

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BULUNAN *Culex pipiens*
kompleks TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

YAMAN IŞIK

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. M. MUSTAFA AKINER
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. HASAN SEVGİLİ
YRD. DOÇ. DR FATİH ŞABAN BERİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2017
Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BULUNAN *Culex pipiens* kompleksi
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ**

Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa AKINER danışmanlığında, Yaman IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/07/ 2017 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa AKINER	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında hazırlanan bu çalışma Orta Karadeniz Bölgesi'nde bulunan *Culex pipiens* kompleks türlerinin moleküler olarak belirlenmesi amaçlanmıştır

Yüksek lisans tezimi hazırlamada bana gerekli kaynakları temin eden ve engin bilgisi ile bana yardımcı olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa AKINER'e, değerli hocam Yrd. Doç. Dr Fatih Şaban BERİŞ'e ve jüri üyem olan Prof. Dr. Hasan SEVGİLİ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarımda yanımda olan arkadaşım Murat ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

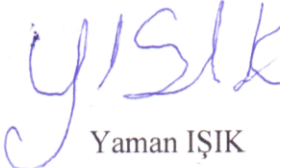
Bu tez çalışması TÜBİTAK KBAG 113Z795 nolu bilimsel araştırma projesi kapsamında desteklenmiştir. Çalışma süresinde TÜBİTAK tarafından sağlanan Yüksek Lisans Bursu için kuruma teşekkürlerimi sunarım.

Yaman IŞIK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımca hazırlanan “Orta Karadeniz Bölgesi’nde Bulunan *Culex pipiens* kompleks Türlerinin Moleküler Olarak Belirlenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.

03/07/ 2017


Yaman IŞIK

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

ORTA KARADENİZ BÖLGESİNDE BULUNAN *Culex pipiens* kompleks TÜRLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

YAMAN IŞIK

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. M. Mustafa AKINER

Yapılan bu tez çalışmasında Orta Karadeniz Bölgesi'nde yayılım gösteren *Culex pipiens* tür kompleksinin belirlenmesi amacıyla 2014-2016 yılları mayıs eylül ayları arasında 14 noktadan örneklem yapılmıştır. *Culex pipiens* tür kompleksinde morfolojik tür teşhisinin problemlerinden dolayı türlerin statülerinin moleküler olarak belirlenmesi amacıyla *Ace-2* gen bölgesinin bir kısmı çoğaltılmıştır. Alanda yoğun olarak yayılan *Culex pipiens* varyetelerinin belirlenmesi amacıyla CQ11 bölgesi çoğaltılarak moleküler teşhisleri yapılmaya çalışılmıştır. Morfolojik olarak kompleks üyesi olarak tanımlanan örnekler moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ampikonlar dizileme işlemine tabi tutulmuştur. Dizi verileri kromotogramları incelendikten sonra Mega7 programı yardımıyla hizalanmış ve Genbanktan alınan örneklerde eklenerek filogenetik ağaçlar çizilmiştir. Elde edilen verilere göre alanda sadece *Culex pipiens* türü olduğu ve bunun iki varyetesinin dağılım gösterdiği (*Culex pipiens pipiens* ve *Culex pipiens f molestus*) belirlenmiştir. Ülkemizde varlığı bilinen ve son dönemde moleküler olarak doğrulana *Culex pipiens quinquefasciatus* ve bu kompleksin ikiz türü olan *Culex torrentium* örneklerine çalışma alanında rastlanmamıştır. Çizilen UPGMA ağacı Samsun Horhor deresinde sadece *Culex pipiens f molestus* varyetesinin varlığı göstermiştir. Amasya, Bafra, Giresun, Çarşamba, Ordu Ünye bölgelerinde her iki varyeteninde var olduğu ve diğer bölgelerde ise sadece *Cx. pipiens pipiens* varyetesinin varlığı belirlenmiştir. Genbank örnekleri ile karşılaştırma sonucunda örneklerimizin KM922631.1 nolu *Culex pipiens pipiens* örneğiyle yüksek oranda uyduğu belirlenmiştir. Çizilen ağaçta *Culex pipiens quinquefasciatus* Genbank örneğiyle ile olan uzaklığının *Culex pipiens pallens*'ten daha az olduğu ve en uzak türün *Culex torrentium* olduğu belirlenmiştir.

2017, 35 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Culex pipiens* kompleks, *Ace-2*, *CQ11*, Orta Karadeniz Bölgesi

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE *Culex pipiens* complex SPECIES BY MOLECULARLY IN THE MIDDLE BLACK SEA REGION

YAMAN IŞIK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Asst. Prof. Dr. M. Mustafa AKINER

In this thesis, sampling was performed from 14 points between May and September 2014-2016 in order to determine the *Culex pipiens* species complex which is spreading in the Middle Black Sea Region. A part of the *Ace-2* gene region had been amplified in order to determine the species status related to the morphological identification problems in the *Culex pipiens* species complex. The CQ11 region was reproduced and molecular diagnostics were attempted for determining *Culex pipiens* varieties which are heavily distributed in the field. The morphologically identified complex members had been used in molecular studies. The amplicons obtained as a result of the PCR reaction were subjected to the sequencing process. Sequence chromatograms were examined and then aligned with Mega7 program and phylogenetic trees were drawn by adding them to the samples taken from the Genbank. According to the obtained data, it was determined just only *Culex pipiens* species in the area and two varieties of *Culex pipiens* (*Culex pipiens* and *Culex pipiens f molestus*) distribution. *Culex pipiens quinquefasciatus*, which is known to exist in our country and has recently been molecularly confirmed, and *Culex torrentium*, the twin species of this complex, have not been found in the study area. The drawn UPGMA tree only showed the presence of *Culex pipiens f molestus* variety at the Samsun Horhor stream. It has been identified each two varieties were exist in Amasya, Bafra, Giresun, Çarşamba, Ordu Ünye and only the presence of the *Cx. pipiens pipiens* variety in the other regions. As a result of comparison with the Genbank samples, It was found that our samples highly overlapped with KM922631.1 *Culex pipiens* samples. *Culex pipiens quinquefasciatus* GenBank sample was found to be less distant from *Culex pipiens pallens* GenBank sample, and *Culex torrentium* was found to be the most distant species.

2017, 35 Pages

Keywords: *Culex pipiens* complex, *Ace-2*, *CQ11*, Middle Blacksea Region

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
ŞEKİLLER TABLOSU	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Sivrisineklerde Beslenme	4
1.3. Sivrisineklerde Kışlama	5
1.4. <i>Culex</i> Cinsi Sivrisinekler.....	6
1.4.1. <i>Culex</i> Cinsinin Biyo-Ekolojisi	6
1.4.2. <i>Culex</i> Cinsinin Coğrafi Yayılışı	7
1.4.3. <i>Culex</i> Cinsinin Yaşam Döngüsü	7
1.4.4. <i>Culex pipiens</i> kompleks Türleri	8
1.4.5. <i>Culex pipiens</i> 'in Sistematigi.....	9
1.4.6. <i>Culex pipiens</i> kompleks Türlerinin Neden Olduğu Bazı Önemli Hastalıklar	10
1.4.6.1. Batı Nil Virüsü	10
1.4.6.2. Chikungunya Hastalığı.....	10
1.4.6.3. Filariasis	11
1.4.6.4. Rift Vadisi Ateşi.....	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	13
2.1. Çalışma Alanı.....	13
2.2. Örneklerin Toplanması, Laboratuvara Getirilmesi ve Saklanması	13
2.3. <i>Culex pipiens</i> kompleks Örneklerinin Morfolojik Tür Teşhisi	13
2.4. DNA İzolasyonu.....	14
2.5. <i>Culex pipiens</i> Tür Kompleksinin Moleküler Olarak Belirlenmesi.....	15
2.6. DNA Dizi Analizi.....	17
3. BULGULAR	20
3.1. Alan Çalışmalarında Elde Edilen Bulgular	20

3.2.	Moleküler Bulgular	20
3.3.	DNA Dizilerinden Elde Edilen Bulgular	20
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	27
5.	ÖNERİLER	30
	KAYNAKLAR	31
	ÖZGEÇMİŞ	35



ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1. <i>Culex pipiens</i> kompleks yaşam döngüsü.....	8
Şekil 2. <i>Culex pipiens</i> kompleks ergini	9
Şekil 3. Ace2 bölgesi PZR jel görüntüsü.....	21
Şekil 4. CQ11 gen bölgesi PZR jel görüntüsü.....	21
Şekil 5. Ace-2 gen bölgesinin kendi aralarında hizalanması sonucunda çizilen UPGMA ağacı	23
Şekil 6. Ace-2 gen bölgesine dış grup eklenerek çizilen UPGMA ağacı	25
Şekil 7. Elde edilen CQ11 gen bölgesi kullanılarak elde edilen UPGMA ağacı.....	26



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Örneklerin toplanma alanları ve GPS koordinatları	14
Tablo 2. Çekirdek DNA'sı Ace-2 bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler	18
Tablo 3. Kompleks türlerinin sınıflandırılmasında kullanılan baz uzunlukları	18
Tablo 4. Mitokondri DNA'sı COI bölgesinin PCR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler	19
Tablo 5. ACE 2 bölgesinde farklılıklara sebep olan noktalar ve mutasyon şekilleri	22



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ace	Asetilcolin esteraz
rpm	Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
RNaz	Ribonükleaz
UV	Ultraviyole ışınları
rDNA	Ribozomal DNA
dNTP	Deoksi nükleozit trifosfat
Taq pol	<i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimi
U	Unit (Enzim Birimi)
pmol	Pikomol
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
ml	Mililitre
sn	Saniye
bç	Baz çifti
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
GPS	Küresel Konumlama Sistemi
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-acetate-EDTA
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asi
gDNA	Genomik DNA
dH₂O	Distile su

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünya nüfusunun artışı, insan hareketlerinin ve göç hareketlerinin artması, kentleşmede düzensizlik, uluslararası ticaret, aşırı arazi kullanımı ve habitatların tahribi, sulama sistemlerinin çoğalması ve aşırı sulama, ticaret ve insan hareketliliğine paralel olarak patojen vektör kontağının artması gibi pek çok etmen vektörel kökenli hastalık tehdidini arttırmıştır (Gubler, 2002; Kuçlu, 2015). Kentsel alanlardaki nüfus artışı, kentsel alanların etrafındaki sulak alanların yapısını ve fonksiyonlarını ciddi biçimde etkilemekte ve değişimlere neden olmaktadır. Bu alanlar kentlerin ihtiyacı olan suyu temin etmelerinin yanı sıra insan sağlığını tehdit eden birçok hastalığın taşıyıcısı olan türlere de yaşam alanı sağlamaktadır. Alanlarda var olan ve artan oranda hızlı değişimler, artropoda filumuna dâhil vektörlerin bakteri, virüs, protozoon ve helmintler gibi etmenleri taşıma kapasitelerini de arttırmaktadır. Filuma ait olan sivrisinekler vektörü oldukları sıtma, batı nil virüsü, deng hastalığı, elefantiyaz (fil hastalığı), sarıhumma, zika virüsü gibi önemli hastalıklara sebep olması nedeniyle entomoloji çalışmalarında önemli bir yere sahiptir (Harbach ve Kitching, 2005; Wang vd., 2012). Dünya sağlık örgütünün tahminlerine göre her yıl dünyanın nüfusunun yarısından fazlası sivrisineklerin taşıdıkları hastalıkların tehdidi altındadır. Sivrisinekler kozmopolit türlerdir yaklaşık olarak dünya sivrisinek popülasyonunun $\frac{3}{4}$ ü sıcak, tropik ve subtropik bölgelerde olmasına rağmen sadece kutup bölgelerinde bulunmazlar. Yayılımları için ancak okyanuslar, yüksek dağlar ve geniş çöller doğal sınırlayıcı faktör olabilir (Service, 2008). Sivrisineklerin yayılmasını sağlayacak sosyal, ekolojik ve küresel düzeyde değişiklikleri kapsayan pek çok sebep mevcuttur.

Ülkemiz hem coğrafi konumu hem de barındırdığı habitat çeşitliliği sayesinde vektörler ve özelinde sivrisinekler anlamında özel bir yere sahiptir. Son dönemde yapılan çalışmalarla ülkemizde varlığı doğrulanan tür sayısı 65'e çıkmış ve bunların *Aedes/Ochleratatus*, *Uranotaenia*, *Culiseta*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Orthopomyia* ve *Anopheles* cinsleri içerisinde yer aldığı bilinmektedir (Günay, 2015; Bedir, 2016; Akıner vd., 2016). Ancak bu 65 türün tamamı kozmopolit özellikler sergilemeyip bölgeler bazında farklılıklar içermektedir. Orta Karadeniz Bölgesi kendine has yapısı ve

barındırdığı iki büyük ovanın yanı sıra içerisinde pek çok irili ufaklı sulak alanları da barındırmaktadır. Özellikle Bafra ve Çarşamba ovaları sulu tarım yapılması ve sivrisineklerin gelişme ortamı olan sucul alanları barındırması anlamında önemli alanlardır. Bunun yanısıra alanda hem ülkemizin hem de bölgenin en önemli kuş cennetlerinden biri olan Kızılırmak Kuş cennetide yer almaktadır. Sahil hattında yer alan bölgelerin yanısıra örneklem alanı içerisinde yer alan Amasya ili ve çeşitli noktalarda sulu tarım yapılan ve sivrisinekler için uygun üreme alanlarını barındıran önemli noktalardan bir tanesidir. Alanda yoğun sürdürülen tarım faaliyeti ve bölgenin en kalabalık ili olması nedeniyle Samsun alan içerisinde ayrı bir öneme sahip konumda olup, hem büyükşehir olması hemde tarımın en yoğun olarak yapıldığı il olması hasebiyle yüksek oranda insektisit kullanılan bölge olarak ta karşımıza çıkmaktadır. Buda alanda türler üzerine baskı oluşturuyor gibi bir izlenim doğursa da tam tersi olarak daha çok dirençli ve mücadele edilemez konumda yerleşik sivrisinek populasyonlarının oluşmasına neden olmaktadır. Alanın kendi dinamiğinde yer alan ve pirinç tarımının yoğun olarak yapıldığı alanlar ise hem tarihsel süreçte hem de günümüzde sıtma vektörünün Paleartik coğrafyada en önemli taşıyıcısı konumunda olan *Anopheles maculipennis* kompleks türlerinin yoğun olarak bulunduğu alanları içermektedir. Alan cumhuriyetin ilk dönemlerinden itibaren sıtma öncelikli alanlar listesinde yer almış (Evered, 2011) ve 1950'lerde başlatılan sıtma eradikasyon programı sonrasında 1970'lerde sıtma öncelikli bölge olmaktan çıkmıştır. Ancak alanda yer alan ve ülkemizin en büyük kuş cennetlerinden biri olan Kızılırmak Kuş cenneti içerisinde bulundurduğu kuş türleri ve önemli sivrisinek üreme habitatları ile diğer tehlikeli türler için zemin hazırlamaktadır.

Uzun yıllar mücadele sonucunda sıtma eradike edilse bile son dönemde artan oranda karşımıza çıkan Batı Nil virüsü, Chikungunya, Deng, Zika gibi yayılıcı ve sivrisinek kökenli hastalıklar pek çok ülkeyi olduğu gibi ülkemizide tehdit eder hale gelmiştir. 2010 yılında ülkemizde gözlenen ve 10 vatandaşımızın ölümüyle sonuçlanan Batı Nil ensefaliti salgını buna en büyük örnektir (Kalaycıoğlu vd., 2012). Batı Nil virüsü, Chikungunya gibi virüslerin taşıyıcısı *Cx. pipiens* kompleks türleri ile, sıtmanın vektörü olan *An. maculipennis* kompleks türleri aynı habitatı paylaşımları nedeniyle aynı alanda beraber ve yoğun oranda bulunabilirler. Dinlenme alanı tercihleri birbirleri ile tam olarak örtüşmese de yerleşim alanlarına daha yakın bölgelerde ve ahırlarda *An.*

maculipennis kompleks türleri daha fazla oranda bulunurken, kozmopolit olan *Cx. pipiens* kompleks türleri her türlü alanda bulunabilme özellikleri ve aşırı fırsatçı beslenme davranışları nedeniyle önemlidirler. Hem kuşları hem insanları dönem dönem kullanabilmeleri hem de iki türden aynı döngü içerisinde kan emebilmeleri nedeniyle daha geniş yelpazede hem zoofilik hem de zooantropofilik davranış sergileyerek her türlü alanda bulunabilirler (Merdivenci, 1984). Bu özellikleri, türe insandan hayvana ve hayvanda insana virüsleri ve diğer patojenleri nakledebilme olanağı sağlamaktadır. Kuzey yarımküre ve özellikle Avrupa'da ilkbaharı takiben yaz aylarında artan oranda Batı Nil ensefaliti vakaları gözlenmeye başlar ve sonbaharın sonuna doğru iyice artan oranda vakalar gözlenir. Bunun temel nedeni de rezervuar konumunda olan kuşların göç hareketinin başlaması ve kullandıkları rotalar üzerinde konakladıkları noktalarda var olan yerleşik *Cx. pipiens* kompleks üyeleri tarafından kan emilmesi nedeniyle döngüyü başlatmalarıdır. Bu anlamda da bölge ayrı bir öneme sahiptir. Bu bölgeye göçte son nokta olarak bulunan Kızılırmak Kuş cenneti ve küçük sulak alanlar Batı Nil virüsü başta olmak üzere pek çok hastalık tehdidinin bu tür kompleksi aracılığıyla insana ulaşması anlamında önemlidir.

Sivrisineklerle bulaşan hastalıkların çok fazla olması sebebiyle sivrisineklerin doğru şekilde tanınması önemlidir (Cooper ve Beebe, 2000). Bu sebeple sivrisinekler üzerine çok sayıda yayın yapılmış ve sivrisinekler larva pupa erginleri teşhisi için dünyada çok sayıda tür tayin anahtarı geliştirilmiştir (Merdivenci, 1984). Sivrisinekler kanat damarları, kanatların arka kenarında bulunan pullar ve kıllar, silindirik vücut yapıları uzun bir hortuma sahip olmaları gibi morfolojik özellikler bakımından diğer diptera üyelerinden ayrılır. Sivrisineklerin antenleri uzun 14 veya 15 segmentli, halka şeklinde kıllarla ve erkek sivrisineklerin antenleri daha gür kıllarla çevrilidirler. Kanat ve vücudu örten pulların deseni türlerin ayırımında kullanılan önemli dişi karakterleridir. Erkek erginlerin ayırımında ise abdomenin sonunda bulunan segmente ait özellikler önem arz etmektedir (Özcel ve Daldal 1997; Service, 2008; Sevgili ve Şimsek, 2012)

Sivrisineklerin tür tayininde genellikle morfolojik özellikler yeterli olmakla birlikte bazı tür komplekslerinin ayırımı için antenlerin üzerindeki sensillaların incelenmesi, çaprazlama deneyleri, politen kromozomları incelenmesi, enzim

sistemlerinin karşılaştırılması hatta DNA dizi analizi dahi gerekebilir (Özcel ve Daldal 1997; Becker vd., 2003).

Erişkin sivrisinekler iki yaşamlılar, sürüngenler, kuşlar, hayvanlar, insanlardan kan emerler. Sivrisineklerin erkekleri kan emmez bitki öz suları ile beslenirler. Dişiler erkekler gibi bitki öz sularıyla beslenir ancak yumurta bırakmak için kana ihtiyaç duyarlar (Merdivenci, 1984). Bazı sivrisinek türleri kan emmeden yumurta bırakabilirler. Sivrisineklerin hortumu çok ince olduğundan (yaklaşık 0.055 mm) hortumları kan emecekleri hayvanın derisinden içeri kolaylıkla sokulur. Emilen kanın pıhtılaşmasını önlemek amacıyla damara tükürük salgısı salgılanır. Dokuya akıtılan tükürük salgısı sinir uçlarını uyararak ısırılan yerde acı hissi meydana gelir. Sivrisineklerin ısırması sonucunda kaşıntı, şişlik, kızarıklık gibi belirtiler meydana gelir ve bu belirtiler genellikle yirmi dört saat içinde geçer. Bunun yanında sivrisineklerin kanın pıhtılaşmaması için salgıladıkları bu tükürük sıvısı hastalıkların geçişinde ana etmendir. Sivrisinek ısırığı insanlarda genellikle önemli sonuçlar meydana getirmez ancak ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilir (Merdivenci, 1984).

Dört hayat devresine sahip sivrisineklerde bu evreler yumurta, larva, pupa ve ergindir. Ergin dişiler kan emdikten yaklaşık 2-3 gün sonra 50 ile 200 arası yumurta bırakırlar. Sivrisinek ilk yumurtladığında yumurtalar beyaz renktedir ve bir süre sonra siyahlaşmaya başlar. Yumurta bırakma şekillerine göre sivrisinekler iki sınıfa ayrılırlar ve ilk grup *Aedes* ve *Anopheles* cinslerini içerirken (tek tek yumurta bırakanlar) ikinci grup *Culex* ve *Culiseta* cinslerinden oluşur (küme seklide yumurta bırakanlar). Bu gruplardan *Culex* ve *Culiseta* cinsleri yumurtalarını doğrudan suya bırakırken, *Aedes* türleri gibi sivrisinek türleri yumurtalarını su kenarına ya da su basması muhtemel yerlere, *Anopheles* cinsi sivrisinekler ise yumurtalarını tek tek suda yüzecek şekilde bırakırlar (Becker vd., 2003).

1.2. Sivrisineklerde Beslenme

Sivrisinek larvaları yumurtadan çıkar çıkmaz beslenmeye başlar ve su içinde bulunan mikroorganizmalar, organik bitki ve hayvan ölüleri, yosun, larva ve pupa gömlekleri ile beslenirken bazı türler pradatör olarak beslenmektedirler. Sivrisinek

pupaları beslenmezler. Sivrisinek erginleri ise bitki öz suları ile beslenirler (Becker vd., 2003; Service, 2008). Dişileri bitki öz sularını emmenin yanında yumurta bırakmak için kan emmeye ihtiyaç duyarlar. Kan emme tercihine göre zoofilik, anthropofilik, ornithofilik, zooantropofilik sınıflandırılmaktadırlar. Zofilik; hayvanlardan kan emen, anthropofilik; insanlardan kan emen, ornithofilik; kuşlardan kan emen ve *Culex* cinsinde dahil olduğu zooantropofilik ise hem insanlardan hem de havanlardan kan emen sivrisinekler olarak adlandırılmaktadırlar. Lakin her ne kadar bu sınıflandırılma yapılmış olsa da sivrisineklerin kan emme davranışında seçtikleri konaklar kesin çizgilerle ayrılmamaktadır. Yani ornitofilik bir sivrisinek insandan da kan emebilir. Sivrisineklerin konak seçiminde CO₂, sıcaklık, nem, koku, renk (kızıl ötesi), hareket, hamilelik, kandaki ürik asit miktarı gibi etmenler büyük rol oynamaktadır (Alten ve Çağlar, 1998).

Sivrisineklerin yaşam süreleri, sıcaklık, nem, hava akımları, konak bulunabilirliği gibi sebeplere bağlı olmakla tropikal bölge dışında kalan alanlarda sivrisineğin ömrü genellikle bir ayı geçmemektedir. Subtropikal alanlarda ise sivrisineklerin yaşama koşullarına uygun olması sebebiyle subtropikal alanlara göre daha fazla olmakla birlikte altı ayı geçmemektedir (Alten ve Çağlar, 1998).

1.3. Sivrisineklerde Kışlama

Pek çok sivrisinek ergini türü sonbahar mevsimi gelince kışı geçirmek için kendisine uygun kışlak arar. Bu alanlar genellikle insanlardan uzak kışı rahatsız edimeden geçirebilecekleri alanlardır. Havalarda soğumasıyla bireyler kışın kullanmak üzere vücudunda yağ biriktirir. (Alten ve Çağlar, 1998; Becker vd., 2003). Kış uykusuna girmek özellikle böcek popülasyonları için gelecek nesillerin devam etmesi açısından önemlidir. Kışlama sırasında canlılar metabolizmasını en düşük seviyeye getirir ve üreme faaliyeti ortam koşulları tekrar olumlu hale gelene kadar devam eder (Campbell vd., 2006). Bunun yanında sadece *Anopheles* cinsi sivrisinek türlerinde yarı kışlama olarak isimlendirilen; sivrisineğin sığındığı yerden uyanıp, kan emdikten sonra tekrar uyku haline dönmesi de görülebilir. Sivrisineklerin kışlaması hem nesillerin devamlılığı hemde vektörlerin gelecek yıla taşınması açısından çok önemlidir (Alten ve Çağlar, 1998).

Kışlama sırasında sivrisineklerin hareketleri minimum seviyede olması sebebiyle bu canlılarla yapılacak olan mücadeleyi de kolaylaştırmaktadır. Kışın başlamasıyla birlikte kışlak alanlarda kalıcı insektisitlerle yapılan ve kışlak mücadelesi olarak adlandırılan bu olay hem hem gelecek yılda sivrisinek popülasyonunun kontrol altına alınmasına hem de vektörlerin yayılmasına engel olmada önem arz etmektedir (Alten ve Çağlar, 1998; Akıner, 2009). Kış aylarında durgunluğun yanında bazen yaz aylarında da sivrisineklerin aşırı su kaybedip durgunluğa girebilir. Estivasyon olarak adlandırılan bu olayda sivrisinekler üreme faaliyetini tekrar su alana kadar kaybeder. Bazı türler estivasyon halinde bile kan emebilirler ama yine de yumurtlayamazlar. Bu olaya trofogni denir (Merdivenci, 1984; Alten ve Çağlar, 1998).

1.4. *Culex* Cinsi Sivrisinekler

1.4.1. *Culex* Cinsinin Biyo-Ekolojisi

Culex cinsi sivrisinekler dünya genelinde kozmopolit bir tür olup, larval olarak çeşme yalıkları ve çeşmeler altındaki su birikintileri, dere yatakları ve dere kenarları, hayvan sulama yalıklarındaki su birikintileri, yol kenarlarında birikmiş sular, çayırar ve orman altı suları, sulama havuzları , bahçe havuzları, bataklıklar, göl kenarında birikmiş sular ve göl bataklıkları, göletler ve göletler etrafında birikmiş sular, nehir kenarlarında birikmiş sular, sulama kanallarında birikmiş sular, toprak veya beton zeminde çeşitli nedenlerle birikmiş sular, Drenaj kanallarında (ev, sanayi, ahır) birikmiş sular, bitki kökenli kaynaklar, evsel ve endüstriyel atıklar gibi alanlarda yaşayabilmektedirler (Muslu vd, 2011).

Culex cinsi larvaları yüksek ovalarda ve 2000-2500 m yükseklikteki dağlık alanlarda gelişebilmektedir. Larvalar hava sıcaklığına bağlı olarak baharın ortalarında başlayarak sonbahara kadar bulunabilir. Yaz ayının sonlarına doğru larva sayılarında ciddi bir artış olur (Halepli ve Yılmaz, 2013). Bu artış havaların soğumasıyla azalır ve bazı sivrisinekler kışı larva şeklinde geçirirler. Sivrisineklerin erginleri ise yazın aktif bir şekilde hayatlarına devam ederken, kışın fertil dişiler kendilerine sakin bir yer bulup kışı orada geçirirler. Kış uykusu halindeki sivrisinekler yarı uyku halinde olup rahatsız

edildiklerinde buldukları yerden başka bir yere gidebilirler (Anten ve Çağlar, 1998). Kışı atlatan dişi bireyler havaların ısınması ile birlikte kendilerine bir konak aramaya başlar ve kan emdikten sonra yumurta bırakırlar (Merdivenci, 1984; Becker vd., 2003).

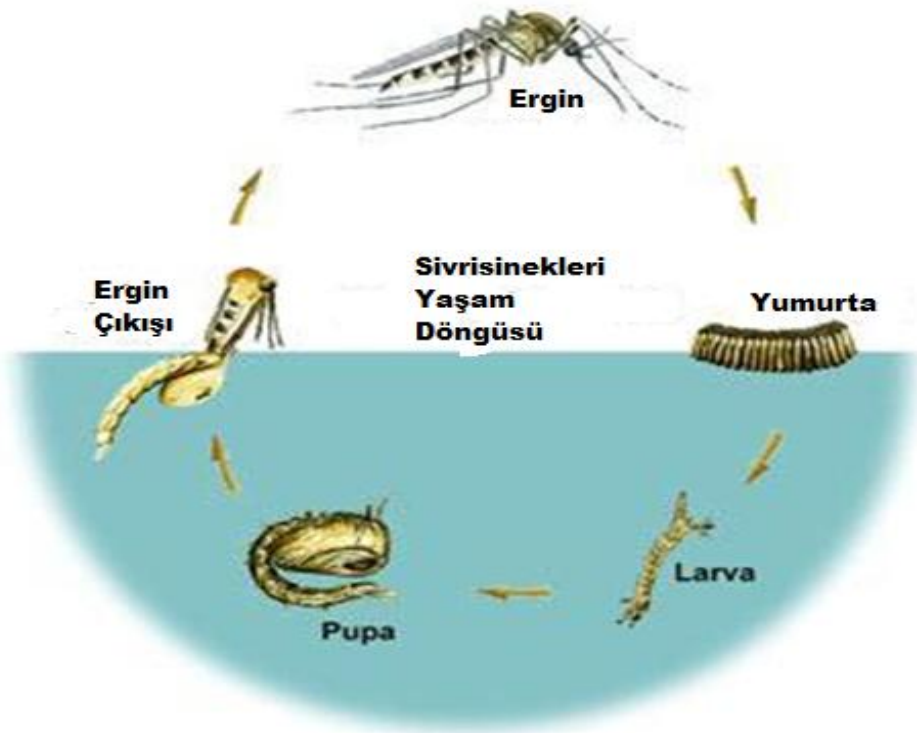
1.4.2. *Culex* Cinsinin Coğrafi Yayılışı

Sivrisinek türleri çöl ve buzullar hariç tutulursa hemen hemen dünyanın her bölgesinde yayılış göstermektedir (Öztürk, 2015). Ülkemizde *Culex* cinsi bütün iklim bölgelerinde yayılış göstermektedir (Merdivenci, 1984). Parrish, (1959) tarafından yapılan çalışmada ülkemizi deniz kıyısı bölgesi, İç Anadolu Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi, Güney Doğu Anadolu Bölgesi olmak üzere dört farklı kısma ayırmış ve bu bölgelerin tamamında *Culex* cinsine ait 16 farklı tür olduğunu belirtmiştir (Parrish, 1959).

1.4.3. *Culex* Cinsinin Yaşam Döngüsü

Yetişkin bir birey kan emdikten hemen sonra vücut ağırlığının atması sonucu olarak aktif hareket yeteneğini kaybeder, bu nedenle kendisini güvende olabileceği bir yere atar ve orada emmiş olduğu kanı sindirene kadar bekler. Yaklaşık olarak 2-3 gün süren bu sindirme sürecinin ardından yumurtalarını bırakacakları bir yer aramaya başlarlar. Genellikle yumurtalarını su yüzeyine küme şeklinde bırakırlar. Bir ergin birey vücut büyüklüğüne ve emmiş olduğu kanın miktarına göre değişmekle birlikte bir defada 75-150 adet yumurta bırakabilir (Merdivenci, 1984). Yumurtaların açılmasıyla birlikte su yüzeyindeki yumurta topluluğu rüzgâr ve akıntı ile birlikte dağılıp parçalanmaya başlar. Su yüzeyindeki yumurtaların büyük bir çoğunluğu yaklaşık iki gün içinde yumurtaların uç kısımlarını kesici dişleri yardımı ile deler ve yumurtadan çıkar (Service, 2008). Yumurtadan çıkan larvalar 3 kez gömlek değiştirir ve 4 evre geçirirler. Larvaların gömlekleri larvaların morfolojilerini birebir yansıtır bu yüzden tür teşhisinde kullanılabilirler. Larvaların buldukları suyun besin miktarına sıcaklığına vb. özelliklerine göre değişiklik göstermekle birlikte 4-5 gün süren lavra evresinden sonra pupa evresine geçerler (Özcel ve Daldal, 1997). Pupalarda çok hareketli olup beslenme aktivitesi göstermez ve ayrıca su altında uzun süre kalabilme yeteneğine sahiptirler.

İklimsel uygunluk döneminde, yaklaşık 1-2 gün süren bu evrenin sonunda rengi iyice koyulaşan pupa su yüzeyine çıkar ve bol miktarda hava yutar. Havanın etkisi ile iç basıncı artan pupa alın kısmından T şeklinde açılır. Açılan bu delikten ergin sivrisinek çıkmaya başlar. Yaklaşık 2 saat süren bu işlemin sonunda ergin birey tam olarak pupadan ayrılır. Pupadan çıkan sivrisinekler hemen uçuş yeteneği kazanamazlar. Bir süre su yüzeyinde bekleyen birey tam olarak olgunlaştıktan sonra su yüzeyinden ayrılır (Merdivenci, 1984). Genel olarak bir sivrisineğin yaşam döngüsü Şekil 4'te gösterilmiştir.

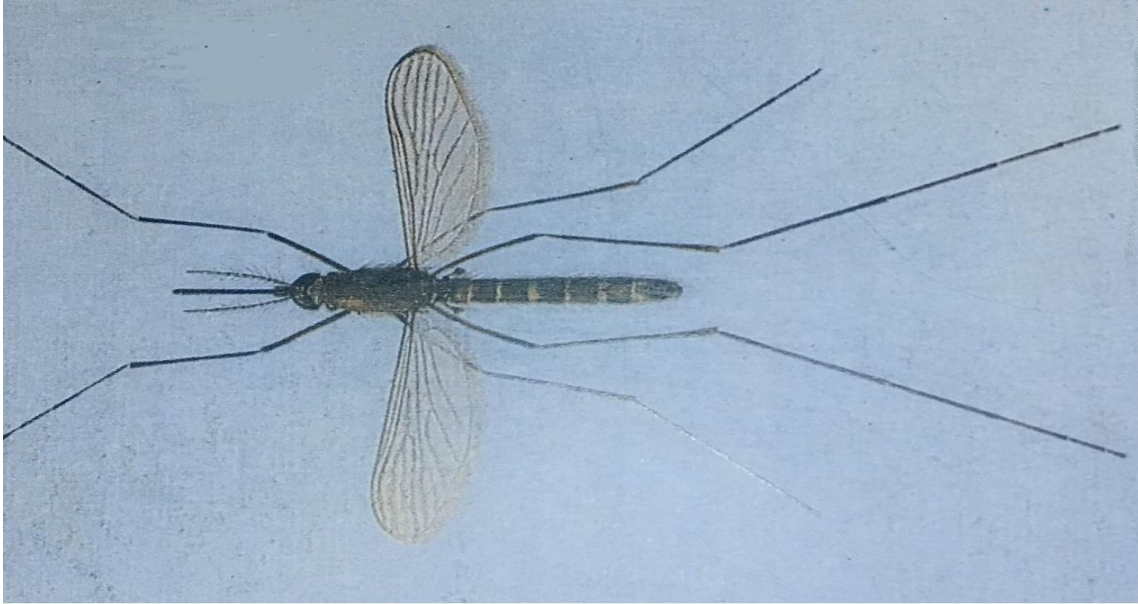


Şekil 1. *Culex pipiens* kompleks yaşam döngüsü (URL-1).

1.4.4. *Culex pipiens* kompleks Türleri

Günay (2015) tarafından yapılan çalışmada ülkemizde *Culex* cinsine ait *Culex deserticola*, *Culex hortensis*, *Culex laticinctus*, *Culex martinii*, *Culex mimeticus*, *Culex modestus*, *Culex pusillus*, *Culex theileri*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens ss*, *Culex torrentium*, *Culex impudicus*, *Culex pipiens f. Molestus*, *Culex europaeus* türlerinin varlığını bildirmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde ise, *Culex mimeticus*, *Culex hortensis*, *Culex territans*, *Culex torrentium*, *Culex theileri* ve *Culex pipiens*' e ait

iki biyotipin (*pipiens* ve *molestus*) varlığını bilirlenmiştir (TUBİTAK 113Z795 nolu proje verileri). *Culex pipiens* kompleks dünya genelinde *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex pallens*, *Culex torrentium*, Avustralya ve Okyanusya türleri olan *Culex australicus* ve *Culex globoxitus* türleri ile temsil edilmektedir. Bunun yanında *Culex pipiens* morfolojik olarak ayrımı yapılamayacak derecede benzer olan ve aralarında davranışsal ve yaşam alanı olarak farklılık gösteren *pipiens* ve *molestus* biyotipleri bulunmaktadır. (Becker, 2003). Ülkemizde ise bu komplekse ait *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens molestus*, *Culex quinquefasciatus* türlerinin varlığı bulunmuştur (Günay, 2015).



Şekil 2. *Culex pipiens* kompleks ergini (Aldemir, 2002).

1.4.5. *Culex pipiens*'in Sistematığı

ALEM Animalia (Animals)

ŞUBE Arthropoda (Arthropods)

ALT ŞUBE Hexapoda (Hexapods)

SINIF Insecta (Insects)

TAKIM Diptera (Flies)

AİLE Culicidae (Mosquitoes)

CİNS *Culex*

TÜR *Culex pipiens* (Northern House Mosquito) (URL-4).

1.4.6. *Culex pipiens* kompleks Türlerinin Neden Olduğu Bazı Önemli Hastalıklar

1.4.6.1. Batı Nil Virüsü

Culex cinsi sivrisinekler ile *Argus* ve *Hyalomma* cinsi keneler tarafından taşınan bir arbovirus olan bu virüs flaviviridae sınıfına ait zarflı tek iplikçikli bir RNA virüsüdür (Kalaycıoğlu, 2012). Dış ortamlara dayanıklı olmayan Batı Nil virusu, ısı, lipid çözücüler veya deterjan içeren dezenfektanlar ile kısa sürede dejenere olur (Yazıcı, 2004; Molaei, 2007). Bu virüsün ana rezervuarı kuşlar olup atlar, köpekler insanlar bu virüs için kör konaktır ve bu konaklarda döngüyü tamamlayamazlar (Yazıcı, 2004). Bu virüsün ana bulaşma yolu enfekte olmuş *Culex* cinsi sivrisinekler olup insandan insana doğrudan bulaşma gözlemlenmez. Bunun yanında kan ürünleri nakli ve organ nakillerinde bulaşma gözlenebilmektedir (Pealer vd., 2003). Ayrıca hamile kadınlardan bebeğine, emziren kadınlardan bebeğe geçişler olabilmektedir (Hinckley vd., 2007; Kuçlu, 2015).

Bu virüs ilk olarak 1937 yılında, Orta Afrika ülkelerinden Uganda'da Nil Nehri'nin batı kısımlarında enfekte bir kadından izole edilmiştir. Batı Nil virüsü dünya üzerinde çok sayıda salgına sebep olmuş olup bunlar Tablo1'de verilmiştir (Yazıcı, 2004).

Batı Nil virüsü için yapılan filogenetik analizler sonucunda bu virüsün genotip 1 ve genotip 2 olmak üzere iki ana kökeni bulunmuştur. Genotip 1 sadece klinik olarak insan ensefalitlerine neden olmaktadır, bu dizilime sahip Batı Nil virusleri, Afrika, Avrupa, Hindistan, Kuzey Amerika ülkelerinde izole edilmiştir. Genotip 2 viruslar insanlarda hastalık oluşturmamakla birlikte ilk olarak hayvanlardan Afrika'da izole edilmiştir (Yazıcı, 2004).

1.4.6.2. Chikungunya Hastalığı

Bir RNA virüsüdür. Chikungunya hastalığı, özellikle enfekte *Aedes* türü sivrisinekler tarafından insanlara bulaştırılır. Bunun yanında *Culex quinquefasciatus*

türünün bu hastalığı yaydığı yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Jupp vd., 1981).

Kelime anlamı Tanzanya'nın yerel dilinde 'iki büküm yapan' demektir. Eklem iltihapları ve şiddetli ağrılara bağlı olarak hastanın hareketlerinde ve duruşunda kısıtlanma gelişmesi bu tanımlamaya neden olmuştur. 2007'de İtalya ve Fransa'da sivrisinek-insan-sivrisinek geçişiyle olgularda artış görülmüştür. İnsandan insana doğrudan bulaştığına dair bir kanıt yoktur (URL2).

Belirtiler genellikle enfekte sivrisinek tarafından ısırıldıktan 3-7 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Ateş ve şiddetli eklem ağrıları en sık görülen belirtilerdir (sıklıkla ağrı el ve ayak eklemlerinde olmaktadır). Diğer belirtiler, baş ağrısı, kas ağrısı, eklem şişliği ya da döküntüdür. Ağır hastalık riski olan insanlar; yüksek tansiyon, diyabet veya kalp hastalığı olanlar, doğum sırasında maruziyet nedeni ile yenidoğanlar ve yaşlı yetişkinlerdir (65 yaş üzeri). Bu hastalıktan ölüm nadirdir (URL-2).

Chikungunya hastalığı Afrika, Asya, Avrupa, Hindistan ve Pasifik adalarında görülmektedir. 2013 yılı sonlarında Chikungunya Amerika'da ilk kez Karayip Adaları'nda görülmüştür (URL-2).

1.4.6.3. Filariasis

Bu hastalığa neden olan, dünya çapında önemli parazitlerden biri olan *Wuchereria bancrofti*'dir. Bu parazitin en önemli vektörü *Cx. pipiens* tür kompleksinin üyesi olan *Cx. quinquefasciatus* olduğu bilinmektedir. Lenf sistemine, lenf düğümlerine yerleşir ve kronik durumlarda fil hastalığına yol açarlar. 2009 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınlamış olduğu bildiriye göre 81 ülkede 120 milyondan fazla insan enfekte olmuş durumdadır. Durum böyle iken ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından Antalya ili ve çevresinde yapılan bir taramada Mart 2007'de 14 adet Filariasis hastası tespit edilmiştir. Antalya'daki bu tespit, Türkiye'de gerçekleşebilecek olası epidemiler açısından oldukça önemlidir (Günay, 2016). Bunun yanı sıra ülkemizde Alanya, Elâzığ, Çubuk, Samsun' da görülmüş olup en çok tropikal bölgelerde rastlanmaktadır (URL-3).

1.4.6.4. Rift Vadisi Ateşi

Hastalık ilk kez 1912 yılında Kenya’da bildirilmiş ve 1936 yılında Kenya’nın Rift vadisindeki Naivasha gölü çevresindeki koyun ve kuzulardan izole edildiği için bu şekilde isimlendirilmiştir. Virüsün bulaşması enfekte hayvanlardan virüsü alan *Culex* ve *Aedes* türü sivrisineklerin diğer hayvan ve insanları sokması ile olmaktadır. Afrika’nın birçok bölgesinde spontan olarak görülen bu enfeksiyon, yağışların artması ve sivrisineklerin çoğalması ile epidemik olarak ortaya çıkmaktadır (Uyar ve Akçalı, 2006).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışma Alanı

Çalışma bölgesi olarak Giresun il merkezinden başlamak üzere Sinop iline kadar bölgeden seçilen noktalar ile Amasya ilinin bazı noktaları belirlenmiştir. Örneklem koordinatları GPS yardımı kaydedilmiş ve Tablo 2’de verilmiştir. Alan 113Z795 nolu TÜBİTAK KBAG projesi alanının bir kısmını ve örneklem noktalarını içermektedir.

2.2. Örneklerin Toplanması, Laboratuvara Getirilmesi ve Saklanması

Çalışma bölgesi içerisinde *Culex* türleri için uygun üreme alanlarından standart kepçe, pipet ve fırça (WHO, 1975) yardımıyla yumurta, larva ve pupa örnekleri toplanmıştır. Örnekler toplandıkları alanda ayrı ayrı kaplara konulduktan ve alan özellikleri kaydedildikten sonra GPS kaydı tutularak muhafazalı kaplara alınıp buzluklar içerisinde uygun koşullar altında canlı olarak laboratuvara (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Vektör Ekolojisi ve Kontrol Laboratuvarı) getirilmiştir. Laboratuvar ortamında örneklerin bir kısmı ile morfolojik tür teşhisleri yapılmıştır. Geri kalan örnekler ise laboratuvar ortamında erginleştirilerek larva popülasyonundan ergin örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen erginlerin bir kısmı da hem morfolojik hem de moleküler tür teşhisi çalışmalarında kullanılmıştır.

2.3. *Culex pipiens* kompleks Örneklerinin Morfolojik Tür Teşhisi

Alansal çalışmalarla toplanan larva ve ergin sivrisinek örneklerinin morfolojik tür teşhisleri Leica EZ4 ve Soif stereo mikroskoplar kullanarak mikroskobik incelemeyle yapılmıştır. Çalışmada, Du Bose ve Curtin (1965), Harbach (1985;1988), Darsie ve Samanidou-Voyadjoglou (1997), Schaffner vd., (2001) tarafından hazırlanmış olan tür teşhis anahtarları kullanılmıştır. Örneklemeler sonucunda elde edilen örnekler materyale bağlı olarak larva, ergin ya da hem larva hem ergin olarak teşhis edilmiştir. Larvaların teşhisinde 4. evre larvalar, ergin teşhislerinde ise hem erkek hem de dişi bireyler incelenmiştir. Kompleks üyesi olarak teşhis edilen ve diğer örneklerden ayrılan örnekler

ise moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.

Tablo 1. Örneklerin toplanma alanları ve GPS koordinatları.

Bölge Adı	Kuzey (N)	Doğu (E)	Yükseklik (H)
Giresun Merkez	40.51.26.0	38.37.40.7	114
Gülyalı Giresun	40 57 90.8	38 04 24.6	2
Melet Ordu	40.58.31.2	37.56.13.5	2
Turnasuyu Ordu	40.58.54.4	38.00.10.6	2
Ünye Ordu	41.06.98.2	37.18.73.5	4
Çarşamba Samsun	41 10 08.9	36 42 33.1	20
Engiz Samsun	41.29.56.4	36.06.08.8	1
Alaçam Samsun	41 37 48.6	35 36 41.6	5
Bafra Samsun	41.03.51.9	35.52.23.4	23
Horhor Samsun	41.30.58.0	36.00.55.0	3
Dikmen Sinop	41.41.01.1	35.24.32.4	0
Amasya Merkez	40 46 0.2	35 42 18.8	462
Saluca Amasya	40 48 09.4	35 39 49.5	495
Merzifon Amasya	40 52 13.7	35 30 16.5	640

2.4. DNA İzolasyonu

DNA izalasyonu için Thermo Genejet genomik DNA izolasyon kiti® kullanılmıştır. İzolasyon aşamasında firma tarafından belirtilen standart prosedür uygulanmıştır. Uygulanan işlem basamakları ise şöyledir; Sivrisinek örnekleri epandorf tüplere konularak üzerine 180 mikrolitre parçalama (digeiton) solüsyonu eklenmiş ve örnekler porselen uçlarla pellet pestle motor yardımı ile ezilmiştir. Ezme işleminden

sonra örneklerin üzerine 20'şer µl proteinaz K eklenmiş alt üst yapıldıktan sonra örnekler 56 °C derecede 3 saat inkübe edilmiştir. 3 saatin sonunda örneklere 10 µl RNAaz eklenerek karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. RNAaz aşamasından sonra eppandorflara 200 µl lizis solüsyonu eklenerek her örnek 15 saniye karıştırılmıştır. İşlem bittikten sonra eppandorflara 400 µl % 50'lik alkol eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen son karışım kolona yüklenmiş ve kolon yeni bir 2000 mikrolitrelik eppandorfa aktarılarak 6000 rpm de 1 dakika santifüj edilmiştir. Daha sonra kolon temiz bir eppandorfa alınmış ve ilk eppandorf atılmıştır. Kolona 500 µl yıkama solüsyonu 1 eklenerek 6000 rpm de 1 dakika santifüj edilmiştir. Eppandorfta toplanan sıvı atılmış ve kolon tekrardan yeni bir eppandorf tüpe aktarılmıştır. Kolona bu aşamada 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenerek 6000 rpm de 3 dakika santifüj edilmiştir. Dipte kalan ve kolondan süzülen sıvı kısım eppandorf tüple birlikte atılmış ve kolon 1500 µl'lik yeni tüpe aktararak kolona 200 µl elusyon solüsyonu eklenmiştir. Bu halde 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler 6000 rpm de 1 dakika santifüj edilmiştir. Son aşamada kolon atılıp eppandorf tüpte toplanan kısım alınmıştır. Elde edilen DNA kalite bakımından, örneklerin % 1'lik agaroz jelde yürütülmesiyle kontrol edilmiştir. Elektroforez sonrası jel görüntüsü, WiseUv görüntüleme sistemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA'lar, eppandorf tüplerinin ağzı parafilm ile kapatılarak +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

2.5. *Culex pipiens* Tür Kompleksinin Moleküler Olarak Belirlenmesi

Moleküler olarak *Culex pipiens* kompleks türlerinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem olan *ace-2* gen bölgesi seçilmiştir. Bu bölge korunumlu gen bölgesi olması (Alptekin, 2009), daha önce *Culex pipiens* kompleks türlerinin ayırımında kullanılması ve jel görüntüsünden dahi kompleks üyelerinin ayırımında fikir vermesi, (Smith ve Fonseca, 2004; Kasai vd. 2008), sekanslama sonucunda çok sayıda karşılaştırma metaryalinin bulunması nedeniyle kullanılmıştır (URL-5). Deneysel aşamalar Smith ve Fonseca (2004) Kasai vd. (2008) temel alınarak gerçekleştirilmiş ve bazı noktalarda küçük modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonundan sonra, türe özgü spesifik primerler kullanılarak

ACEquin 5'-CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3',

ACEpall 5'-ATGGTGGAGACGCATGACG-3',

ACEpip 5'-GGAAACAACGACGTATGTACT-3',
ACEtorr 5'-TGCCTGTGCTACCAGTGATGTT-3',
B1246s 5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGG-3')

multiplex PZR ile amplifikasyon yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3'te verilmiştir. Elde edilen karışım kullanılarak oluşturulan reaksiyon döngüsü ise 95 °C'de 5 dk, daha sonra 35 döngü olacak şekilde 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 57 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing), 72 °C'de 1 dk uzama (extension) gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri sonucunda elde edilmiş olan PZR ürünlerinin 4 µL 6X yükleme tamponuyla (% 50 gliserol, 0,1 M EDTA, % 1 SDS, % 0,1 bromfenol mavisi, ksilen siyanol) % 1,5'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu kullanılarak, 100 bazçiftlik DNA büyüklük belirteci ile birlikte elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez sonucunda kaynak baz uzunluklarına göre ayırım yapılmıştır. Standart baz uzunlukları ise Tablo 4'te verilmiştir. Bu ayırım işleminden sonra örnekler dizilenmek üzere muhafaza altına alınmıştır.

Yapılan amplifikasyon sonunda 600 bazçift civarı uzunluğunda bant oluşturan örnekler *Culex pipiens* olarak belirlenmiş ve biyotiplerinin belirlenmesi amacıyla ikinci PZR gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ise *Cx. pipiens* s.s., *Cx. pipiens* f. *molestus* birbirinden ayırmak için kullanılan en güvenilir yöntem olan mikrosatelit CQ11 bölgesindeki TG di-nükleotid tekrarlarının boylarının karşılaştırılması yöntemi kullanılmıştır (Bahnck vd., 2006). Biyotiplerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen PZR kullanılan primerler ise;

pipiens CQ11R 5' -CATGTTGAGCTTCGGTGAA-3',

molestus CQ11R 5' -CCCTCCAGTAAGGTATCAAC-3'

ileri CQ11F2 5 -GATCCTAGCAAGCGAGAAC-3' dir (Smith ve Fonseca, 2004). Amplifikasyon reaksiyon bileşenleri Tablo 5'te verilmiştir. Reaksiyon döngüsü ise 95°C'de 5 dk, daha sonra 35 döngü olacak şekilde 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 57 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing), 72°C'de 1 dk uzama (extension) şeklinde oluşturulmuştur. PZR döngüleri sonucunda elde edilmiş olan PZR ürünlerinin 4 µL 6X yükleme tamponuyla (% 50 gliserol, 0,1 M EDTA, % 1 SDS, % 0,1 bromfenol mavisi, ksilen siyanol) % 1,5'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu kullanılarak, 50 bazçiftlik DNA büyüklük belirteci ile birlikte elektroforezi yapılmıştır. Elde edilen bant büyüklüğüne göre ayırım yapılmış ve örnekler dizilenmek üzere muhafaza altına alınmıştır. 200 bç

civarında bant veren örnekler biotip pipiens 250 bç civarında bant veren örnekler biotip molestus olarak tanımlanmıştır.

Agaroz jel hazırlanırken Agaroz'dan 1,5 g'lık miktar, 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde kaynatılıp homojen halde çözülerek 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 3 µl etidyum bromür eklenip iyice karıştırılmış ve jel kabına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşma sonrasında tanka yerleştirilen jele her sırada en az bir DNA belirteci ve örnekler olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Yüklemelemlerde DNA belirteci 3 µl, örnekler ise 5 µl olacak şekilde yüklenmiştir. 80 voltta 30 dakika yürütülen örnekler transilluminatör yardımı ile görüntülenmiştir. Hangi örneklerin hangi tür olduğu kayıt altına alınıp elde edilen amplifikasyon örnekleri sekans aşamasına kadar saklanmak üzere -20 °C derin dondurucuya konulmuştur.

Elde edilen jel görüntüsüne göre kayıt altına alınan ve nonspesifik bağlanma gözlenmeyen örnekler tasnif edilerek dizileme hizmeti için hizmet alımı yapılan firmaya (Macrogen İnç, Güney Kore; Eres Biyoteknoloji Ankara) gönderilmiştir.

2.6. DNA Dizi Analizi

Elde edilen nükleotit dizilerinin kromatografi pikleri, MEGA 7 programı kullanılarak incelenmiş, incelenme sonucunda pikleri düzgün çıkmayan veriler çalışmada kullanılmamıştır. Diğer nükleotit dizilerinde ise düzgün olmayan kısımlar MEGA 7 programı yardımı ile kesilip atılmıştır. Moleküler çalışmalar sonucunda elde edilen veriler kendi içinde CLUSTAL W ile hizalanmıştır. Örnekler Genbank örnekleri ile karşılaştırılmış ve örneklerin türleri belirlenmeye çalışılmıştır. Benzerlik gösteren gruplar eklenerek UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ağacı çizilmiştir. Çizilen ağaçta veri setlerindeki farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Çizilen ağaçların güvenilirliğini test etmek amacıyla bootstrap değerleri 500 olarak seçilmiş ve Bootstrap değerleri incelenerek çizilen dendogramların güvenilir olduğu belirlenmiştir (Hall, 2013; Tamura vd., 2016).

Tablo 2. Çekirdek DNA'sı Ace-2 bölgesinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler.

Kullanılan PZR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
Buffer (10X)	3
MgCl ₂ (25 mM)	3
2.5 mM dNTP Mix	1,5
Primer geri ACEquin (20 µM)	1
Primer geri ACEpall (20 µM)	1
Primer geri ACEpip (20 µM)	1
Primer geri ACEtorr (20 µM)	1
Primer ileri B1246s (20 µM)	1
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	0,5
Kalıp DNA	5
DdH ₂ O (steril distile su)	7

Tablo 3. Kompleks türlerinin sınıflandırılmasında kullanılan baz uzunlukları.

TÜR	Bant büyüklüğü (bç)
<i>Culex pipiens</i>	610
<i>Culex pallens</i>	478
<i>Culex quinquefasciatus</i>	274
<i>Culex torrentium</i>	416

Tablo 4. Mikrosatellit DNA'sı CQ11 bölgesinin PCR ile amplifikasyonunda kullanılan bileşenler.

Kullanılan PZR reaksiyonu (25 µl)	Kullanılan miktar (µl)
Buffer (10X)	3
MgCl ₂ (25 mM)	3
2.5 mM dNTP Mix	1,5
Primer geri pipiens (20 µM)	1
Primer geri molestus (20 µM)	1
Primer ileri CQ11R (20 µM)	1
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	0,5
Kalıp DNA	5
DdH ₂ O (steril distile su)	9

3. BULGULAR

3.1. Alan Çalışmalarında Elde Edilen Bulgular

Arazi çalışmaları sonucunda 14 noktadan örneklem gerçekleştirilmiş olup toplanan örnekler klasik tür tayin anahtarı kullanılarak tanımlanmıştır. Alanda *Cx. pipiens* kompleks üyeleri dışında *Anopheles* ve *Culiseta* ve *Aedes* örneklerede rastlanılmıştır. Alanda ağırlıklı olarak *Anopheles maculipennis* kompleks üyeleri, *Anopheles plumbeus*, *Anopheles hyrcanus* kompleks üyeleri, *Culiseta longiareolata*, *Aedes caspius* örneklerine de rastlanılmıştır.

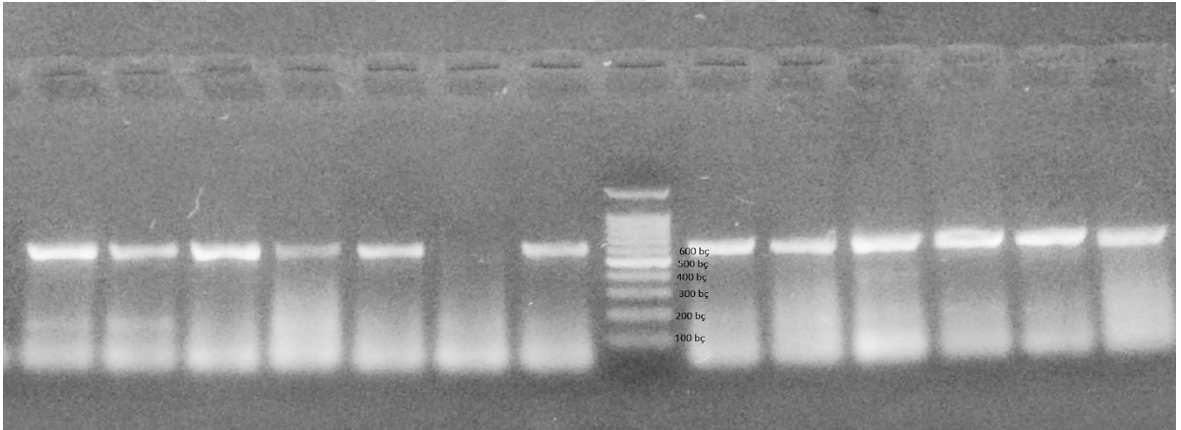
3.2. Moleküler Bulgular

Orta Karadeniz Bölgesi'nde gerçekleştirilen arazi çalışması sonucunda 14 noktadan alınan örneklerin tamamın DNA izalasyonu ve *Cx. pipiens* tür kompleksinin teşhisinde kullanılan multiplex PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri PZR ürünlerinin yaklaşık olarak 600 bç civarı baza sahip olduklarını göstermiştir. Elde edilen jel görüntülerini içeren örnek bir görüntü Şekil 3'te verilmiştir. Elde edilen jel görüntülerinin tamamı 600 bç civarı sonuç vermiş ve örneklerin *Cx. pipiens* olduğu *Cx. pipiens pallens*, *Cx. quinquefasciatus* olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca bu tür kompleksine en yakın tür olan ve teşhisinde ayrımı çok zor olan *Culex torrentium* örneklerine de rastlanılmamıştır. Tür belirleme işleminden sonra aynı örnekler ile varyetesinin belirlenmesi için ikincil aşama PZR gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ise elde edilen jel görüntüsünde 200 bç ve 250 bç'lik jel görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen görüntülere göre 200 bç'lik bant oluşturan örnekler *pipiens* 250 bç'lik bant oluşturan örnekler ise *molestus* olarak tasnif edilmiş ve dizilenmeye gönderilmiştir. Örnek jel görüntüsü ise Şekil 4'te verilmiştir.

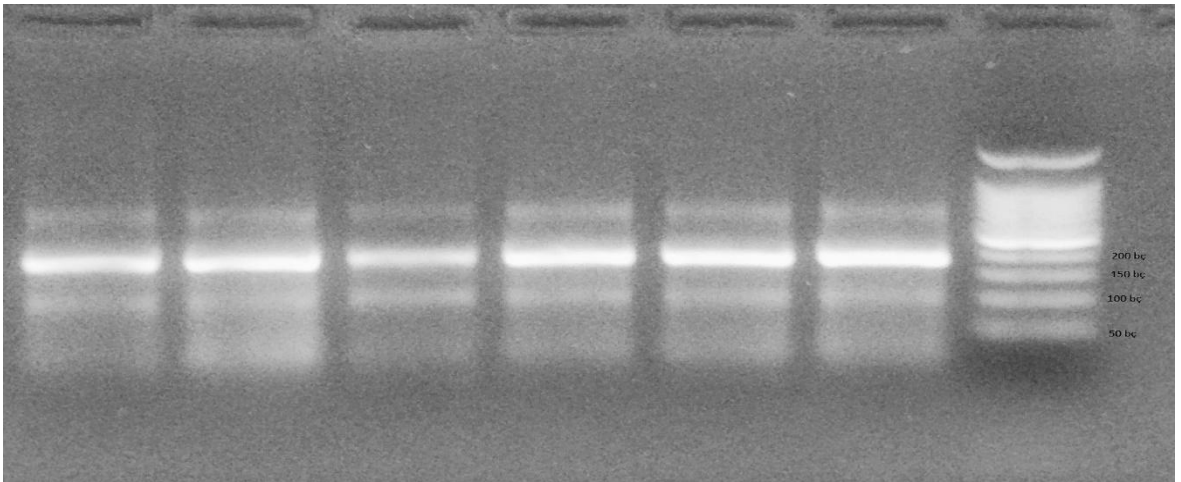
3.3. DNA Dizilerinden Elde Edilen Bulgular

Moleküler çalışmalar sonucunda elde edilen PZR ürünlerinin dna dizilerinden elde edilen veriler teker teker Genbankası örnekleri ile karşılaştırılmış olup elde edilen örneklerin Genbank'tan alınan FJ948081.1 *Cx. pipiens* örneği ile yüksek oranda

örtüştüğü belirlenmiştir. Ayrıca örnekler MEGA 7 programı kullanılarak çoklu hizalama yapıldıktan sonra kendi aralarındaki farklılığı tespit etmek maksadıyla UPGMA ağacı çizilmiştir (Şekil 5). Çizilen ağaca göre örnekler arasında kayda değer bir farklılığın olmadığı gözlemlenmiştir. Örnekler arasındaki farklılığa neden mutasyon noktaları ve değişim noktaları Tablo 5’de verilmiştir. Tablo 5 oluşturulurken Genbanktan alınan FJ948081.1 Genbank numaralı örneğin 1. nükleotiti başlangıç var sayılarak mutasyon noktaları belirlenmiş olup, bölgelerde farklılık olup olmadığına bu örnek referans alınarak karar verilmiştir. Elde edilen verilere göre 9, 97, 128, 138, 223, 259, 266 ve 386 nolu baz noktalarında çeşitli tipte mutasyonların var olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 97 ve 138 nolu nokatalarda gözlenen mutasyonların frekansının yüksek olduğu, diğer nokatalardaki mutasyonların frekansının düşük olduğu belirlenmiştir.



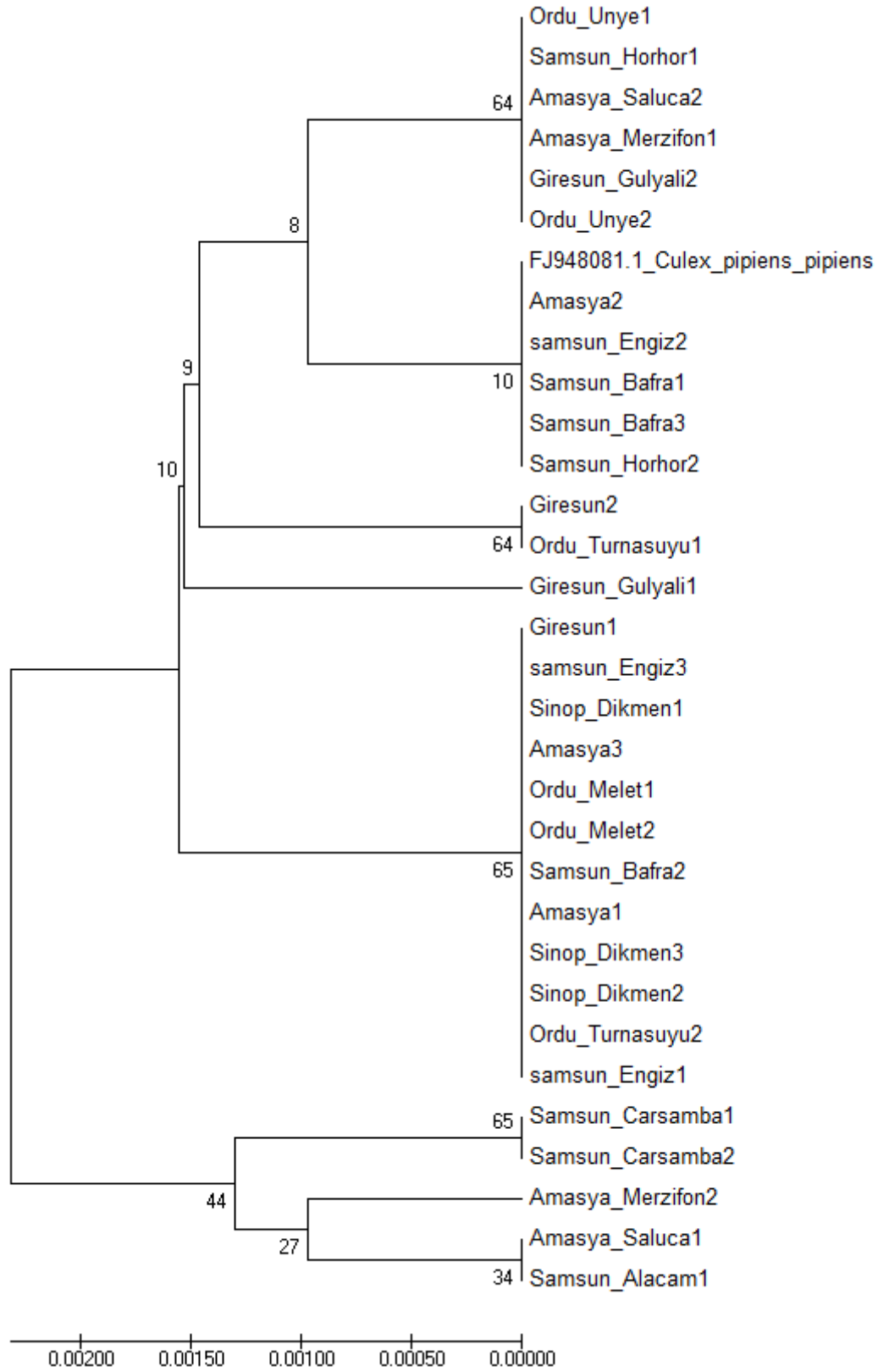
Şekil 3. Ace2 bölgesi PZR jel görüntüsü.



Şekil 4. CQ11 gen bölgesi PZR jel görüntüsü.

Tablo 5. Ace-2 bölgesinde farklılıklara sebep olan noktalar ve mutasyon şekilleri.

Mutasyon Noktası	Gözlenen	Beklenen	Mutasyon Şekli	Bölge adı
9	G	C	TRANSVERSİYON	S. CARSAMBA 2 S. CARSAMBA1 SAMSUN ALAÇAM SAMSUN ALAÇAM 1 SAMSUN ALAÇAM3 GİRESUN 1 ORDU MELET1 ORDU MELET 2
97	T	G	TRANSVERSİYON	ORDUTURNASUYU2 SAMSUN BAFRA2 SİNOP DİKMEN1 SİNOP DİKMEN2 SİNOP DİKMEN3 SAMSUN ENGİZ 3
128	T	C	TRANSİSYON	S. ÇARŞAMBA 1 S. ÇARŞAMBA 2
138	M	C	HETEROZİGOT	AMASYAMERZİFON1 AMASYAMERZİFON2 ORDU ÜNYE1 ORDU ÜNYE2 SAMSUN HORHOR 1
138	A	C	TRANSVERSİYON	AMASYA SALUCA
223	C	A	TRANSVERSİYON	AMASYA SALUCA
259	G	C	TRANSVERSİYON	GİRESUN2 ORDUTURNASUYU1
266	K	T	HETEROZİGOT	ORDU ÜNYE 1 ORDU ÜNYE 2 SAMSUN HORHOR1 SAMSUN HORHOR 2
386	T	G	TRANSVERSİYON	ORDU GÜLYALI1

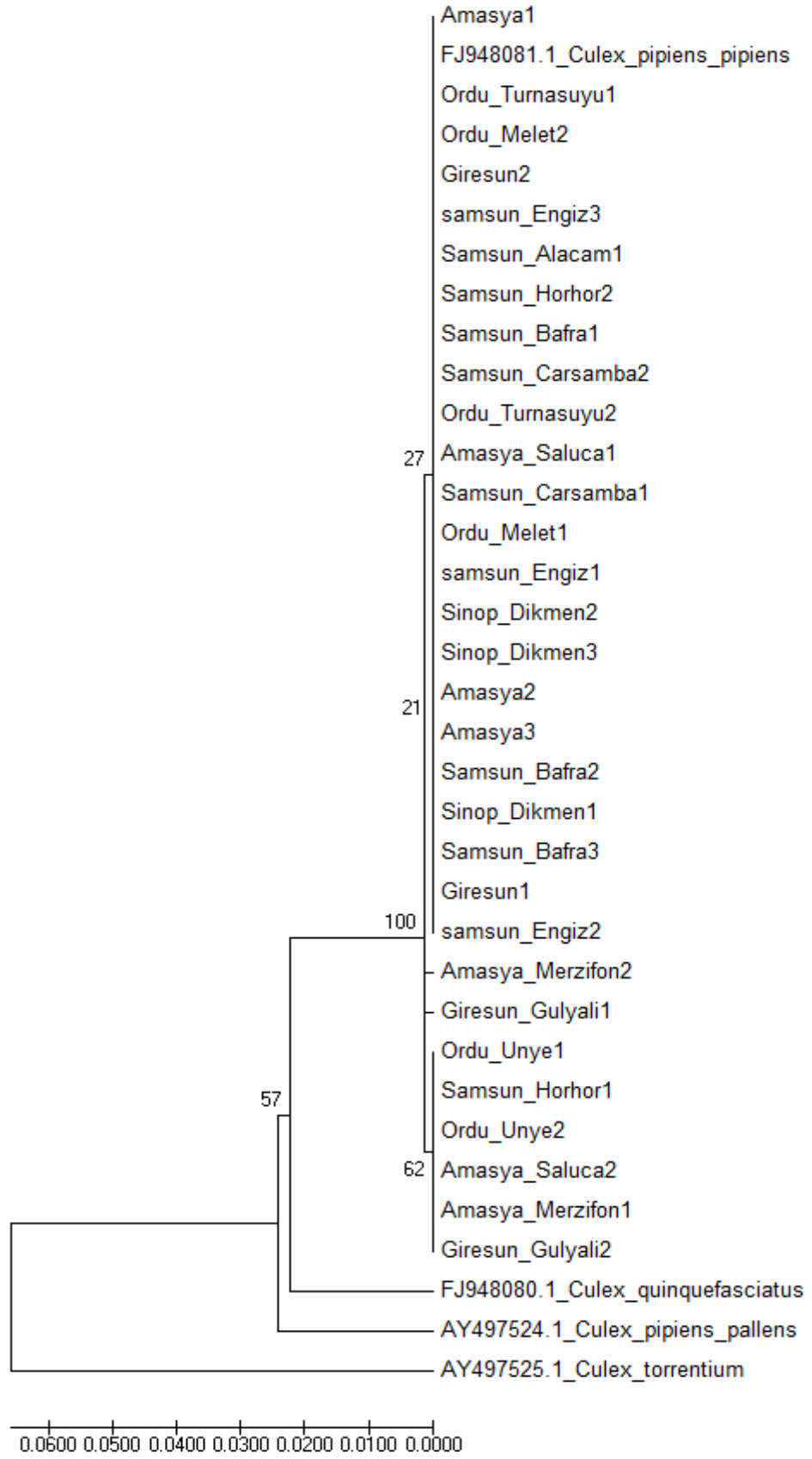


Şekil 5. *Ace-2* gen bölgesinin kendi aralarında hizalanması sonucunda çizilen UPGMA filogenetik ağacı.

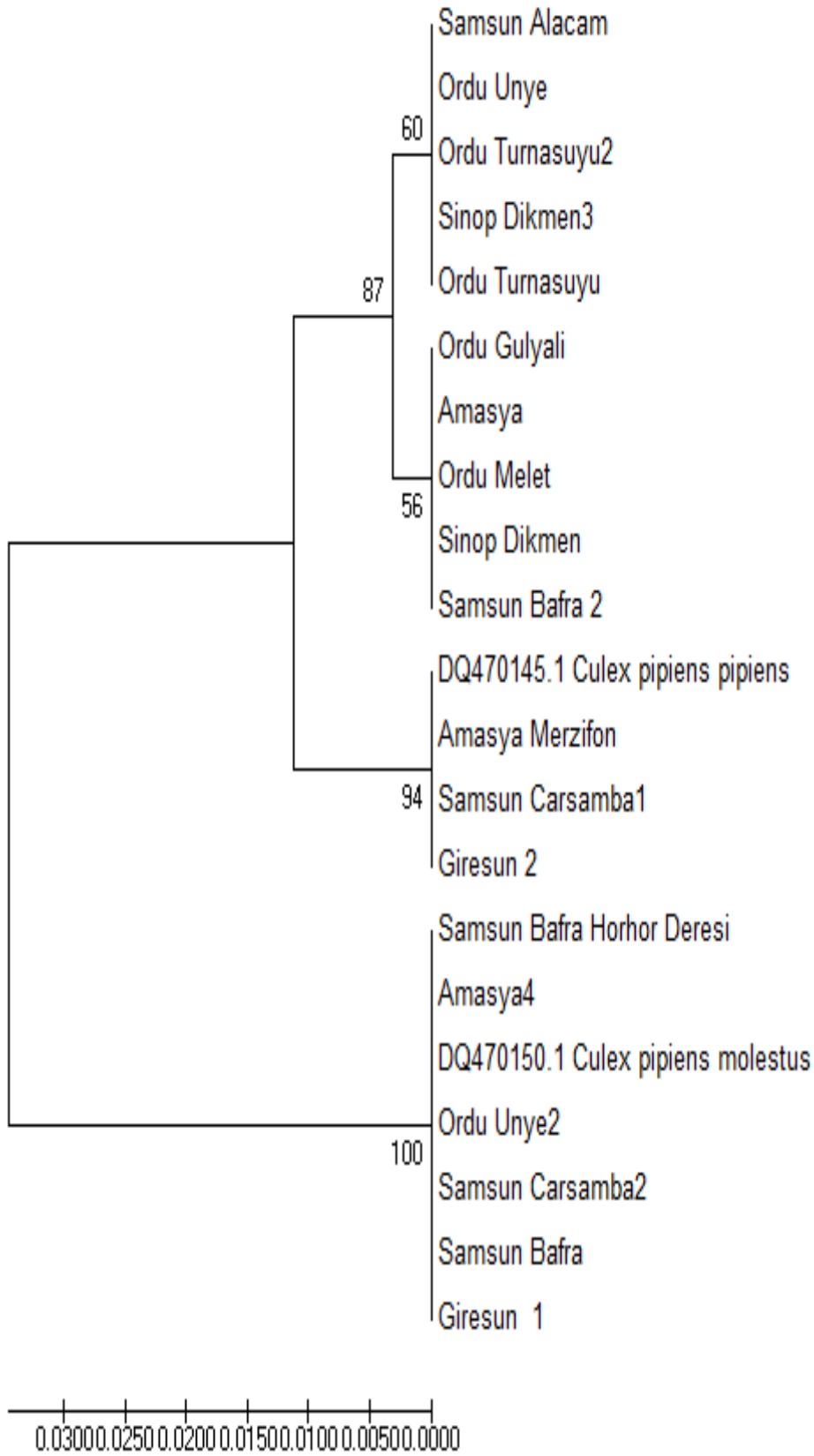
Elde edilen ağaca göre örneklerin üç büyük küme oluşturduğu ve bu kümelerden iki tanesinin de kendi içerisinde dallanmalar yaptığı belirlenmiştir. Ancak iki kümenin kendi arasındaki uzaklığı 0,0015 seviyesinde ve diğer kümenin uzaklığı ise bu kümelerden 0,002 seviyesinde uzak olduğu gözlenmiştir.

Kendi aralarında değerlendirilen DNA dizilerine, FJ948081.1 Genbank numaralı *Culex pipiens* örneğine ek olarak AY497525.1 Genbank numaralı *Culex torrentium* örneği, FJ948080.1 Genbank numaralı *Culex quinquefasciatus*, AY497524.1 Genbank numaralı *Culex pipiens pallens* örnekleri eklenerek yeni bir ağaç oluşturulmuştur (Şekil 6). Çizilen ağaçta çalışmamız sunucu elde edilen örneklerin Genbanktan alınan FJ948081.1 Genbank numaralı örnekle yüksek oranda örtüştüğü ve iki klad oluşturdukları gözlenmiştir. Genbanktan alınan *Culex pipiens pallens*, *Culex quinquefasciatus* ve *Culex torrentium* örneklerinin ise ayrı ayrı kollar oluşturduğu gözlenmiştir. Sırasıyla *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens pallens*'in örneklerimize en yakın *Culex torrentium*'un ise en uzak grup olduğu görülmüştür.

Alanda toplanan *Culex pipiens* türüne ait örneklerin varyetesinin belirlenmesi amacıyla elde edilen amplikonların dizilenmesi sonucunda elde edilen veriler MEGA 7 programı kullanılarak düzenlenmiştir. Elde edilen dizilere Genbank örneklerinin dizileri eklenerek UPGMA ağacı çizilmiştir (Şekil 7). Çizilen ağaçta iki farklı dal olup Samsun Horhor deresi, Giresun, Samsun Çarşamba, Amasya, Bafra Samsun, Ordu Ünye noktalarından alınan örneklerin Genbanktan alınan *Culex pipiens molestus* varyetesinin bulunduğu dalda yer aldığı görülmüştür. Samsun Çarşamba, Giresun, Amasya Merzifon örneklerinin ise Genbanktan alınan *Culex pipiens pipiens* varyetesi ile yüksek oranda benzediği görülmüştür. Diğer örnekler ise kendi aralarında ayrılarak farklı iki grup oluştursalar da *Culex pipiens pipiens* varyetesine daha yakın bulunmuş ve her iki varyete arasındaki uzaklık % 3'ten biraz fazla oranda gözlenmiştir.



Şekil 6. Ace-2 gen bölgesine dış grup eklenerek çizilen UPGMA ağacı.



Şekil 7. Elde edilen CQ11 gen bölgesi kullanılarak elde edilen UPGMA ağacı.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılan, Batı Nil virüsü, Chikingunya, Rift Vadisi ateşi, Sindbis, Kunjin gibi virüslerin insanlara bulaştırılmasında vektörlük yapan *Cx. pipiens* kompleks türlerinde sistematik anlamda ilk çalışma olan bu tez çalışması sonucunda alanda kompleks üyelerinden iki tanesinin yerleşik olduğu belirlenmiştir. Elde edilen UPGMA ağacı alanın genelinde var olan kompleks üyesinin *Cx. pipiens* olduğunu göstermiş ve varyete analizleri neticesinde ise hem pipiens hem molestus varyetelerinin alanda yer aldığı belirlenmiştir. *Ace-2* bölgesi verilerine göre çizilen ilk ağaca göre bölge örnekleri 3 ana dala ayrılmış ve bu dallarda kendi içerisinde sadece ikinci grup hariç dallanmalar göstermiştir. Ayrılan bu dallar arasındaki farklılık ise çok az olduğu ve dallar arasındaki farklılığın anlamsız olduğu görülmüştür (Excoffier & Lischer, 2010). Kompleks üyelerinden *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens pallens* ve komplekse en yakın tür olan *Cx. torrentium* eklenerek oluşturulan ağaçta ise Samsun Çarşamba'dan her iki örnek, Ordu Gülyalından bir örnek, Amasya Merzifondan bir örnek, Giresun-Ordu Turnasuyundan birer örnek ayrı dallar oluştururken, diğer tüm örnekler tek bir grup oluşturmuştur. En yakın grup olarak ise *Cx. quinquefasciatus* Genbank örneği gözlenmiştir. Günay (2015) yaptığı çalışmada elde edilen COI bölgeleri dizileri ile yaptığı analizlerde farklı bir bölge çoğaltmış olmasına rağmen çalışmamıza benzer olarak en yakın olarak *Cx. quinquefasciatus*'a yakın olduğunu göstermiştir.

Alan içerisinde ikiz tür olarak belirtilen ve morfolojik ayrımı çok zor olan *Cx. torrentium* örneğine rastlanmamıştır. Ancak bu çalışmada içerisinde yer aldığı TÜBİTAK destekli proje kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Cx. torrentium* örneklerine rastlanmış ve moleküler olarak doğrulanmıştır (TÜBİTAK 113Z795 nolu proje verileri). Bu tür kompleksi paleartik coğrafyada 4 (*Culex pipiens s.s.*, *Cx. pipiens pallens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens f molestus*) tür okyanusya türleri ile 6 türden (*Cx. australicus*, *Cx. globosus*) (Harbach ve Kitching, 1998) oluşmakta olup ülkemiz bu türlerden 3 tanesinin ve ikiz türü olan *Cx. torrentium* ile 4 tür olarak görülmektedir. Çalışma bölgemizde ise sadece iki türün bulunduğu belirlenmiş ve son dönemde varlığı doğrulanan *Cx. quinquefasciatus*'unda (Günay 2015) alanda bulunmadığı doğrulanmıştır.

Çalışmamız içerisinde yer alan iki formun belirlenmesi çalışmalarında Amasya, Bafra, Giresun, Çarşamba, Ordu Ünye bölgelerinde her iki varyetende olduğu belirlenmiştir. Özellikle şehir merkezlerinde mücadele çalışmalarının odağında yer alan bu tür kompleksinin varyetelerinden bir olan *Cx. pipiens f molestus* türü kan emmeden bile yumurta bırakabilme özellikleri nedeniyle (otogeni) ve aşırı antropofilik davranışı nedeniyle önemlidir (Merdivenci, 1984; Günay 2015; Demirpolat, 2016). Kışı geçirmek amaçlı tercih ettikleri alanlar diyapoza girmeyen bu türde, binaların içleri bodrum katları ve su basmanların bulunduğu alanlar olup sıcaklığın artışıyla beraber hareketlenmeleri ile alanlarda en yoğun bulunan tür olma özelliğine sahiptir (Günay 2015). *Culex pipiens f pipiens* türü dişileri ilk yumurtayı bırakmak için kan emmeye ihtiyaç duyarken ve bunun yanında pipiens varyetesi kışın diapoza girerken yaşam alanı olarak sıcak ve yer üstü habitatları seçerler. Çalışma alanının coğrafi ve iklimsel konumu göze alındığında Amasya, Giresun ve Ordu illerinin dağların paralel olarak uzanması ve dağların eğiminin fazla olması sebebiyle denize yakın bölgelerde ılıman bir hava hakimken yükseklerle doğru yapılan kısa bir mesafede sıcaklık aniden soğumaya başlar (Merdivenci 1984). Bu da aynı bölgede yakın mesafede farklı türlerin bulunmasına olanak sağlar. Bu iki biyotipin ekolojik isteklerine bakıldığında bu iki biyotipin bu alanlarda birlikte olması ile alanın bu özelliği açıklanabilir. Bafra ve Çarşamba bölgelerinde alanın düzlük şekilde olması nedeniyle bu alanlarda ani iklimsel farklılıkla açıklamak mümkün değildir. Bu alanlarda iki biyotipin aynı anda bu bölgede bulunmasının şüphesiz ki bölgenin Amasya ve Ordu bölgelerinde bu iki biyotipin de var olması ve bu bölgenin bu bölgeler arasında kalmasından dolayı bu biyotiplerin bir arada bulunmasını açıklamaktadır. Bunun yanında bu iki biyotipin çiftleşerek hibrit bireyler oluşturabildikleri bilinmektedir. Alanda bu iki biyotipin aynı anda bulunması alanda hibrit bireylerinde olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Fakat çalışmamız esnasında hibrit bireylere rastlanılmamıştır. Hibritlerin bulunmamış olması bu bireylerin olmadığı manasını taşımamaktadır. Zira aralarında bu iki biyotip üyeleri birbiri arasında çiftleşmekten kaçınır (URL-6). Bu da alanda hibrit bireylerin frekansının çok düşük olması manasına gelmektedir. Bu çalışmanın konusunu içermese de her iki varyetende var olduğu bölgelerde daha detaylı çalışmaların yapılarak hibrit varlığının doğrulanması vektöriyel anlamda rekabetçi olan hibrit bireylerin belirlenerek ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Gomes ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada hibrit bireylerin Batı Nil virüsünün rastlantısal olarak insanlara taşınımını güçlendirebileceğini belirtmişlerdir.

Bu nedenle hem varyetelerin belirlenmesi hem de hibrit varlığının doğrulanması önemlidir. Ayrıca Samsun Bafra Horhor deresi üzerinde bulunan köprünün altından alınan örneklerde sadece molestus örneklerinin var olduğu bulunmuştur. Molestusun alan tercihi göz önüne alındığında böyle bir alanda molestusun bulunması gayet doğal bir durumdur. Çalışma alanındaki diğer bölgelerde ise sadece pipiens biyotipinin bulunduğu görülmüştür. Her ne kadar bu bölgelerde molestus örneklerinin varlığı tespit edilemese de özellikle Samsun il sınırları içerisindeki çalışma alanlarında molestus varlığı muhtemel bir durumdur. Elde edilen örneklem noktalarında toplanan örneklerin CQ11 bölgesinin sekansı ile elde edilen verilerle çizilen ağaçta pipiens örneklerinin üç farklı klad oluşturduğu görülmüştür. Oluşan bu kladlara arasındaki uzaklık çok küçük olsa da aynı bölgeye ait örneklerin farklı kladlara çıkması açısından çok ilginç olsada günümüz şartlarında ulaşımın bu denli artması şüphesiz ki bu canlılarında yayılımına etki etmiş olmalı ki bir bölgedeki mutasyonel farklılık diğer bölgeye de geçiş yapmış olabilsin.

Yapılmış olan bu tez çalışması Orta Karadeniz Bölgesi'nde bu tür kompleksinin üyelerini ortaya çıkarmanın yanısıra, potansiyel vektör-konak-patojen üçgeninde önemli bölgeleri içermesi nedeniyle önemlidir. Özellikle son dönemde tüm dünyayı etkileyen salgınlara neden olan Zika, Batı Nil virüsü gibi insan sağlığını tehdit eden vektörel kökenli hastalıkların epidemiyolojilerinin anlaşılması, taşınım zincirinde bu vektör tür kompleksinin yer aldığı noktaların belirlenmesi ve buna göre mücadele çalışmalarına ışık tutması anlamında önemli veriler sağlamıştır.

5. ÖNERİLER

Orta Karadeniz Bölgesi'nde yapılan bu çalışmada Giresun, Ordu, Samsun ve Amasya illerinde ülkemizde kozmopolit bir tür olan *Culex pipiens* kompleks üyelerinin varlığı ve bu türleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda alanda bu komplekse ait olan türlerden sadece *Culex pipiens*'in varlığı belirlenmiş ve bu türün her iki biyotipi olan *pipiens* ve *molestus* türlerinin varlığı alanda bulunmuştur. Alanda aynı canlı türüne ait biyotiplerin bulunması bu alanda bulunabilecek hibrit türlerin kapsamlı bir şekilde araştırılmalı ve ayrıca bu komplekse ait olan diğer türlerinde bu alanda varlığı belirlenmesi bölgede oluşabilecek vektörel kaynaklı bir hastalıkların öngörülmesinde ve hastalıkla mücadelede faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Alptekin, S., 2009.** İnektisitlere Dirençli *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) Popülasyonlarında Asetilkolinesteraz Geni ve Sodyum Kanalı Geninde Meydana Gelen Mutasyonların İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 38 s.
- Alten, B. ve Çağlar, S.S., 1998.** Vektör Ekolojisi ve Kontrolü. I. Sıtma Vektörünün BiyoeKOlojisi, Mücadele Organizasyonu ve Yöntemleri, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü Yayınları, Bizim Büro Basımevi, 240 s., 3-47.
- Aldemir, A., Boşgelmez, A. ve Çıngı, H., 2002.** Gölbaşı sivrisinekleri, Bizim Büro Basımevi, Ankara, ISBN:975-96377-3-1, 256 s., 51-80.
- Bahnck, C.M. and Fonseca, D.M., 2006.** Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 75, 2, 251-5.
- Bedir, H., Kuçlu, Ö., Erdem, F., Demirci, B. ve Aldemir, A., 2011.** Türkiye İçin Altı Yeni Sivrisinek Kaydı. In: 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu, Kars, Türkiye, 161 s.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M. and Kaiser, A., 2010.** Mosquitoes and Their Control, 2nd Edition. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, ISBN: 0-306-47360-7, 498 s., 9-309.
- Campbell, N.A. and Reece, J.B., 2006.** Biyoloji. Yayın no:381, 6. Baskı, ISBN: 975-8982-85-0 (E. Gündüz, A. Demirsoy, İ. Türkan, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 1209 s., 1099-1220.
- Carolyn, M., Bahnck, M. and Fonseca, D.M., 2006.** Rapid Assay to Identify the Two Genetic Forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and Hybrid Populations. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 75(2), 251-255
- Darsie, R.F. and Samanidou-Voyadjoglou, A., 1997.** Keys for the identification of the mosquitoes of Greece. Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News, 13(3), 247-254.
- Demirpolat, G., 2016.** Kayseri Yöresinde *Culex pipiens* Biyotipleri ve *Culex torrentium*'un Real Time PCR ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri. 72 s.
- Du Bose, W.P. and Curtin, T.J., 1965.** Identification keys to the adult and larval mosquitoes of the Mediterranean area. Journal of medical entomology, 1(4), 349-355.

- Excoffier, L. and Lischer, H.E., 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Evered, K.T. and Evered, E.Ö., 2011.** Governing population, public health, and malaria in the early Turkish republic. *Journal of Historical Geography*, 37, 470-482.
- Gomes, B., Kioulos, E., Papa, A., Almeida, A.P., Vontas, J. and Pinto, J., 2013.** Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection, Genetics and Evolution*, 16:218-225. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.006.
- Gubler, D.J., 2002.** The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems, *Archives of Medical Research*, 33(4): 330–342.
- Günay, F., 2015.** Türkiye Sivrisinek Faunası Üzerine DNA Barkodlama Yöntemiyle Moleküler Analizler. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, s;120.
- Hall, T.A., 2013.** About Bioedit version 7.2.5, Ibis Biosciences, Carlsbad.
- Harbach, R. and Kitching, I., 1998.** Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera), *Systematic Entomology*, 327–370.
- Harbach, R.E. and Kitching, I.J., 2005.** Reconsideration of Anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data, *Systematics and Biodiversity*, 3, 345–374.
- Halepli, H. ve Yılmaz, B., 2013.** Rize ve Malatya İllerinde Dağılım Gösteren *Culex pipiens* Populasyonlarının Karşılaştırılması. Lisans Bitirme Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize. 31 s.
- Hinckley, A.F., O'Leary, D.R. and Hayes, E.B., 2007.** Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*, 119(3), e666-e671.
- Jupp, P.G., McIntosh, B.M., Dos Santos, I. and Moor, P., 1981.** Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75:15–19.
- Kalaycioglu, H., Korukluoglu, G., Özkul, A., Öncül, O., Tosun, S. and Karabay, O., 2012.** Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, May 24; 17 (21).
- Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawabe, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H. and Yoshida, M., 2008.** PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 61(3), 184.

- Kuclu, Ö., 2015.** Aras Havzası ve Kars Platosu Sivrisineklerinde Batı Nil Virüsü Varlığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, 126 s.
- Merdivenci, A., 1984.** Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda Varlığı Bilinen Sivrisineklerin Biyo-Morfolojisi, Biyo-Ekolojisi, Yayılışı ve Sağlık Önemleri), İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, Yayın No: 3215-3136.
- Molaei, G., Andreadis, T.G., Armstrong, P.M., Bueno, R., Dennett, J.A., Real, S.V., Sargent, C., Bala, A., Randle, Y. and Guzman, H., 2007.** Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 77:73–81.
- Muslu, H., Kurt, Ö. ve Özbilgin, A., 2011.** Manisa İl ve İlçelerinde Saptanan Sivrisinek Türlerinin (Diptera: Culicidae) Yaşam Alanları ve Mevsimsel Değişikliklere Göre Değerlendirilmesi. Türkiye Parazitolojisi Dergisi. 2011; 35: 100-4.
- Öktem, N. ve Göçmen, B., 2014.** Genel parazitoloji uygulama kitabı. Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, Bornova , Ege Üniversitesi Basım Evi seri no:161,186 s., 149-158.
- Önder, F., 1998.** Taksonomi İlkeleri Ders Kitabı. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No 530, 203 s., 1-18.
- Özcel, M. ve Daldal, N., 1997.** Parazitolojide Artropod hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği yayın no:13. ISBN 975-483-376-1, İzmir, Türkiye, 526 s., 1-46.
- Parrish, D.W., 1959.** The mosquitoes of Turkey. Mosquito News, 19, 264–266.
- Pealer, L.N., Marfin, A.A., Petersen, L.R., Lanciotti, R.S., Page, P.L., Stramer, S.L. and Goodman, J.L., 2003.** Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. New England Journal of Medicine, 349(13), 1236-1245.
- Schaffner, E., Guy, A., Bernard, G., Jean-Paul, H., Rhaïem, A. and Jacques, B., 2001.** Les moustiques d'Europe : logiciel d'identification et d'enseignement = The mosquitoes of Europe : an identification and training programme. Paris (FRA) ; Montpellier : IRD ; EID, 1 CD ROM (Didactiques). ISBN 2-7099-1485-9.
- Service, M., 2008.** Medical Entomology for Students, Cambridge University Press, Fourth edition.
- Smith, J.L. and Fonseca, D.M. 2004.** Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). The American journal of tropical medicine and hygiene, 70(4), 339-345.

- Sevgili, E. and Şimşek, F.M., 2012.** Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. North-Western Journal of Zoology, 8: 223–231.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 1993-2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. 7.0.14 version.
- URL-1, 2017.** <http://www.mdjunction.com/forums/agoraphobia-discussions/lounge/1804444-stupid-mosquitoes> (30.07.2017).
- URL-2, 2017.** <http://www.seyahatsagligi.gov.tr> (28.Temmuz.2017).
- URL-3, 2017.** https://tr.wikipedia.org/wiki/Fil_hastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1 (25.Mayıs.2017).
- URL-4, 2017.** <http://bugguide.net/node/view/35524> (01.Nisan.2017).
- URL-5, 2017.** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (30.Temmuz.2017).
- URL-6, 2017.** <http://www.evrimianlamak.org> (05.Haziran.2017).
- Uyar, Y. ve Akçalı, A., 2006.,** Biyolojik Silah Olarak Viral Ajanlar. Türk Hijyen Biyoloji Dergisi, Türkiye, Cilt 63, No 1,2,3 s. 67-78.
- Yazıcı, Z., 2004.** Batı Nil Virusü İnfeksiyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Turkish Journal of Infection, 19 (1): 139-143, Türkiye.
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Xing, D., Dong, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Liu, M., Zheng Z., Zhang, H., Zhu, X., Wu, Z. and Zhao, T., 2012.** Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. Plos One, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047051>.
- WHO, 1975.** Instructions For The Determining The Susceptibility of Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides, Mimeographed document WHO/VBC/75 583.

ÖZGEÇMİŞ

Yaman IŞIK 1983 yılında Adana’da dünyaya geldi. İlköğretim, ortaokulu ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra Yüksek Öğrenimini İstanbul Fatih Üniversitesi’nde okudu ve 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında Bilecik İl Özel İdaresi, 2012 yılında da Rize İl Özel İdaresi’nde çalışmaya başladı ve aynı zamanda Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. 31 Aralık 2012 yılından itibaren Tarım Bakanlığı’na bağlı, Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumunda görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babası olup C seviyesinde İngilizce bilmektedir.

