goff G., Leong Pock Tsy, J.M. and Robert, V. 2006. Molecular characterization of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Madagascar. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 259–260.
- Linton, Y-M., Samanidou-Voyadjoglou, A, Smith, L. and Harbach, R.E. 2001. New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece based on DNA sequence data. **European Mosquito Bulletin**, 11: 31-36.
- Linton, Y-M., Smith, L. and Harbach, R.E. 2002a. Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *An. melanoon* Hackett. **European Mosquito Bulletin**, 13: 1-7.
- Linton, Y-M., Samanidou-Voyadjoglou, A. and Harbach, R.E. 2002b. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. **Insect Molecular Biology**, 11 (4): 379-383.
- Linton, Y-M., Smith, L., Koliopoulos, G., Samanidou-Voyadjoglou, A., Zounos, A. K. and Harbach, R.E. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) maculipennis* Meigen, type species of the genus and

- nominotypical member of the *Maculipennis* Complex. **Systematic Entomology**, 28: 39-55.
- Linton, Y-M., Dusfour, I., Howard, T.M., Ruiz, L.F., Duc Manh, N., Ho Dinh, T., Sochant, T., Coosemans, M. and Harbach, R.E. 2005. *Anopheles (Cellia) epiroticus*, a new malaria vector species in the Southeast Asian *Sundaicus* Complex. **Bulletin of Entomological Research**, 95: 329–339.
- Linton, Y-M., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A. K., Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E. and Harbach, R.E. 2007. The *Anopheles (Anopheles) maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. **Journal of Natural History**, 41 (41–44): 2683–2699
- Marelli, M.T., Floeter-Winter, L.M., Malafronte, R.S., Tadei, W.P., Lourenço-De-Oliveira, R., Flores-Mendoza, C. and Marinotti, O. 2005. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. **Medical and Veterinary Entomology**, 19: 208-218.
- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Di Luca, M. and Severini, C. 1999. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *Maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis. **Insect Molecular Biology**, 8 (4): 469-480.
- May, J.M. 1951. Map of world distribution of malaria vectors. **Geographical Review**, 41 (4): 638–639.
- Merdivenci, A. 1984. Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyo-morfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılışı ve sağlık önemleri). İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 340 s, İstanbul.
- Munsterman, L.E., & Conn, J.E. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): Impact of molecular biology and cladistic analysis. **Annual Review of Entomology**, 42: 351-369.
- Naddaf, S.R., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H. and Assmar, M. 2003. Molecular characterization of the *Anopheles fluviatilis* species complex in the Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, 9: 31–39.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information (genom kaynakları), U. S. National Library of Medicine, 8600 Rokville Pike, Bethesda [http://www.ncbi.nlm.nih.gov] Erişim Tarihi: 01.03.2009.
- Nicolescu, G., Linton, Y-M., Vladimirescu, A., Howard, T.M. and Harbach, R.E. 2004. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae) in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on

- molecular and morphological evidence. **Bulletin of Entomological Research**, 94: 525-535.
- Nikolaeva, N. 1996. Resurgence of malaria in the former Soviet Union (FSU). **Society of Vector Ecology Newsletter**, 27: 10-11.
- Novikov, Y.M., & Shevchenko, A.I. 2001. Inversion polymorphism and the divergence of two cryptic forms of *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) at the level of genomic DNA repeats. **Russian Journal of Genetics**, 37 (7): 915-925.
- Parrish, D.W. 1959 The Mosquitoes of Turkey. **Mosquito News**, 19: 264-266.
- Porter, C.H., & Collins, F.H. 1991. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 45: 271-279.
- Postiglione, M., Smiraglia, B.C., Lavagnino, A., Gökberk, C. and Ramsdale, C. 1970. A preliminary note on the occurrence in Turkey of the *subalpinus* form of the *A. maculipennis* complex. **Rivista Di Parassitologia**, 31: 155-159.
- Postiglione, M., Tabanlı, B. and Ramsdale, C. 1973. The *Anopheles* of Turkey. **Rivista Di Parassitologia**, 34: 128-159.
- Proft, J., Maier, W.A. and Kampen, H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera : Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. **Parasitological Research**, 85: 837-843.
- Rai, K.S. 1999. Genetics of mosquitoes. **Journal of Genetics**, 78 (3): 163-170.
- Ramsdale, C., Snow, K. 2000. Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. **European Mosquito Bulletin**, 7: 1-26.
- Ramsdale, C.D., Alten, B., Çağlar, S.S. and Özer, N. 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 9: 18-28.
- Ree, H., Yong, T. and Hwang, U. 2005. Identification of four species of the *Anopheles hircanus* complex (Diptera: Culicidae) found in Korea using species-specific primers for Polymerase Chain Reaction Assay. **Medical Entomology and Zoology**, 56 (3): 2201-205.

- Romi, R., Boccolini, D., Di Luca, M., La Rosa, G. and Marinucci, M. 2000. Identification of the sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. **Insect Molecular Biology**, 9: 509–513.
- Ruiz, F., Quiñones, M.L., Calle, D.A., Erazo, H.F., Alzate, J.F. and Linton, Y-M. 2005. Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *A. (N.) oswaldoi* in Southern Colombia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100: 155–160.
- Russel, P.F., Rozeboom, L.E., and Stone, A. 1943. Keys to the Anophelinae mosquitoes of the world with notes on their identification, distribution, biology and relation to malaria. The American Entomological Society. The Academy of Natural Sciences, p. 152, Philadelphia.
- Sedaghat, M.M, Linton, Y-M., Nicolescu, G., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Oshagi, M.A. and Vatandoost, H. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. **Systematic Entomology**, 28: 241-256.
- Sedaghat, M.M., & Harbach, R.E. 2005. An annotated checklist of the *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Iran. **Journal of Vector Ecology**, 30 (2): 272-276.
- Stegnii, V.N., & Kabanova, V.M. 1976. Cytological study of indigenous populations of the malaria mosquito in the territory of the U.S.S.R Identification of a new species of *Anopheles* in the *maculipennis* complex by the cytodiagnostic method. **Mosquito Systematics** 10: 1–12
- Steyskal, G.C. 1972. The meaning of the term 'Sibling Species'. **Systematic Zoology**, 21 (4): 446.
- Suzzoni-Blatger, I., Cianchi, R. and Bullini, L. 1990. Le complexe *Anopheles maculipennis*: criteres morphologique et enzymatiques de determination. **Annales de Parasitologie humaine et comparee**, 65: 37-40.
- Şimşek, F.M. 2005. Seasonal frequency and relative density of larval populations of mosquito species (Diptera: Culicidae) in Şanlıurfa province, Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 30: 383-392.
- Şimşek, F.M. 2006. Şanlıurfa (Siverek)'da sıtma vektörü *Anopheles (Anopheles) claviger* (Diptera: Culicidae)'in ekolojik özellikleri üzerine araştırmalar. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (2): 115-120.
- Thomas, B.Y., & Aitken, H.G. 1939. The *Anopheles maculipennis* complex of western America. **The Pan-Pacific Entomologist**, 15 (4): 191-192.

- Torres, E.P., Foley, D.H. and Bryan, J.H. 2006. Molecular systematics of the Philippine malaria vector *Anopheles flavirostris*. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 44–52.
- Van Bortel, W., Trung, H.D., Roelants, P., Harbach, R.E., Backeljau, T. and Coosemans, M. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the complex. **Insect Molecular Biology**, 9: 335–340.
- Walton, C., Sharpe, G.R., Pritchard, S.J., Thelwell, N.J. and Butlin, R.K. 1999. Molecular identification of mosquito species. **Biological Journal of the Linnean Society**, 68: 241-256.
- Walton, C., Samboon, P., O'Loughlin, S.M., Zhang, S., Harbach, R.E., Linton, Y-M., Chen, B., Nolan, K., Duong, S., Fong, M-Y., Vythilingum, I., Mohammed, Z.D., Trung, H.D. and Butlin, R.K. 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. **Genetics and Evolution**, 7: 93-102.
- White, G.B. 1978. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. **Mosquito Systematics**, 10 (1): 13-44.
- WHO, World Health Organization, World health reports, Geneva, Switzerland [<http://www.who.int/whr/en/index.html>] Erişim Tarihi: 23.10.2008.
- WHO, 1988. Vector Bionomics in the Epidemiology and Control of Malaria. 91 p. **World Health Organisation document**. WHO, Mondiale.
- WHO, 2005. Scaling up the Response to Malaria in The WHO European Region. **Progress towards curbing an epidemic 2000–2004**. 55 p. World Health Organization Regional Office For Europe, Copenhagen.
- WHO, 2008. **Meeting on progress achieved with malaria elimination in the WHO European Region**. 47 p. Ashgabat, Turkmenistan.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Albrigh, D.G., Klein, T.A. and Braun, M.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera : Culicidae: *Anopheles*). **Insect Molecular Biology**, 1 (4): 205-211.
- WRBU, Walter Reed Biosystematics Unit, Systematic Catalog of Culicidae, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington DC [<http://www.mosquitocatalog.org>] Erişim Tarihi: 12.12.2008.

- Young, I., & Coleman, A.W. 2003. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 30: 236-242.
- Yurttaş, H., Alten, B. and Aytekin, A.M. 2005. Variability in natural populations of *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) from southeast Anatolia, revealed by morphometric and allozymic analyses. **Journal of Vector Ecology**, 30 (2): 206-212.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emel SEVGİLİ
Doğum yeri ve Tarihi : Çarşamba/SAMSUN, 01.03.1983

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü, 2006.
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiriler : 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Sözlü Bildiri: Sevgili, E., Şimşek, F.M., Ülger, C., Bardakçı, F., 2008. Türkiye’de *Anopheles maculipennis* Grubunun Moleküler Sistematiği
Projeler : Türkiye Akdeniz Bölgesi Sivrisineklerinin (Diptera: Culicidae) Sistematiği ve Biyolojik-Ekolojik Özellikleri TUBİTAK (106O841) (bursiyer)
Türkiye’de *Anopheles maculipennis* Kompleksi (Diptera: Culicidae)’nin Sistematiği ve Biyolojik-Ekolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Adnan Menderes Üniversitesi, BAP (FEF-08004) (Yardımcı araştırmacı)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : emelkabartan@hotmail.com
Tel : 0506 4378820