

Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir Bölümünde Sorun Oluşturan Karasinek (Diptera: Simuliidae) Türlerinin Moleküler Klasifikasyonu

The Molecular Classification of Blackfly (Diptera: Simuliidae) Species Which Pose a Problem in Nevşehir Part of Central Kızılırmak Basin

Hakan Yeşilöz, Alparslan Yıldırım

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, Kızılırmak Nehri'nin Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen bölümünde, sorun oluşturan simuliid türlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla planlanmıştır.

Yöntemler: Mayıs-Eylül 2011 tarihleri arasında 150 adet simuliid larva örnekleme yapılmıştır. Toplanan larvaların önce morfolojik identifikasyonları yapılmış daha sonra moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir. Morfolojik teşhisleri yapılan örneklerden seçilen toplam 7 larva örneğinden genomik DNA ekstraksiyonunu yapılmış ve elde edilen DNA'ların parsiyel mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) ve ribozomal complete internal transcript spacer 2 ve parsiyel 28S (ITS-2/28S) gen bölgeleri amplifiye edilerek sekans ve filogenetik analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Morfolojik incelemesi yapılan 150 simuliid larva örneğinin 85'i *Simulium* (*S.*) *Wilhelmia* sp., 46'sı *S. Wilhelmia lineatum*, 19'u ise *S. Wilhelmia balcanicum* olarak tanımlenmiştir. Mt-COI ve ITS-2/28S gen bölgeleri yönünden amplifikasyonları yapılan örneklerden *S. Wilhelmia* sp. için 3, *S. lineatum* ve *S. balcanicum* için de ikişer izolatan sekans analizleri yapılmıştır. Filogenetik olarak izolatların her iki gen bölgesi için de tür bazlı olarak küme oluşturduğu görülmüş, sekans heterojenitesi *S. lineatum*'da daha yüksek belirlenmiştir. *Wilhelmia* alt soyundaki diğer türlerle kıyaslandığında *S. lineatum* ve *S. balcanicum*'un birbirine daha yakın olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile Orta Kızılırmak Havzasında sorun oluşturan *S. Wilhelmia* alt soyundaki karasinek türlerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenileri üzerine bilimsel veriler sağlanmıştır. (*Türkiye Parazitol Derg* 2015; 39: 33-40)

Anahtar Sözcükler: Simuliidae, larva, moleküler karakterizasyon, Kızılırmak, Nevşehir

Geliş Tarihi: 12 Ağustos 2014

Kabul Tarihi: 20 Kasım 2014

ABSTRACT

Objective: This study was carried out to determine the molecular characterization of simuliid species which cause a problem in the part of Kızılırmak passes from Ürgüp and Gülşehir districts of Nevşehir.

Methods: Between May and September 2011, totally 150 simuliid larvae were sampled. Morphological identifications of the collected larvae specimens were done before the molecular analyses. Genomic DNA extractions were utilized on 7 larvae specimens which were selected from morphologically identified samples and the sequence and phylogenetic analyses were performed after the amplification of the partial mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) and ribosomal complete internal transcript spacer 2 and partial 28S (ITS-2/28S) gene regions.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüş olan aynı başlıklı yüksek lisans tez çalışmasından özetlenmiştir.

This study was summarized which has the same title of master thesis, in department of Veterinary Parasitology, Erciyes University Health Science Institute.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Alparslan Yıldırım, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye. Tel: +90 352 207 66 66 E-posta: yildirima@erciyes.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2015.3778

©Telif hakkı 2015 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.
©Copyright 2015 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolderg.org

Results: Eighty-five, 46 and 19 out of 150 morphologically examined specimens were identified as *Simulium* (*S.*) *Wilhelmia* sp., *S. Wilhelmia lineatum* and *S. Wilhelmia balcanicum*, respectively. Among the amplified samples with respect to mt-COI and ITS-2/28S gene regions, sequence analyses were performed on 3 and 2 isolates from *S. Wilhelmia* sp. and both *S. lineatum* and *S. balcanicum*. The isolates were found to be clustered together depending on the species for both gene regions phylogenetically and the sequence heterogeneity was found to be higher in *S. lineatum*. When comparing with the other species under the *Wilhelmia* subgenus, *S. lineatum* and *S. balcanicum* were determined to be more close to each other.

Conclusion: Scientific data on the molecular characterization and phylogeny of blackfly species under the *S. Wilhelmia* subgenus which pose a problem in the Central Kızılırmak Basin were provided with this study. (*Türkiye Parazit Derg* 2015; 39: 33-40)

Keywords: Simuliidae, larvae, molecular characterization, Kızılırmak, Nevşehir

Received: 12 Ağustos 2014

Accepted: 20 Kasım 2014

GİRİŞ

Diptera dizisi içerisinde Nematocera dizi bölümünde yer alan Simuliidae (Blackflies) ailesi dünyanın her bölgesinde görülebilen önemli insekt ailelerinden birisini teşkil etmektedir. Bu ailede bu güne kadar 2101'i yaşayan, 12'si ortadan kalkmış (fossil) toplam 2113 tür tarif edilmiş ve bunların 1697'si *Simulium* soyunda yer almıştır (1). Bu insektler gelişimlerini akuatik ve karasal ekosistemde tamamlamakta olup, ekonomik açıdan önemli pest gruplarından birini teşkil etmelerinin yanı sıra kanatlı ve evcil hayvanlar ile insan dahil bir çok memeliye çeşitli patojenleri nakletmeleleriyle de oldukça önem arz etmektedirler.

Palearktik bölgede karasinek faunası iyi bilinmesine karşın (1) Türkiye'nin Simuliidae faunası hakkındaki bilgi sınırlıdır. Günümüze kadar yapılan çalışmaların (2-15) daha çok çeşitli akarsulardan izole edilen larva ve/veya pupa dönemlerinin morfolojik identifikasyonuna dayalı teşhis ve prevalans çalışmaları olduğu dikkati çekmektedir.

Simuliidlerin taksonomik klasifikasyonu konvansiyonel olarak larvada kromozomal analiz, larva ve pupada morfoloji ve erginlerinde dış yapı morfolojisine dayanmaktadır. Morfolojik ve sitolojik tür identifikasyonları bu aile içerisinde kriptik ve sibling (kardeş) tür çeşitliliğinin yüksek olmasından dolayı oldukça zor olup aynı zamanda uzman araştırmacılar gerektirmektedir (16-18). Bunun yanında bu aile için geniş çaplı kladistik filogenetik araştırmalar da sadece birkaç çalışma ile sınırlıdır (17, 19, 20). Simuliidlerin taksonomisi ile ilgili DNA sekans çalışmaları 16S ribozomal RNA ve transfer RNA gen bölgelerinin araştırılmasıyla başlamıştır (21). Daha sonra ise çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri simuliid türlerinin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır. Ribozomal gen bölgeleri için 16S ve 18S small subunit, 5,8S ve 28S gibi large subunit, Internal transcribed spacer (ITS) 1 ve ITS-2 gibi non fonksiyonel gen bölgeleri; mitokondrial (mt) gen bölgeleri için ise NADH dehidrogenase subunit 4 (NAD4) ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gibi gen bölgeleri filogenetik ilişkilerin incelenmesinde tercih edilen gen bölgeleri olmuştur (22-28).

Orta Kızılırmak Havzasında Yamula Barajı'nın 2006 yılında faaliyete geçmesi ile birlikte Kızılırmak Nehri'nin Kayseri ve Nevşehir illerinden geçen yaklaşık 150 kilometrelik kısmında *Simulium* spp. popülasyonunda afet boyutunda büyük bir artış meydana gelmiş ve bölgede simuliid salgını baş göstermiştir (9). Kayseri Valiliği'nin koordinatörliğünde 2007 yılında başlatılan mücadele projesi ile karasinek sayısındaki artış kontrol altına alınmıştır. Ancak biyotik potansiyeli yüksek olan bu sineklerin oluşturdukları tehdit devam etmekte olup uygun çevresel koşulların tekrar yeri-

ne gelmesi ve etkin mücadelenin bırakılması neticesinde popülasyonun artarak tekrar büyük sorunlara yol açma riski bulunmaktadır. Bu çalışmada Kızılırmak Nehri'nin Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen bölümünde söz konusu probleme yol açan simuliid tür veya türlerine ait larva örneklerinin morfolojik teşhislerini takiben, mt-COI ve ribozomal ITS-2/28S gen bölgelerine göre moleküler karakterlerini ve filogenetik ilişkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Araştırma Sahası ve Simuliid Larvalarının Toplanması

Çalışma Mayıs-Eylül 2011 tarihleri arasında Kızılırmak nehrinin Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerinden geçen bölümünde, simuliid yoğunluğu dikkate alınarak belirlenmiş üç toplama istasyonunda gerçekleştirilmiştir. Örnekleme yapılan istasyonlarda eş zamanlı olarak GPS sistemi ile bölgenin koordinatları ve haritası çıkarılmıştır (Tablo 1). Larva örneklemeinde; istasyonların akıntılı ve durgun bölgeleri, farklı zemin yapısına sahip alanlar, gölgeli ve güneşli kısımlar ve kenar vejetasyon yapısının olup olmamasına göre numune alınmasına dikkat edilmiştir. Simuliid larvaları nehir yatağı içinde tuttukları taş ve bitkilerden pens yardımı ile ağız vida kapaklı viallerdeki absolut etanol içerisine toplanmıştır.

Morfolojik İdentifikasyon

Larva örneklerinin morfolojik identifikasyonları dijital kameralı ve özel yazılıma sahip bilgisayar destekli stereo mikroskop altında ilgili teşhis anahtarlarına göre yapılmıştır (7, 13, 17, 29).

Genomik DNA İzolasyonu

Morfolojik identifikasyonları yapılan larva örneklerinden ön homojenizasyon sonrası genomik DNA ekstraksiyonu, tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (Exiprep™ 16; Bioneer, CA, USA) ve genomik DNA ekstraksiyon kitleri (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA; Corning Life Sciences, California, USA; GeneJET Genomic DNA Purification Kit; Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Final elüsyon 50µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları moleküler analizlerde optimum DNA konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için nanodrop spektrofotometre (ASP-3700; ACT Gene, NJ, USA) kullanıla-

Tablo 1. *Simulium* larvalarının toplandığı odak ve larva sayıları

İstasyon	Koordinat	Bağlı olduğu merkez	Larva sayısı
A	38° 43'.58.78"K; 34° 55'.45.91"D	Ürgüp	50
B	38° 45'.25.17"K; 34° 36'.55.32"D	Gülşehir	50
C	38° 46'.33.74"K; 34° 34'.12.75"D	Gülşehir	50

Tablo 2. Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik identifikasyon sonuçları

Tür	İstasyon A	İstasyon B	İstasyon C	Toplam
<i>S. Wilhelmsia</i> sp.*	27	28	30	85
<i>S. lineatum</i>	15	17	14	46
<i>S. balcanicum</i>	8	5	6	19
Toplam	50	50	50	150

*Solungaç histoblast gelişimi tamamlanmamış erken dönem larvalar

rak ölçülmüştür. Genomik DNA ekstraktları kullanılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Larva örneklerinin DNA Amplifikasyonu ve Elektroforezi

Simuliid larva örneklerinden elde edilen genomik DNA ekstraktları ribosomal ITS-2 ve 28S gen bölgesinin yaklaşık 430 bp gen fragmentini amplifiye eden ITS2F ve ITS2R (26); mt-COI gen bölgesinin 709 bp gen fragmentini amplifiye eden LCO1490 ve HCO2198 (30) primerleri ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µL) % 1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA, USA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

ITS-2 ve Mt-COI gen bölgelerinin Sekans ve Filogenetik Analizleri

Morfolojik tür teşhisleri yapılmış larva örneklerinin PCR analizleri sonucu uygun bant profilleri gösterenlerden seçilen izolatlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası örnekler ITS-2/28S ve mt-COI gen bölgeleri sırasıyla ITS2F/ITS2R ve LCO1490/HCO2198 primerleri ile ABI 3700 Capillary Sequence System (Applied Biosystems, CA, USA) de sekanslatılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatlar ait kromotogramlar Geneious 6.1.6 (created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>) genetik yazılımında dikkatlice analiz edildikten sonra forward ve revers dizilimlerin ikili hizalamaları yapılmış ve analizleri sonrası final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünyada GenBank'a kayıtlı diğer simuliid izolatları ile Geneious 6.1.6 (created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>) yazılımında Clustal W metodu kullanılarak çoklu hizalamaları yapılmıştır. Genetik uzaklıkların belirlenmesinde Kimura Two Parameter modeli seçilmiştir (31). Filogenetik ağaçlar Mega 5.0 yazılımında (31) bootstrap değeri 1000 alınarak Neighbour-Joining metodu ile oluşturulmuştur.

BULGULAR

Morfolojik analiz

Araştırma odaklarında toplanan larva örneklerinin morfolojik identifikasyon sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Larvaların morfolojik incelemesinde (Resim 1a); labral fanların varlığı, vücutta tüberküllerin bulunmaması, cephalic apotome'nin posterior bölümünde genişlemesi ve ecdysial çizginin belirgin çıkıntı göstermeme-

si, ventral papilin yokluğu, hypostoma'da santral ve lateral dişlerin iyi gelişmiş olması, posterior çengel halkasının ventralde dorsaldeki bölümüne oranla daha geniş olması ve bir sırada 25'ten fazla çengelin bulunması gibi morfolojik kriterlerle incelenen larvaların *S. Wilhelmsia* alt soyunda oldukları belirlenmiştir. *S. Wilhelmsia* alt soyundaki türlerin ayırımında diğer birçok *Simulium* türünde olduğu gibi solungaç histoblastının morfolojik özellikleri önemli bir kriterdir. İncelenen larvalarda solungaç histoblastının median filamentlerinin lateraldekilere oranla daha dar olması ile (Resim 1b) örneklerin tür teşhisi *S. lineatum* veya *S. balcanicum*'a indirgenmiştir. Bu iki türün ayırımında ise solungaç histoblastının mediandaki iki filamentinin tabanda birleşip çatallanması ile *S. balcanicum* (Resim 1c), solungaç histoblastının tüm filamentlerinin birbirinden ayrı olması ile de *S. lineatum* (Resim 1d) teşhisleri konulmuştur. Erken dönem larvalarda solungaç histoblast gelişimi tam olmadığı için teşhis soy altı düzeyinde *S. Wilhelmsia* sp. olarak yapılmıştır.

Mt-COI ve ITS-2/28S Gen Bölgeleri Sekans ve Filogenetik Analizleri

Simuliid larvalarından izole edilen genomik DNA'ların mt-COI ve ribozomal ITS2/28S gen bölgeleri için spesifik primerler ile parsiyel amplifikasyonları sonucu agaroz jel üzerinde spesifik olarak sırasıyla 709 ve 430 bp (Resim 2a, b) büyüklükte DNA bantları olduğu belirlenmiştir. Amplifikasyonları yapılan örneklerden seçilen uygun konsantrasyondaki *S. Wilhelmsia* sp. için 3, *S. lineatum* ve *S. balcanicum* için de ikişer izolata ait ampliconlar jel pürifiye edilmiş ve sekanslanmıştır. Nükleotid dizileri elde edilen izolatlar mt-COI gen bölgesi yönünden *S. lineatum* için JQ034310 (Kızılırmak 5 izolati), JQ034311 (Kızılırmak 6 izolati) ve JQ034313 (Kızılırmak 3 izolati); *S. balcanicum* için JQ030883 (Kızılırmak 1 izolati), JQ034308 (Kızılırmak 2 izolati), JQ034309 (Kızılırmak 4 izolati) ve JQ034312 (Kızılırmak 7 izolati) aksesyon numaraları ile GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aynı izolatlar (Kızılırmak 1-7) ait ribozomal ITS-2/28S sekansları da JQ066783-89 aksesyon numaralarıyla kayıtları sağlanmıştır. Filogenetik analizlere GenBank'ta kayıtlı *S. Wilhelmsia* altsoyunda yer alan az sayıdaki *S. equinum* Almanya ve *S. paraequinum* Ermenistan izolatları da dahil edilmiştir.

Mt-COI gen bölgesine göre *S. Wilhelmsia* altsoyundaki türlere ait izolatlar arasında korunmuş bölgelerle birlikte türler arasında ve tür içinde çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Mt-COI ve ITS-2 gen bölgeleri filogenetik analiz sonuçlarıyla, morfolojik analizi ile tür tayini yapılan larvalar değerlendirilerek konfirmasyonları yapılmış, sekans analizlerine dahil edilen üç *S. Wilhelmsia* sp. izolatının ikisinin *S. balcanicum*, birinin ise *S. lineatum* olduğu belirlenmiştir. İzolatların mt-COI gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 1'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta gösterildiği gibi *S. balcanicum* izolatları tek kümede, *S. lineatum* izolatları ise ikisi *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki kümede yer almışlardır. Bu sonuçlara göre *S. Wilhelmsia* alt soyundaki türlere ait izolatların mt-COI gen bölgesine göre grup içi ve gruplar arası farklılıklarında; *S. balcanicum* izolatları arasında %1,4±0,4, *S. lineatum* izolatları arasında ise %1,8±0,6 farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında grup farklılıkları incelendiğinde *S. balcanicum* ve *S. lineatum* izolatları arasında %2,7±0,6, *S. balcanicum* ve *S. equinum* izolatları arasında



Resim 1. a-d. *S. Wilhelmsia* larvası (a) Solungaç histoblastı (b) Solungaç histoblastı filamenti (*S. balcanicum*) (c) Solungaç histoblastı filamenti (*S. lineatum*) (d)

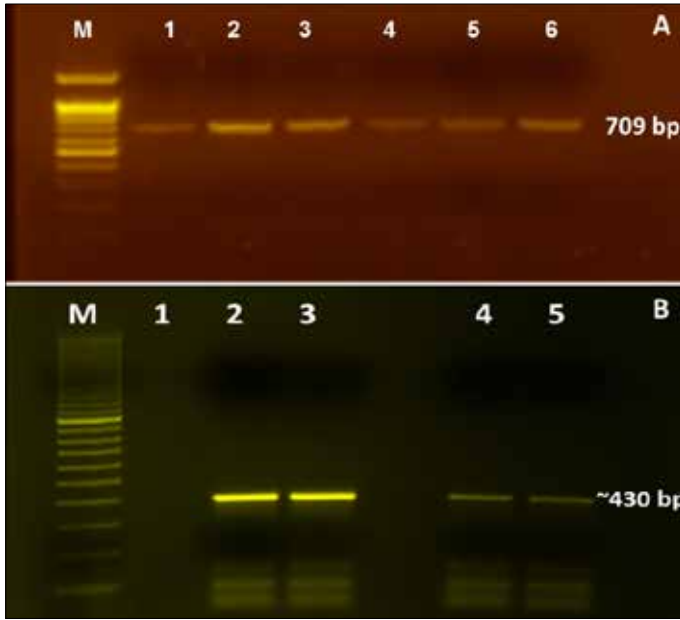
%13,4±1,7, *S. balcanicum* ve *S. paraequinum* izolatları arasında %13,5±1,7, *S. lineatum* ve *S. equinum* izolatları arasında %13,4±1,8, *S. lineatum* ve *S. paraequinum* izolatları arasında ise %10,7±1,6 genetik farklılık belirlenmiştir.

ITS-2 gen bölgesine göre *S. Wilhelmsia* altsoyundaki türlere ait izolatların özellikle tür içinde olmak üzere homolojilerinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında türler arasında nükleotid varyasyonlarının en yüksek 267-311. bazlar arasında görüldüğü saptanmıştır. İncelenen izolatların ITS-2 gen bölgesine göre Neighbor joining metodu (Kimura Two Parameter modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 2'de verilmiştir. Filogenetik ağaçta gösterildiği gibi *S. balcanicum* izolatları tamamen identik bulunmuş olup tek bir kümede, *S. lineatum* izolatları ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki kümede yer almışlardır. Grup içi ve gruplar arası farklılıklarda; *S. balcanicum* izolatlarının %100 homoloji gösterdiği, *S. lineatum* izolatları arasında ise %0,2±0,2, farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında grup farklılıkları incelendiğinde *S. balcanicum* ve *S. lineatum* izolatları arasında %0,4±0,3, *S. bal-*

canicum ve *S. equinum* izolatları arasında %2,5±0,8, *S. lineatum* ve *S. equinum* izolatları arasında ise %2,4±0,8 genetik farklılık belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Diptera dizisi, Nematocera dizialtı ve Simuliidae ailesinde yer alan karasinekler hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit etmelerinin yanında ekonomik ve ekolojik bakımdan da önemli insektlerdir. Günümüze kadar Palearktik bölgede Simuliidae ailesinde 660'in üzerinde türün varlığı rapor edilmiştir (1). Aynı bölgede yer alan Türkiye'de ise morfometrik analizlere göre bildirilen tür sayısı 63 ile sınırlı kalmıştır (2-14). Diğer yandan Türkiye'de günümüze kadar simuliidler üzerine sito-kromozomal ve moleküler tabanlı identifikasyon ve klasifikasyon çalışmalarının eksikliği dikkati çekmiştir. Bu çalışma ile Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerindeki bölümlerinde yayılış gösteren ve soruna yol açan simuliid türleri morfometrik analizlerin yanında moleküler analizlerle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarla incelenen örnekler arasında *S. Wilhelmsia* alt soyunda iki türün varlığı belirlenmiş olup *S. lineatum*'un primer yaygın tür olduğu, *S. balcani-*



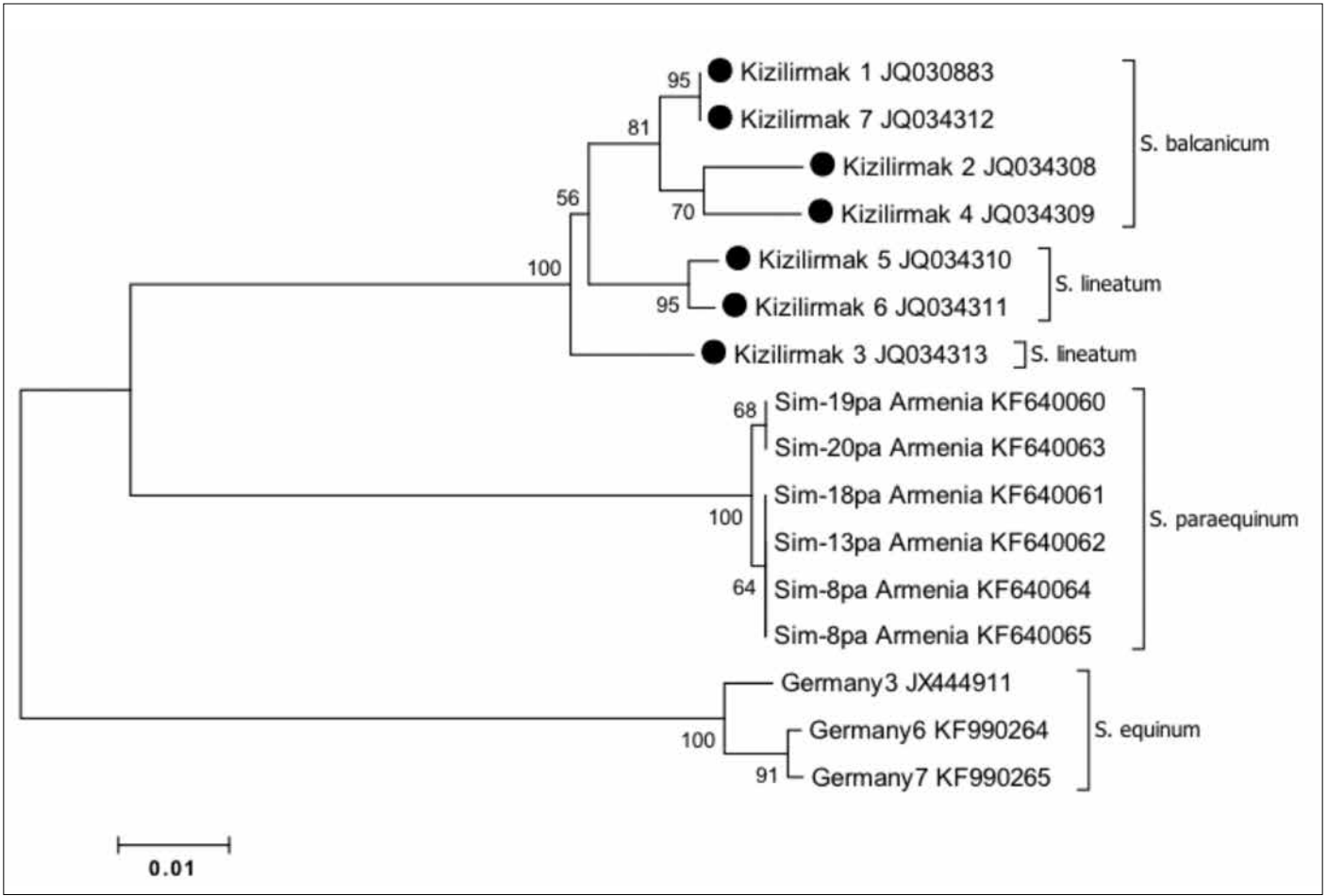
Resim 2. a, b. Simuliid larvalarının parsiyel mt-COI (a) ve ITS2/28S (b) gen bölgelerini amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker (100 bp); 1-6 (a), 2-5 (b) pozitif örnekler

cum'un ise daha sınırlı yayılış gösterdiği saptanmıştır. Morfometrik analizlerle *S. lineatum* Türkiye'de Büyük Menderes, Çoruh, Kızılırmak, Yeşilirmak, Sakarya Irmağı ve Köyceğiz'de (2, 9-11, 15); *S. balcanicum* Büyük Menderes, Kızılırmak, Sakarya Irmağı ve Yeşil İrmak (2, 10, 11) havzalarında rapor edilmiştir. Türkiye'nin değişik akarsularında varlığı bildirilmiş (2, 10, 11) olan *Wilhelmia* alt soyundaki *S. equinum*, *S. pseudoequinum*, *S. paraequinum*, *S. veltistshevi* ve *S. turgaicum* türlerine bu çalışmanın yürütüldüğü araştırma sahasında rastlanmamıştır.

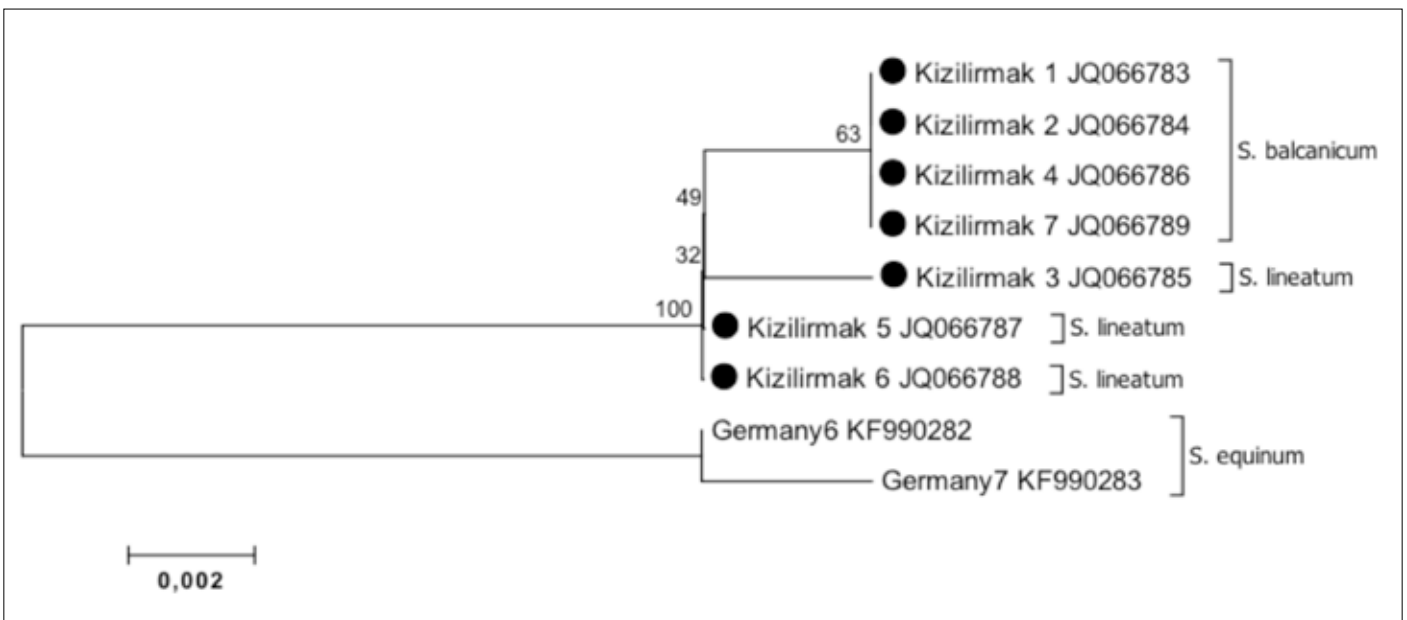
Morfolojik, kromozomal ve moleküler karakterlerin birlikte uygulanması ile birçok simuliid nesilleri (major nesiller, örneğin, alt aileler ve soylar) arasındaki evrimsel ilişki açıklığa kavuşturulmuştur (17, 19). Moleküler biyolojik teknikler simuliid türlerinin analizi için daha çok özelliğın incelenmesine imkân sağlamıştır. Sitogenetik, morfolojik (32, 33) ve moleküler (19) çalışmalar, Simuliinae alt ailesinin holoarktik Prosimuliini ve tüm dünyada yaygın olan Simuliini olmak üzere iki üst soya ayrıldığını ortaya koymuştur. Simuliid türlerinin evrimsel ve filogenetik ilişkilerinin araştırılmasında çeşitli nükleer ribozomal ve mitokondrial gen bölgeleri çalışılmıştır. Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir (34). Simuliid türler üzerine GenBank'ta mt-COI gen bölgesinin araştırıldığı farklı ülkelerden çeşitli kayıtlar bulunmaktadır. Pramual ve ark., (28), *Gomphostilbia* altsoyundaki 13 türden oryantal karasinekte mt-COI gen bölgesinin farklılıkları üzerine yaptıkları filogenetik çalışmada, intraspesifik genetik farklılığı, ortalama %2,75 (%0-9,28) interspesifik genetik farklılığı ise %11,41 (%0,34-18,84) olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar (28) mt-COI gen bölgesine göre DNA barkodlamasının kriptik biyodiversiteyi belirlemede ve geleneksel taksonomiye kolaylaştırma da önemli olduğunu kaydetmişler, morfolojik kriterlere göre

belirlenen *Gomphostilbia* altsoyundaki tür gruplarının monofiletik olmadığını ve bu soydaki klasifikasyonun tekrar değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Pramual ve Kuvangkadilok (35), *S. angulistylum*'un diversitesini araştırmak amacıyla sitogenetik, mt-COI sekans ve ekolojik analizleri bir arada kullanmışlar ve fikse kromozom inverzyonları ile karakterize olan üç sitoformun (A, B ve C) varlığını ortaya koymuşlardır. Bu sitoformlardan A ve B olanlarının ekolojik olarak düşük rakımlı habitatlarda, C olanının ise yüksek rakımlı habitatlarda görüldüğünü belirlemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar (35) mt-COI DNA sekans analizleriyle bu sitoformlar arasında önemli genetik farklılıklar tespit etmişler, sitoformların içinde de gizli diversiteyi gösteren farklı nesillerin varlığını ortaya koymuşlardır. Rivera ve Currie (27), Nearktik simuliid türleri içerisinde morfolojik olarak farklı 65 tür ve kardeş tür içeren tür kompleksinde genetik varyasyonu, mt-COI gen bölgesine göre araştırmışlar, benzer türler arasında genetik varyasyonu ortalama %14,93 (%2,83-15,33) olarak saptarken, morfolojik farklı türlerde intraspesifik genetik varyasyonu ise ortalama %0,72 (%0-3,84) olarak bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar (27) mt-COI gen bölgesi DNA barkodlamasının simuliidlerdeki kriptik çeşitliliğın araştırılmasında ve tür identifikasyonunda etkili bir yöntem olduğunu kaydetmişlerdir. Çalışmamızda Mt-COI gen bölgesine göre *S. lineatum* ve *S. balcanicum* türlerine ait izolatlar arasında korunmuş bölgelerle birlikte türler arasında ve tür içinde intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. *S. balcanicum* izolatlarının filogenetik ağaç üzerinde tek bir kümede yer aldığı ve genetik farklılığın, *S. lineatum* izolatlarına göre daha düşük olduğu saptanmıştır. İncelenen örnek sayısı az olmakla birlikte bu sonuç, polimorfizmin *S. balcanicum*'da daha düşük olabileceği ve tek bir tür kompleksi varlığına dair bir kanıt olarak değerlendirilmiştir. *S. lineatum* izolatlarının ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki ayrı kümede yer aldığı görülmüş ve tür içi genetik farklılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar da *S. lineatum*'da farklı sitoformlar olabileceğini ve tür altında kardeş (sibling) türlerin varlığı hipotezini destekleyen veriler sağlamıştır. Ayrıca elde edilen mt-COI filogenetik analiz sonuçları Pramual ve Kuvangkadilok (35)'in bulgularına paralel olarak *S. lineatum* sitoformlarının içinde de farklı nesillerin varlığına dair veriler sağlamıştır. Mt-COI filogenetik analizlerine göre grup farklılıkları incelendiğinde *S. balcanicum* ve *S. lineatum* izolatları birbirine yakın bulunurken aynı altsoydaki *S. paraequinum* ve *S. equinum*'un bu iki türden yüksek genetik farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Nükleer rDNA'da bulunan intergenik spacer ITS-2, birçok simuliid türünde tek bir kromozom üzerinde yerleşmiş (36) bir gen bölgesi olup, birçok organizmanın filogenetik çalışmalarında moleküler araçlara büyük bir katkısı olmuştur. ITS-2 sekans kıyaslamaları birbirine yakın türlerin ayrımında, popülasyon farklılıklarında ve evrimsel ilişkilerin yeniden oluşturulmasında (24, 26, 37, 38) oldukça kullanışlı olmuştur. *Simulium* soyunda yer alan çeşitli türler üzerine ITS-2 gen bölgesi yönünden karakterizasyon çalışmaları ve GenBank kayıtları yapılmış olmasına karşın günümüze kadar *Wilhelmia* alt soyundaki türlerin ITS-2 sekans analizleri ve karakterizasyonları üzerine her hangi bir çalışma ve GenBank kaydı yapılmamıştır. Bu açıdan bu çalışma ile elde edilen nükleer ribozomal ITS-2 sekans ve karakterizasyon sonuçları *S. lineatum* ve *S. balcanicum* türleri için ilk kayıtları oluşturmuştur. ITS-2 gen



Şekil 1. *Simulium Wilhelmsi* altsoyundaki izolatlarının (izolat adı ve GenBank aksesyion numaraları ile verilmiştir), parsiyel mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining-Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. ●: Çalışmada elde edilen izolatlar.



Şekil 2. *Simulium* izolatlarının (izolat adı ve GenBank aksesyion numaraları ile verilmiştir) complete ITS2 ve parsiyel 28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining - Kimura Two Parameter modeli). Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. ●: Çalışmada elde edilen izolatlar.

bölgesi filogenetik analizlerine göre *S. Wilhelmia* altsoyundaki türlere ait izolatların özellikle tür içinde olmak üzere homolojilerinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında farklı canlı ve türler üzerinde çalışmış bazı araştırmacıların (37,38) bulgularına paralel olarak birbirine yakın olan *Wilhelmia* alt soyundaki türler arasında da tür spesifik nükleotid varyasyonlarının varlığı ortaya konmuş ve mt-COI gen bölgesi sonuçlarına paralel olarak *S. balcanicum* izolatlarının tek bir kümede, *S. lineatum* izolatlarının ise biri *S. balcanicum* izolatlarına yakın olmak üzere iki kümede yer aldığı belirlenmiştir. ITS-2 gen bölgesine göre tür içi genetik homolojinin mt-COI gen bölgesine göre daha yüksek olması, bu gen bölgesinin pest kontrolünde ve tür bazlı identifikasyon çalışmalarında konfirmasyon aracı olarak daha ideal bir genetik marker olabileceğini göstermiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışma ile Orta Kızılırmak Havzasının Nevşehir'in Ürgüp ve Gülşehir ilçelerindeki bölümlerinde *S. lineatum* ve *S. balcanicum* türlerinin varlığı ve yaygınlıkları saptanmış, primer yaygın tür *S. lineatum* olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmayla *Wilhelmia* alt soyundaki bu türlere ait izolatların mitokondriyal ve ribozomal gen bölgelerine göre karakterizasyonları yapılarak filogenileri ortaya konmuştur.

Etik Komite Onayı: Çalışma materyalini insektler oluşturduğundan etik komite onayı alınmamıştır.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.Y., H.Y.; Tasarım - A.Y., H.Y.; Denetleme - A.Y.; Kaynaklar - A.Y., H.Y.; Malzemeler - A.Y., H.Y.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - A.Y., H.Y.; Analiz ve/veya yorum - A.Y., H.Y.; Literatür taraması - A.Y., H.Y.; Yazıyı yazan - A.Y., H.Y.; Eleştirel inceleme - A.Y.; Diğer - A.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3437 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Due to the material composed from insect specimens Ethics Committee Approval was not needed for this study.

Informed Consent: Not required in this study.

Author Contributions: Concept - A.Y., H.Y.; Design - A.Y., H.Y.; Supervision - A.Y.; Funding - A.Y., H.Y.; Materials - A.Y., H.Y.; Data Collection and/or Processing - A.Y., H.Y.; Analysis and/or Interpretation - A.Y., H.Y.; Literature Review - A.Y., H.Y.; Writing - A.Y., H.Y.; Critical Review - A.Y.; Other - A.Y.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by Erciyes University Research Fund with the project number TSY-11-3437.

KAYNAKLAR

1. Available from: <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>
2. Kazancı N, Clergue-Gazeau M. Simuliidae de Turquie. I: Premieres donnees faunistiques et biogeographiques (Diptera, Simuliidae). Ann Limnol 1990; 26: 45-50. [CrossRef]
3. Clergue-Gazeau M, Kazancı N. Türkiye Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası II: Çeşitli akarsu sistemlerinden toplanmış türlere ekolojik bir yaklaşım, Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 1992; 13: 17-32.
4. Özbek H, Hayat R, Aslan İ. Erzurum'un bazı ilçelerinde simuliid (Diptera, Simuliidae) salgını. Türk Entomol Derg 1995; 19: 37-42.
5. Balık S, Ustaoglu MR, Özbek M, Taşdemir A, Topkara ET. Yelkoprü Mağarası (Dikili, İzmir) ve yakın çevresinin sucul faunası hakkında bir ön araştırma. EÜ Su Ürünleri Dergisi 2002; 19: 221-5.
6. Şirin Ü, Sahin Y. New records of blackflies (Diptera, Simuliidae) for the Turkish fauna. Zool Middle East 2005; 36: 99-104. [CrossRef]
7. Crosskey RW, Zwick H. New faunal records with taxonomic annotations for the Blackflies of Turkey (Diptera: Simuliidae). Aquat Insect 2007; 29: 21-48. [CrossRef]
8. Zwick H. On a small collection of wild-caught adult black flies (Diptera: Simuliidae) from Turkey. Entomologist's Monthly Magazine 2007; 143: 100.
9. Yılmaz A, İnci A, Tunçbilek ŞA, Yeşilöz H, Koçak Ö, Şirin Ü ve ark., Orta Kızılırmak Havzasında Karasinek (Simulium (Wilhelmia) lineatum) (Diptera: Simuliidae) İstilas ERÜ Vet Fak Derg 2007; 4: 91-5.
10. Kazancı N, Ertunç Ö. Bazı Simuliidae (Insecta: Diptera) türlerinin habitat özellikleri. EÜ Su Ürün Derg 2008; 25: 319-23.
11. Kazancı N, Ertunç Ö. On the Simuliidae (Insecta, Diptera) fauna of Turkey. Rev Hydrobiol 2008; 1: 27-36.
12. Ertunç Ö, Türkmen G, Kazancı N. Research on Simuliidae (Insecta: Diptera) fauna of Yedigöller National Park (Bolu, Turkey). Rev Hydrobiol 2008; 2: 81-92.
13. Ertunç Ö. Türkiye'nin Batısındaki Bazı Akarsuların Simuliidae (Insecta: Diptera) Faunası Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.
14. Kazancı N, Ertunç Ö. Simuliidae (Insecta, Diptera) türlerinin Yeşilirmak Nehri Havzası (Türkiye)'nin sucul habitat kalitesini belirlemede indicator olarak kullanılmaları. Rev Hydrobiol 2010; 3: 27-36.
15. Gazyağcı AN. Kırıkkale ve Ankara Yöresi Kızılırmak Nehri'nde Simuliidae Türlerinin Yayılışı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi 5-10 Eylül: Kars-Türkiye; s. 163.
16. Crosskey RW. Simuliid taxonomy. Laird M, editor. Black flies: the future for biological methods in integrated control. London: Academic Press; 1981. p. 3-18.
17. Adler PH, Currie DC, Wood DM. The Black Flies (Simuliidae) of North America. USA; Cornell University Press: 2004. p. 941.
18. Jitklang S, Kuvangkadilok C, Baimai V. Cytogenetics and morpho taxonomy of the *Simulium (Gomphostilbia) ceylonicum* species group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. Zootaxa 2008; 1917: 1-28.
19. Moulton JK. Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). Syst Entomol 2000; 25: 95-113. [CrossRef]
20. Moulton JK. Can the current molecular Arsenal adequately track rapid divergence events within Simuliidae (Diptera)? Mol Phylogenet Evol 2003; 27: 45-57. [CrossRef]
21. Pruess KP, Zhu X, Powers TO. Mitochondrial transfer RNA genes in a blackfly, *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae), indicate long divergence from mosquito (Diptera: Culicidae) and fruitfly (Diptera: Drosophilidae). J Med Entomol 1992; 29: 644-51. [CrossRef]
22. Tang JM, Toe L, Back C, Unnasch TR. Mitochondrial alleles of *Simulium damnosum sensu lato* infected with *Onchocerca volvulus*. Int J Parasitol 1995; 25: 1251-4. [CrossRef]

23. Higazi TB, Boakye DA, Wilson MD, Mahmoud BM, Baraka OZ, Mukhtar MM, Unnasch TR. Cyto taxonomic and molecular analysis of *Simulium (Edwardsellum) damnosum sensulato* (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan. J Med Entomol 2001; 37: 547-53. [\[CrossRef\]](#)
24. Thanwisai A, Kuvangkadilok C, Baimai V. Molecular phylogeny of blackflies (Diptera: Simuliidae) from Thailand, using ITS2 rDNA. Genetica 2006; 128: 177-204. [\[CrossRef\]](#)
25. Kruger A, Hennings IC. Molecular phylogenetics of black flies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications. Mol Phylogenet Evol 2006; 39: 83-90. [\[CrossRef\]](#)
26. LaRue B, Gaudreau C, Bagre HO, Charpentier G. Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae). Mol Phylogenet Evol 2009; 53: 749-57. [\[CrossRef\]](#)
27. Rivera J, Currie DC. Identification of Nearctic blackflies using DNA barcoding (Diptera: Simuliidae). Mol Ecol Res 2009; 9: 224-36. [\[CrossRef\]](#)
28. Pramual P, Wongpakam K, Adler P. Cryptic biodiversity and phylogenetic relationships revealed by DNA barcoding of Oriental black flies in the subgenus *Gomphostilbia* (Diptera: Simuliidae). Genome 2011; 54: 1-9. [\[CrossRef\]](#)
29. Lechthaler W, Car M. Simuliidae-Key to larvae and pupae from Central and Western Europe. CD-R Edition, Vienna, 2005.
30. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci 2003; 270: 96-9. [\[CrossRef\]](#)
31. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution. Mol Biol Evol 2011; 28: 2731-9. [\[CrossRef\]](#)
32. Grenier P, Rageau J. Remarque's sur la classification des Simuliidae. Bull Soc Pathol Exot 1960; 53: 727-42.
33. Currie DC. Phylogeny of Primitive Simuliidae (Insecta: Diptera: Culicimorpha). Ph.D. dissertation, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1988.
34. Khalimonchuk O, Rödel G. Biogenesis of cytochrome c oxidase. Mitochondrion 2005; 5: 363-88. [\[CrossRef\]](#)
35. Pramual P, Kuvangkadilok C. Integrated cytogenetic, ecological, and DNA barcode study reveals cryptic diversity in *Simulium (Gomphostilbia) angulistylum* (Diptera: Simuliidae). Genome 2012; 55: 447-58. [\[CrossRef\]](#)
36. Rothfels KH. Cytotaxonomy of black flies (Simuliidae). Ann Rev Entomol 1979; 24: 507-37. [\[CrossRef\]](#)
37. Marrellin MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 1999; 36: 679-84. [\[CrossRef\]](#)
38. Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer LL, Coetzee M et al. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. Insect Mol Biol 2000; 9: 369-74. [\[CrossRef\]](#)