

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

İZMİR YÖRESİNDE *CULICOIDES* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
HAEMOSPORIDIA ENFEKSİYONLARI YÖNÜNDEN
VEKTÖRLÜK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Hakan YEŞİLÖZ

Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Doktora Tezi

Ağustos 2017
KAYSERİ

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

**İZMİR YÖRESİNDE *CULICOIDES* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE
HAEMOSPORIDIA ENFEKSİYONLARI YÖNÜNDEN
VEKTÖRLÜK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Hakan YEŞİLÖZ**

**Danışman
Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2016-6397 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Hakan YEŞİLÖZ

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“İzmir Yöresinde *Culicoides* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Haemosporidia Enfeksiyonları Yönünden Vektörlük Potansiyellerinin Araştırılması”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Hakan YEŞİLÖZ

Danışman

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM danışmanlığında **Hakan YEŞİLÖZ** tarafından hazırlanan “**İzmir Yöresinde *Culicoides* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Haemosporidia Enfeksiyonları Yönünden Vektörlük Potansiyellerinin Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

23/08/2017

JÜRİ :**İmza**

Danışman : Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye : Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY (Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye : Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nermin IŞIK (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Konya)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocam Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye, laboratuvar çalışmalarında ve tez çalışması süresince her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Yrd. Doç. Dr. Zuhâl ÖNDER ve Araş. Gör. Dr. Arif ÇİLOĞLU'na, saha çalışmaları, laboratuvar çalışmaları ve tez çalışması boyunca verdikleri her türlü destekten ötürü İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Parazitoloji Bölüm Şefi Dr. Ayşen BEYAZIT ve Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Parazitoloji Bölüm Şefi Doç.Dr. Ahmet DENİZ' e ve çalışma süresince malzeme bazında TDK-2016-6397 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakarlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan eşim Ümmühan YEŞİLÖZ' e teşekkür ederim.

**İZMİR YÖRESİNDE *CULICOIDES* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE HAEMOSPORIDIA ENFEKSİYONLARI
YÖNÜNDE Vektörlük POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hakan YEŞİLÖZ

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ağustos 2017
Danışman: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ÖZET

Bu çalışmada İzmir ilinin farklı ilçelerine bağlı bazı odaklarda yaygınlık gösteren *Culicoides* türlerinin konvansiyonel morfolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi, izolatların moleküler karakterizasyonlarının yapılması ve kanatlı Haemosporidian parazitlerin nakli açısından vektör potansiyellerinin moleküler olarak ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 2016 yılının Mayıs-Ağustos ayları arasında Bergama, Ödemiş, Kemalpaşa ve Foça ilçelerinde belirlenen istasyonlardan ışık tuzakları ile *Culicoides* örnekleme yapılmıştır. Toplanan *Culicoides* örneklerinin kanat morfolojilerine göre identifikasyonları yapıldıktan sonra her türden belirlenen örneklerden genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA izolatlarının barkod mt-COI gen bölgesi amplifiye edilmiş ve sonraki basamakta amplifikasyon ürünlerinin klonlama, plazmid pürifikasyonu ve sekans analizleri gerçekleştirilerek moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır. GenBank aksesyonları sağlanan izolatların Türkiye ve Dünyadaki homolog izolatlarla filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. Toplanan örneklerde Haemosporidian parazitlerin araştırılması amacıyla her türe ait dişi *Culicoides* örneklerinin baş/toraks (BTH) ve abdomen (AH) kısımları diseke edilerek tür ve toplama merkezi bazında ayrı ayrı havuzlar oluşturulmuştur. Havuzlardan gDNA ekstraksiyonundan sonra elde edilen izolatların Haemosporidian mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle nested PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. BTH'da belirlenen pozitiflikler muhtemel potansiyel vektörlük göstergesi olarak kabul edilmiş ve minimum enfeksiyon oranları (MIRs) hesaplanmıştır. BTH ve AH'de belirlenen Haemosporidian nesillerinin sekans analizleri ile karakterizasyonları yapılmıştır. Araştırmada toplanan 800 dişi *Culicoides* örneğinin morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre *C. circumscriptus*, *C. nubeculosus* kompleks, *C. newsteadi*, *C. imicola*, *C. gejjelensis*, *C. obsoletus*, *C. punctatus* ve *Culicoides* sp.

(*C. truncorum*'a yakın) türlerine ait oldukları belirlenmiştir. En yaygın türler %39,4 ile *C. circumscriptus* ve %33,8 ile *C. imicola* belirlenirken en düşük yayılışı gösteren türler ise %1,9 ile *C. punctatus* ve %1,8 ile *C. newsteadi* bulunmuştur. Araştırma yöresinde belirlenen türlere ait mt-COI sekansları arasında 18 farklı haplotipi ortaya koyan 175 polimorfik bölge saptanmıştır. Filogenetik analizler *C. newsteadi* dışında tüm türlere ait nesillerin monofiletik karakterde olduğunu göstermiştir. Karakterize edilen türlere ait haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $25,3 \pm 2,4$ saptanmıştır. Çalışmada belirlenen haplotiplerin Türkiye ve Dünya'dan bildirilmiş homolog izolatlarla filogenetik yapılanmaları ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada incelenen AH'dan *C. circumscriptus*, *C. imicola*, *C. obsoletus* ve *C. gejjelensis*'de Haemosporidian mt-cytb DNA'sı belirlenirken (%10,22), BTH pozitiflikleri (%7,95) yalnızca *C. circumscriptus*'ta tespit edilmiştir. *C. circumscriptus* için *Haemoproteus* nesilleriyle MIRs %22,2 olarak hesaplanmıştır. İlgili *Culicoides* türlerinde belirlenen Haemosporidian parazitlerin sekans analizleri sonucunda *C. circumscriptus* BTH izolatlarında *Haemoproteus* sp. GAGLA05 ve *H. minutus* TURDUS2 nesilleri karakterize edilmiş ve bu türün araştırma yöresinde ilgili nesillere muhtemelen potansiyel vektörlük yaptığı ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada ayrıca *C. circumscriptus* AH'da *Plasmodium* sp. CXPIP10, *C. obsoletus* AH'da *Plasmodium* sp. CXPIP23 ve SYCON02, *C. imicola*, *C. obsoletus* ve *C. gejjelensis* AH'da *P. relictum* SGS1 ve *C. imicola* ve *C. gejjelensis* AH'da da *Plasmodium* sp. YWT4 nesilleri tanımlanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma ile İzmir yöresinde yaygınlık gösteren *Culicoides* türleri morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla belirlenerek moleküler epidemiyoloji açısından Türkiye için özgün veriler sağlanmıştır. Ayrıca çalışma sonuçları kanatlı Haemosporidian parazitlerin İzmir yöresinde yaygın olduğunu ortaya çıkarmış ve *C. circumscriptus*'un *Haemoproteus* nesillerinin nakli açısından potansiyel bir öneme sahip olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: *Culicoides*, Moleküler karakterizasyon, Kanatlı Haemosporidianları, Vektör potansiyeli, İzmir

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *CULICOIDES* SPECIES IN IZMIR VICINITY AND INVESTIGATION OF THEIR VECTOR POTENTIAL FOR HAEMOSPORIDIA INFECTIONS

Hakan YESILOZ

**Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinary Parasitology
PhD Thesis, August 2017
Supervisor: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM**

ABSTRACT

In this study it was aimed to determine the *Culicoides* species widespread in the centers belonging to different districts of İzmir by conventional morphologic and molecular techniques, to perform molecular characterization of the isolates and to reveal their vector potential by molecular tools regarding to transmission of avian Haemosporidian parasites. Between May-August 2016 *Culicoides* samplings were performed via light traps from previously determined stations in Bergama, Ödemiş, Kemalpaşa and Foça districts in the study. After the identification of *Culicoides* species by wing morphology genomic DNA (gDNA) isolations were performed on the determined specimens from each species. The barcode mt-COI gene region of the obtained gDNA isolates were amplified and molecular characterization of isolates were provided after cloning, plasmid purification and sequence analyzes of the amplification products. GenBank accessions were provided for the obtained isolates and phylogenetic constructions of the isolates with the homolog isolates from Turkey and World were determined. The pools were constituted on the base of species and collection region by dissection of head/thorax (HTP) and abdomen (AP) parts of the each female *Culicoides* species in order to investigate Haemosporidian parasites in the collected specimens. Nested PCR analyses of the isolates with the specific primers amplifying Haemosporidian mt-cytb gene region were utilized after the gDNA extractions from the pools. The positives determined in the HTP were accepted as an indicator of the possible vector potential and minimum infection rates (MIRs) were calculated. The characterizations of the Haemosporidian lineages in HTP and AP were performed via sequence analyses. Morphological identification results revealed that, 800 female *Culicoides* specimens collected in the study were belonged to *C. circumscriptus*, *C. nubeculosus* komp., *C. newsteadi*, *C. imicola*, *C. gejjelensis*, *C. obsoletus*, *C. punctatus* and *Culicoides* sp.

(near *C. truncorum*) species. *C. circumscriptus* with 39.4% and *C. imicola* with 33.8% prevalence rates were determined as the most prevalent species. While *C. punctatus* with 1.9% and *C. newsteadi* with 1.8% prevalence rates were the lowest prevalent species. One hundred seventy five polymorphic sites were distributed among the COI sequences of the obtained isolates from the research area leading to the detection of 18 different haplotypes. Phylogenetic analyses revealed that lineages of all species except *C. newsteadi* had monophyletic character. The overall genetic heterogeneity among the haplotypes belonging to characterized species was determined as $25.3\pm 2.4\%$. The phylogenetic constructions of the determined isolates in the study with the other homolog isolates from both Turkey and World were revealed. While the Haemosporidian mt-cytb DNAs were determined in the AP of *C. circumscriptus*, *C. imicola*, *C. obsoletus* and *C. gejjelensis* (10.22%), HTP positivities (7.95%) were detected only in *C. circumscriptus*. Therefore, MIRs of *Haemoproteus* lineages for *C. circumscriptus* was calculated as 22.2%. According to the sequence analyses of the Haemosporidian parasites determined in the related *Culicoides* species, *Haemoproteus* sp. GAGLA05 and *H. minutus* TURDUS2 lineages were characterized in *C. circumscriptus* HTP isolates thus, the possible potential vector role of this species in the transmission of the related lineages was revealed. Furthermore *Plasmodium* sp. CXPIP10 in *C. circumscriptus* AP, *Plasmodium* sp. CXPIP23 and SYCON02 in *C. obsoletus* AP, *P. relictum* SGS1 in *C. imicola*, *C. obsoletus* and *C. gejjelensis* AP and *Plasmodium* sp. YWT4 in *C. imicola* and *C. gejjelensis* AP were identified in the study.

In conclusion, the *Culicoides* species widespread in İzmir region were determined with morphologic and molecular identifications with this study and original data were provided for Turkey regarding to molecular epidemiology. Furthermore results of the study revealed the prevalence of avian haemosporidian parasites in İzmir region and also provides evidence for the potential importance of *C. circumscriptus* in the transmission dynamics of *Haemoproteus* lineages.

Key words: *Culicoides*, Molecular characterization, Avian Haemosporidians, Vector potential, İzmir

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>CULICOIDES</i> CİNSİ SİNEKLER.....	3
2.1.1 <i>Culicoides</i> 'lerin Biyoloji ve Epidemiyolojisinde Önemli Faktörler	4
2.1.2 <i>Culicoides</i> 'lerin Hayat Siklusu	7
2.1.3 <i>Culicoides</i> 'lerin Sağlık ve Ekonomik Önemi	12
2.1.4 <i>Culicoides</i> Türlerinin Yayılımı.....	15
2.1.5 Sistematik	16
2.1.6 <i>Culicoides</i> Türlerinin Klasifikasyonunda Morfolojik Karakterlerin Kullanımı	20
2.1.7 Moleküler İdentifikasyon	20
2.1.8 <i>Culicoides</i> Türlerinin DNA Analizi	21
2.2 KANATLI HAEMOSPORIDIAN PARAZİTLERİ	22
2.2.1 <i>Haemoproteidae</i> ailesindeki Parazitlerin Morfoloji ve Biyolojisi.....	23

2.2.2	<i>Haemoproteidae</i> Türlerinde Epidemiyoloji.....	27
2.2.3	<i>Haemoproteidae</i> Türlerinde Klinik ve Patogenez	31
2.2.4	Kanatlı <i>Haemoproteidae</i> Türlerinin Halk Sağlığı ve Evcil Hayvan Sağlığı Açısından Önemi.....	33
2.3	Moleküler Veriler Işığında Kanatlı Haemosporidianlarında Global Diversite...	34
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1	SAHA ÇALIŞMALARI.....	43
3.1.1	Araştırma Sahası ve <i>Culicoides</i> Örneklerinin Toplanması	43
3.2	LABORATUVAR ÇALIŞMALARI	44
3.2.1	<i>Culicoides</i> Örneklerinin İdentifikasyonu	44
3.2.2	<i>Culicoides</i> Örneklerinden Genomik DNA izolasyonu.....	44
3.2.3	Moleküler İdentifikasyon ve Genotipleme için <i>Culicoides</i> Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	45
3.2.4	<i>Culicoides</i> mt-COI Gen Bölgesi Amplikonlarının Klonlanması ve Rekombinant Plazmid Pürifikasyonu.....	46
3.2.5	<i>Culicoides</i> Havuzlarından Elde Edilen Genomik DNA İzolatlarında Haemosporidan Parazitlerin Mitochondrial Cytochrome b (Mt-cytb) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	50
3.2.6	Sekans ve Filogenetik Analizler	51
3.3	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	52
4.	BULGULAR.....	52
4.1	ARAŞTIRMA YÖRESİNDE BELİRLENEN <i>CULICOIDES</i> TÜRLERİ VE DAĞILIM ORANLARI.....	52
4.1.1	İdentifiye Edilen Türler ve Dağılım Oranları	52
4.1.2	İdentifiye Edilen Türlerin Kanat Morfolojisine Göre Belirlenen Özellikleri	57

4.2 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI.....	65
4.2.1 <i>Culicoides</i> Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları.....	65
4.2.2 <i>Culicoides</i> Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları	69
4.2.3 <i>Culicoides</i> Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu	72
4.2.4 <i>Culicoides</i> Türlerinde Moleküler Olarak Karakterize Edilen Haemosporidian Parazitlerin Filogenetik Analizleri.....	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	78
6. KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1	Kanatlı haemosporidianlarının kanatlı dizilerinde yer alan ve araştırmalara dahil edilen kuş turlerindeki yzdesel dağılımlı	28
Tablo 2.2	<i>Haemoproteus</i> turleri ve aseksüel sporogonik gelişmelerini tamamladıkları hippoboscid (<i>Lynchia</i> , <i>Microlynychia</i> , <i>Ornithomyia</i> , <i>Pseudolynchia</i> , <i>Stilbometopa</i>) ile ceratopogonid (<i>Culicoides</i>) sinekler.....	29
Tablo 2.3	Kanatlı Haemosporidian yayınlarında incelenen moleküler tarama yöntemleri ve konak-parazit sistemleri (1995–2012).....	36
Tablo 4.1	İzmir ilinde identifiye edilen <i>Culicoides</i> türlerinin toplama bölgeleri ve aylara göre dağılımlı	54
Tablo 4.2	Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan <i>Culicoides</i> türlerinde belirlenen haplotipler.....	67
Tablo 4.3	<i>Culicoides</i> türlerinde belirlenen haplotiplerin mt-COI sekanslarının çoklu hizalama analizlerine göre identiklik oranları	68
Tablo 4.4	İncelenen <i>Culicoides</i> ve sivrisinek örneklerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları.....	73
Tablo 4.5	Sekans analiz sonuçlarına göre Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu.....	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	<i>Ceratopogonidae</i> ailesindeki türlerin filogenisi.....	4
Şekil 2.2	<i>Culicoides</i> türlerinin hayat siklusu.....	8
Şekil 2.3	<i>Culicoides</i> soyundaki tarif edilmiş yeni türlerin yıllara göre dağılım oranları.....	18
Şekil 2.4	Kanatlı hemoproteidlerinin yaşam döngüsünün şematik görünümü	25
Şekil 2.5	<i>H. noctuae</i> sporozoitleri	27
Şekil 3.1	Sinek tuzakları kurulum noktaları.....	43
Şekil 3.2	Işıklı sinek tuzakları.....	44
Şekil 3.3	pJET1.2/blunt klonlama vektörü.....	47
Şekil 3.4	Rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu aşamalarındaki çalışmalar	48
Şekil 3.5	LBsıvı besi yeri ve çalkalayıcı üzerinde ekimi yapılan 5 ml'lik LB sıvı besi yeri içeren flasklar	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1	Araştırma yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin genel yüzdesel dağılımı.....	55
Şekil 4.2	Bergama yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin yüzdesel dağılımı	55
Şekil 4.3	Ödemiş yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin yüzdesel dağılımı	56
Şekil 4.4	Kemalpaşa yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin yüzdesel dağılımı	56
Şekil 4.5	Foça yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin yüzdesel dağılımı.....	57
Şekil 4.6	Araştırma yöresinde belirlenen <i>Culicoides</i> türlerinin aylara göre yüzdesel dağılımı	57
Şekil 4.7	<i>C. circumscriptus</i> kanat yapısı.....	58
Şekil 4.8	<i>C. imicola</i> kanat yapısı.....	59
Şekil 4.9	<i>Culicoides</i> sp. (<i>C. truncorum</i> 'a yakın)	60
Şekil 4.10	<i>C. nubeculosus</i> komp. kanat yapısı	61
Şekil 4.11	<i>C. gejelensis</i> kanat yapısı	62
Şekil 4.12	<i>C. obsoletus</i> kanat yapısı	63
Şekil 4.13	<i>C. punctatus</i> kanat yapısı.....	64
Şekil 4.14	<i>C. newsteadi</i> kanat yapısı	65

Şekil 4.15 <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü	66
Şekil 4.16 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle <i>Culicoides</i> mt-COI gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları	66
Şekil 4.17 Bazı plazmidlerde <i>Culicoides</i> mt-COI hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen ampliconlar.....	66
Şekil 4.18 Çalışmada belirlenen <i>Culicoides</i> türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları.....	68
Şekil 4.19 <i>Culicoides</i> izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri.....	71
Şekil 4.20 Bazı <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> pozitif <i>Culicoides</i> örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü.....	72
Şekil 4.21 Bazı <i>Plasmodium/Haemoproteus</i> izolatlarına ait jel pürifiye mt-cytb gen bölgesi ampliconların jel elektroforezde görünümü.....	74
Şekil 4.22 Araştırmada <i>Culicoides</i> türlerinde belirlenen <i>Haemoproteus</i> ve <i>Plasmodium</i> tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BI analizine göre filogenetik ilişkileri	77

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Culicoides cinsindeki sokucu sinekler (biting midges) (Diptera: *Ceratopogonidae*) evcil ve vahşi hayvanların yanı sıra insanlarda da hastalık oluşturan birçok patojene vektörlük yapmalarından dolayı oldukça önemli bir insekt grubunu oluşturmaktadırlar (1). 2000’li yıllardan itibaren Avrupa’da ortaya çıkan ve binlerce koyun-keçinin ölümüne neden olan Mavi Dil virusunun (BTV) vektörünün *Culicoides* soy altında yer alan *Culicoides pulicaris* sensu stricto olduğu belirlenmiştir (2). Morfolojik teşhis için en önemli kriterlerden biri olan kanat morfolojisinin *Culicoides* soy altındaki tür ve/veya tür komplekslerine ait nesillerde yüksek düzeyde değişkenlik göstermesi, erkeklerde hypopygiumun teşhiste önemli olmasına karşılık, araştırmalarda çoğunlukla dişilerin yakalanması nedeniyle bu soy altındaki türlerin teşhislerinde zorluklar bulunmaktadır (3, 4). Son yıllarda moleküler biyolojik tekniklerin *Culicoides* türlerinin identifikasyonunda ve genetik farklılıkların araştırılmasında kullanılmaya başlanması ile birlikte birçok tür ve/veya tür kompleksi içerisinde kriptik türlerin varlığı ortaya çıkmaya başlamıştır (4, 5). Tüm bu gelişmeler *Culicoides* soyundaki türlerinin taksonomik durumunun çözümlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuş olmakla birlikte henüz birçok tür ve/veya tür kompleksine ait nesiller için moleküler düzeyde verilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ilk olarak İzmir’in farklı bölgelerinde yaygınlık gösteren *Culicoides* örneklerinin morfolojik olarak tanımlanması, izolatların tür bazında mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgelerinin moleküler karakterlerinin ortaya konarak DNA barkodlarının ve GenBank kayıtlarının sağlanması, bölgede dağılım gösteren haplotiplerin belirlenerek filogenetik yapılarının ortaya çıkarılması, olası kriptik türlerin sekans analizleriyle araştırılması amaçlanmıştır. İzmir ilinde iklim özelliğinden kaynaklı olarak (yüksek ısı ve nem) *Culicoides* aktivitesinin uzun dönem devam etmesinden dolayı sahada BTV sirkülasyonu devamlı olmaktadır. Bu sebeple Mavi Dil hastalığı İzmir ilinde hayvancılık sektöründe her yıl önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışma, *Culicoides* türleri ve onların naklettikleri vektör-borne karakterli hastalıkların kontrol ve

mücadelesinde gerekli çok kıymetli ve kritik temel moleküler epidemiyolojik verileri sağlamak amacıyla yapılmıştır. Çalışmamızda ikinci olarak araştırma yöresinde karakterize edilen ve yaygınlıkları belirlenen *Culicoides* türlerinin Haemosporidian parazitler için potansiyel vektörlükleri moleküler olarak araştırılmıştır. Belirlenen Haemosporidian nesillerinin mitochondrial cytochrome b gen bölgelerinin karakterizasyonu ile vektör-konak-parazit filogenetik ilişkisinin ve moleküler populasyon genetiklerinin GenBank ve MalAvi veri tabanlarında şu ana kadar kayıtlı nesillerle birlikte değerlendirilmiş ve çok kıymetli bilimsel çıktılar elde edilmiştir. Ayrıca çalışma ile bazı *Haemoproteus* nesillerinin potansiyel *Culicoides* vektörleri de dünya ilk kez belirlenip karakterize edilmiş ve bu parazitlerin epidemiyolojisine özgün veriler sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

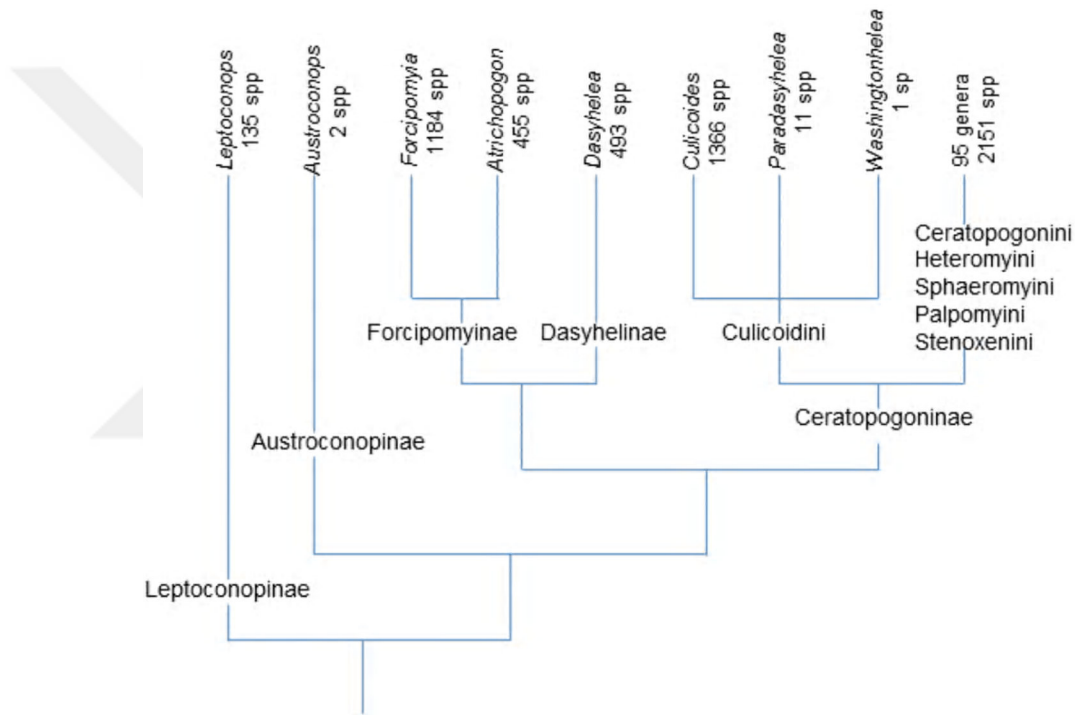
2.1 CULICOIDES CİNSİ SİNEKLER

Culicoides türleri 140 milyon yıl önce evrimleştiğine inanılan *Ceratopogonidae* (Diptera: Culicomorpha: *Chironomoidea*) ailesinde yer almaktadır (6). Bu ailedeki türler bazı özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (6): ocelli bulunmaz, postnatumda medial uzunlamasına oluk yoktur, kanatlar kenara kadar uzanan 1-3 radial ve 2 median dallara ayrılmıştır, ön bacaklar diğer bacaklara göre kısa olup her bacağın ilk tarsomeri ikinci tarsomere eşit veya ikinci tarsomerdan daha uzundur. *Ceratopogonidae* ailesindeki sinekler, *Chironomidae* ve *Simuliidae* ailesindeki sineklerle kardeş türler olup her üçü *Chironomoidea* üst ailesinde klasifiye edilmektedir.

*Ceratopogonidae*ler geniş bir habitatta bulunurlar. Bu ailedeki sineklerin çoğu insan ve hayvanlara atak yaparken diğer bir kısmı ise kakao ve kauçuk için önemli polenatördürler. Yine bu ailedeki sineklerin büyük çoğunluğu diğer insektler üzerinden beslenir ve bunlardan bazıları bu insekt konaklara muhtemelen patojenleri nakledebilmekte ve bu türlerin popülasyonları üzerine bir kontrol düzeyi oluşturabilmektedir. *Ceratopogonidae* ailesinde 6000'den fazla tür tarif edilmiş olup Borkent ve Grogan'a (7) göre henüz daha keşfedilmeyi bekleyen birçok yeni tür bulunmaktadır. Bu ailede beş alt aile ve 103 soy yer almaktadır (1) (Şekil 2.1).

Ağız parçalarının özellikleri itibariyle, Borkent (6) bilinen fosil türlerin büyük çoğunluğunun omurgalılardan beslendiği ve bu beslenme şeklinin *Ceratopogonidae* ailesindeki türler için plesiomorphic karakterde olduğu sonucuna varmıştır. Buna karşın mevcut türler içinde omurgalı kaniyle beslenme eğilimi yalnızca dört soyda tespit edilmiştir (8). Omurgalı kaniyle beslenme eğilimi gösteren bu dört soy, *Austroconops* Wirth & Lee 1958, *Leptoconops* Skuse 1889, *Forcipomyia* Meigen 1818 ve *Culicoides* Latreille 1809 olup, sonuncusu oldukça büyük ekonomik öneme sahiptir ve bu soydaki

türlerin veteriner ve medikal önemleriyle alakalı birçok çalışma yapılmıştır (9). *Culicoides* türlerine Antartika dışındaki tüm iklim şartlarında rastlanabilmektedir. Asya kıtasının güney doğusundaki büyüklü küçüklü adalardan yalnızca Yeni Zelanda ve Hawaii'de bu türlere rastlanmamıştır. *Culicoides* türleri küçük, kahverengi veya gri renkli olup benekli kanatlara sahiptirler. *Culicoides* türleri, *Paradasyhelea* Macfie 1940 ve *Washingtonhelea* Wirth & Grogan 1988 soylarının da bulunduğu Culicoidini sınıfında yer almaktadır. *Culicoides*'ler, tarif edilmiş 1360'ın üzerinde türüyle en zengin soy olma özelliği taşımaktadır (1).



Şekil 2.1 *Ceratopogonidae* ailesindeki türlerin filogenisi (8)

2.1.1 *Culicoides*'lerin Biyoloji ve Epidemiyolojisinde Önemli Faktörler

Culicoides soyundaki birçok türün kanla beslenme eğilimleri ve hastalık etkenlerini nakletmeleri, bu türlerin biyolojileri hakkında özellikle de vektörlük kapasiteleri, konak aralığı, beslenme davranışları, beslenme alanları, yumurtlama stratejileri, insanlara saldırmaları ve kontrol metotları gibi konularda birçok araştırmaya ilham kaynağı olmuştur. İnsanlar veya hayvanlarla ilgisi olmayan *Culicoides* türlerinin biyolojileri hakkında yapılmış çalışma sayısı çok az olup bu soydaki türlerin birçoğunun biyolojileri hakkında henüz daha bilgi bulunmamaktadır (8).

2.1.1.1 Beslenme ve Konaklar

Bilindiği kadarıyla, *Culicoides* türlerinin sadece ergin dişileri omurgalı kanıyla beslenmektedir. Buna karşın sadece üç türün dişisinin kanla beslenmediği düşünülmektedir. Bu üç tür (*C. anophelis* Edwards 1922, *C. baisasi* Wirth & Hubert 1959 and *C. culiciphagus* Wirth & Hubert 1959) *C. subg. Trithecooides* Wirth & Hubert 1959 alt soyunda yer almakta olup bu türlerin diğer sineklerle veya doymuş sivrisineklerle beslendikleri rapor edilmiştir. Önceleri bu türlerin doymuş insektlerdeki omurgalı kanıyla beslendikleri düşünülmüştü (10, 11). Ancak bu görüşe Wirth ve Hubert (11) karşı çıkmış ve *C. anophelis*'in sığır veya insanlarda kanla beslenebilirliğini göstermişlerdir. Bunun yanında, Sen ve Das Gupta (12) ve Das Gupta (13) *C. anophelis*'in omurgalı kanından ziyade insektlerin hemolenfleriyle beslendiklerine dair kanıtlar da elde ettiklerini bildirmişlerdir. Wirth ve Hubert (11) alt soy *Trithecooides*'i mandibula yapısına göre 3 tür kompleksine ayırmıştır. Sivrisinek üzerinden beslenen *C. anophelis*, *C. baisasi* ve *C. culiciphagus* türleri kendi tür kompleksi içine yerleşmiş ve bu özellikleriyle *Trithecooides* soy altındaki diğer türlerden ayrılmıştır. Bu alt soy içerisinde omurgalılarından beslenen en az 10 tür ifade edilmiştir (11). Campbell ve Pelham-Clinton (14), *C. machardy* Campbell & Pelham-Clinton 1960, *C. truncorum* Edwards 1939 and *C. albicans* (Winnertz 1852) türlerinin mandibular diş yapılarının gelişmediğini dolayısıyla bu türlerin omurgalılarından beslenebilme yeteneklerini kaybettiklerini ileri sürmüşlerdir. Borkent (15), omurgalı kanıyla beslenen türlerin hepsinin mandibular dişlerinin iyi gelişmiş olduğunu, bu durumun da Campbell & Pelham-Clinton'un (14) hipotezini doğruladığını rapor etmiştir.

2.1.1.2 Konak Tercihleri

Culicoides türlerinin bilinen konaklarının birçoğu evcil hayvanlarda enfeksiyonların nakli veya insan pestlerinin rahatsızlık verme düzeyleri hakkında yapılmış çalışmalardan öğrenilmiştir. Bu sebeple, dünyanın birçok yerinde evcil hayvanlardan veya insanlardan beslenmeyen türlerin konakları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Jamnback (16), dişi türlerin antenlerindeki duyu organeli görevi yapan antennal flagellomerlerin (= sensilla coeloconica, SCo, sensu (17)) sayısı ile konak tercihleri arasında ilişki olduğunu rapor etmiştir. Araştırmacı (16) incelediği Nearktik türlerde, büyük memelilerden beslendikleri bilinen türlerin antenlerinde 4-6 flagellomer, kuşlardan beslenen türlerin ise 8-13 flagellomere sahip olduklarını belirlemiştir.

Jamback (16) yine, büyük memelilerden beslenen türlerin konaklarını bulmaları için fazla sayıda flagellomere ihtiyaçları olmadığını, kuş gibi daha küçük canlılardan kan emen sineklerin ise daha fazla flagellomere ihtiyaç duyduğunu ileri sürmüştür. Benzer şekilde Rowley ve Cornford (18) da dört Nearktik türün palpuslarındaki sensilla sayısı ile konak tercihleri arasında benzer bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Rowley ve Cornford (18) ayrıca erkek bireylerde dişilere oranla çok daha az sensilla olduğunu gözlemlemişler ve bu durumun Jamback'ın (16) hipotezini doğruladığını rapor etmişlerdir. Braverman ve Hulley (19), bu her iki gözlemi Afrika türlerinin palpal ve antennal sensillaları üzerine yaptıkları çalışmalarla konfirme etmişlerdir. Braverman ve ark. (20), tümünde olmasa da bazı İsrail türlerinde, konak tercihleri ile antennal sensillaların sayıları ile üçüncü ve dördüncü palpal segmentlerin oranları arasında korelasyonlara dair kanıtlar bulmuşlar fakat buna karşın konak tercihi ile palpal sensillaların, mandibular ve maksillar dişilerin sayıları, proboscis uzunluğu veya tırnak morfolojisi gibi faktörler arasında benzer bir ilişki tespit edememişlerdir. Meiswinkel ve Linton (21), *C. tuttifrutti* Meiswinkel et al. 2003 ve *C. pseudopallidipennis* Clastrier 1958 türlerinin büyümüş 3. palpal segmentinin ornithophilic yatkınlığı gösterdiğini ve bu durumun Jamback (16) ve Braverman & Hulley'in (19) iddialarını doğruladığını bildirmişlerdir. Bazı *Culicoides* türlerinin çamur zıpzıplarından (mudskippers veya çamur balığı) (*C. garciai* Wirth & Hubert 1989, (22)) ve kaplumbağalardan (*C. phlebotomus* Williston 1896, (23)) beslendikleri rapor edilmişken, reptillerden, amfibianlardan ve balıklardan beslenen türler hakkında hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Lewis (24), tatarcıkların ağız parçalarının morfolojilerindeki değişikliklerin bu sineklerin konak tercihlerindeki farklılıklarını gösterdiğini ileri sürmüştür. Lewis'in (24) ağız parçalarının morfolojilerine göre yaptığı sınıflandırmalar genellikle bilinen sistematikle paraleldir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, Braverman ve ark. (20) İsrail'deki 39 *Culicoides* türünün ağız parçalarının morfolojileri ile konak tercihleri arasında hiçbir korelasyon tespit edememişlerdir. Avusturalya türlerinin konakları hakkında pek çok bilgi mevcutken, konak tercihleri ile morfolojileri arasındaki korelasyon hakkında ise bir o kadar az bilgi bulunmakta olup bu türlerin üzerine yapılmış çalışmalar genellikle evcil hayvan veya insanlarla alakalı türler üzerine yoğunlaşmıştır (8). Konak dağılımları bilinen bu türler için bazı türlerde konak çeşitliliği sınırlıyken [örn. *C. brevitarsis* Kieffer 1917 geniş ölçekte ruminantlar ve atlardan beslenmektedir (25)], bazı türlerde çeşitlilik oldukça fazladır (örn. *C.*

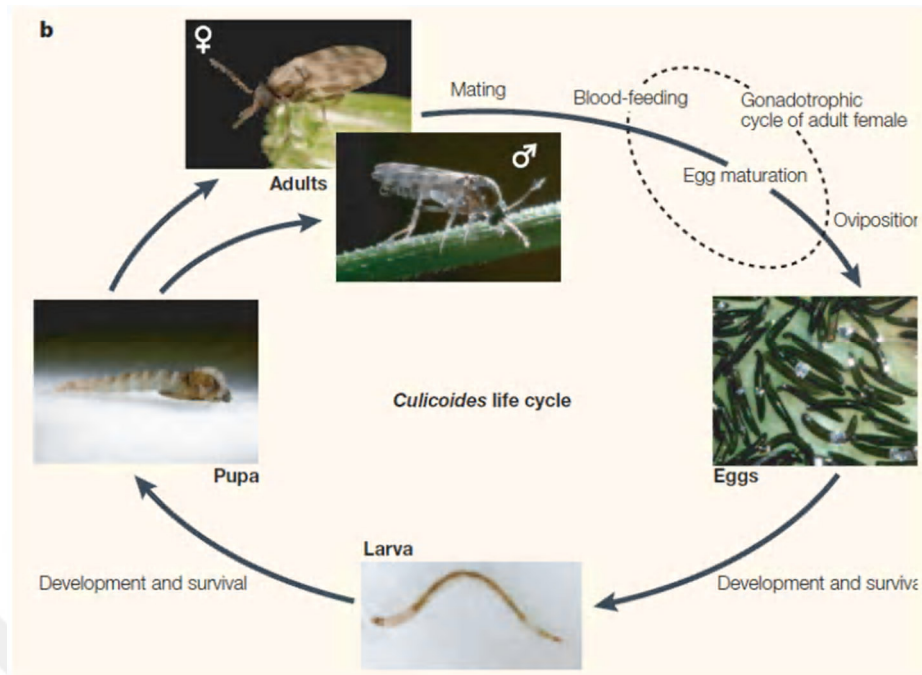
subimmaculatus Lee & Reye 1953 ve *C. ornatus* Taylor 1913 türleri kuşlardan ve memelilerden beslenebilmektedir).

2.1.1.3 Beslenme Davranışı

Culicoides türlerinin dişileri, gündüz aktif türler de bildirilmesine karşın genellikle alacakaranlık veya gece aktif olma eğilimindedirler (26). Bazı *Culicoides* türlerinin ekzofilik olduğu ve beslenmek için binalara girme konusunda gönülsüz oldukları gösterilmiştir. Bu beslenme davranışı üzerine yapılan çalışmalar genellikle, viremik veya değerli hayvan stoklarının vektörlere maruz kalmasının önlenmesi üzerine yoğunlaşmış olup bu noktada özellikle şimdiye kadar çalışılmış olan türlerde bu fenomenin değişkenlik göstermesiyle non-vektör türlerin önceden tahmin edilmesi güçlük oluşturmaktadır (27-34). Bu sonuçlar bazı çalışmalarda ışık tuzaklarının kullanılmasıyla daha da komplike hale gelmiş olup, Carpenter ve ark.'nın (35) da belirttiği üzere ekzofilik türlerin binaların içine de saldırabilecekleri gösterilmiştir. Ayrıca bazı *Culicoides* türlerinin bina içindeki konaklarına, ışık tuzağı yerleştirilmiş binalardaki konaklara nazaran daha farklı reaksiyon gösterdiklerine dair kanıtlar bulunmaktadır (33).

2.1.2 *Culicoides*'lerin Hayat Siklusu

*Culicoides*ler yumurta evresi, dört larva dönemi, pupa ve ergin dönemi olmak üzere tipik nematoceran hayat siklusuna sahiptirler (Şekil 2.2). *Culicoides* türlerinin yumurtaları silindirik, yaklaşık 400 µm uzunluğunda ve 50 µm genişliğinde olup genellikle üreme yerlerinin yüzey kısımlarına yumurtalarını bırakırlar (36). Larvalar ortalama 6. günde yumurtadan çıkarlar ve bazı türlerde hemen diyapoza girerler (37-41). Larvalar iyi gelişmiş baş kapsülüne sahip kurtçuk şeklindedirler ve 9 abdominal segmentin yanında üç de torasik segmente sahiptirler. Larvaların vücutları sıralı setalarla kaplıdır. Larvaların gelişimi tamamıyla beslenme ve sıcaklıktan etkilenmekte olup bazı tropikal türlerde larval gelişim 24 günde tamamlanmaktayken (42), bazı Arktik türlerde bu süre yaklaşık iki yılı bulabilmektedir (43). Larvaların aksine pupa, taksonomik olarak sınıflandırılabilme özelliğine sahip operkulumun yerleşimi, solunum borusu ve abdomen yapısı gibi morfolojik özelliklere sahiptir.



Şekil 2.2 *Culicoides* türlerinin hayat siklusu (8).

2.1.2.1 Larval Habitat

Culicoides larvaları yüksek nemli üreme alanlarına ve organik maddelere ihtiyaç duymaktadır. Larvalar farklı katmanlarda bulunabilmektedirler. Birçok türün larvası sulara serbest olarak yaşayabilmekteyken *Avaritia* alt soyundaki bazı türlerin larvaları yüzemez ve hayatta kalabilmek için katı veya yarı katı ortama ihtiyaç duyarlar (38, 44, 45).

Meiswinkel ve ark. (46) Afrika *Culicoides* türlerinin larval habitatlarını dört temel gruba ayırmıştır ki bu gruplamanın Avusturalasyan türleri için de geçerli olabileceği düşünülmektedir.

1. **Su/kara ara yüzü:** Avusturalasya türlerinin hemen hemen yarısı bu habitatta yaşamaktadır. Su akıntılı, durgun, tatlı, hafif tuzlu, tuzlu, temiz veya kirli olabilmektedir. Ayrıca doğal şartlarda ya da modifiye [insan yapımı (örn. sondaj drenleri ve barajlar) veya hayvanların oluşturduğu (mandaların yuvarlandığı çamurlu alanlar)] de olabilmektedir. Katmanlar kumdan toza ve çamura kadar değişebilmektedir.
2. **Hayvan gübresi:** Kettle ve Lawson (47) *Culicoides* türleri ile hayvan gübrelere arasındaki ilişkiyi tespit eden ilk kişiler olup araştırmacılar sığır gübrelere *C. chiopterus* (Meigen) 1830 ve *C. dewulfi* Goetghebuer 1936 (*C.*

pseudochiopterus (48)) türlerini belirlemişlerdir. Büyük hayvanların özellikle de ruminantların gübrelerinin *Avaritia* alt soyuna ait 12 *Culicoides* türü tarafından kullanıldığı gözlemlenmiştir (49-53). *C. brevitarsis* (42, 49, 54), *C. brevipalpis* ve *C. wadai* (49); *C. kanagai* Khamala ve Kettle 1971 (51) ve *C. bolitinos* Meiswinkel 1989 (52) gibi bazı türler gübre dışında başka hiçbir ortamda yaşayamamaktadırlar. Avusturalasya türlerinden yalnızca üçü hayvan gübrelerini kullanmaktadır (49).

3. **Bitki ve kaya oyukları:** *Culicoides* türleri tarafından kullanılan oyuklar farklılık gösterebilmektedirler. Bazı oyuklar ağaçlarda bazıları küçük su ceplerinde bazıları da *Pandanus* gibi bitkilerin yapraklarının tabanında olabilmektedir. Ağaç oyukları 2-3 litre su ihtiva edebilmekte olup sürekli olarak çürümüş yapraklarla kontamine edilmiştir ve predatörlerin de aralarında olduğu birçok farklı omurgasız türüne de ev sahipliği yapabilmektedir (55).
4. **Çürümüş meyve, bitki ve mantarlar:** Rölatif olarak az sayıda *Culicoides* türünün çürümüş bitki materyali ile ilişkili olduğu bildirilmiş olup Meiswinkel ve ark. (46) Afrika'da bu tür habitatların geniş ölçekte henüz keşfedilmediğini rapor etmişlerdir. Bu tür habitatları kullanan türlerin yaygın olarak *Avaritia* alt soyundaki türler olduğu kaydedilmiştir (22).

2.1.2.2 Pupal Davranış

Culicoides soyundaki sokucu sinekler yukarıda bahsedildiği üzere çok çeşitli habitatlarda gelişim gösterebilmekte olup bu farklı habitatlara yaşamlarını sürdürebilmek için gelişim dönemlerinde çeşitli fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlar sergileyebilmektedir. Dyce ve Murray (56), Batı Avustralya'daki *Culicoides* türleri üzerinde yürüttükleri çalışmalar sonucunda üç farklı tip pupal davranış belirlemişlerdir. Bu farklılıkların bilinmesiyle toplama ve kültür tekniklerinin etkinliğinin arttığına dikkat çekmişlerdir. Söz konusu bu üç pupal davranış tipi aşağıda gösterilmiştir.

Tip A (Substrattan su yüzeyine doğru çıkan ve yüzeyde kalan pupa)

Bu tip davranış şekli en yaygın olanı olup immatür dönemleri durgun veya çok yavaş akan su veya hafif tuzlu suların kenarlarında bulunan *C. austropalpalis*, *C. dycei*, *C. bunrooensis*, *C. marksi*, *C. multimaculatas* ve *C. victoriae* türlerinde görüldüğü bildirilmiştir. Bu tip davranış şekli ayrıca gelgitli havuzlardaki yüzen alg yığınları

üzerinde üreyen *C. henryi* türünde de gözlemlenmiştir. Yüzme özelliği muhtemelen pupal gelişimin farklı devrelerinde gelişmektedir fakat pupa yüzeye doğru geldiğinde tekrar dibe doğru batamaz ve uzun aksisi boyunca suya paralel olarak yüzer vaziyette kalır. Daha sonra hava ve su hareketleri ile dağılırlar ve sonradan suda şekillenen meniküslerde tekrar yığılım yaparlar (56).

Tip B (Su yüzeyine tekrarlı olarak yükselen, yüzey tabakasından ayrılan ve tabanda dinlenmek için dalan pupa)

Bu davranış şekli yalnızca ağaç oyuklarında gelişim gösteren iki tür *C. angularis* ve *C. mackerrasi*'de gözlemlenmiştir. Bu pupalar tabanda horizontal pozisyonda dinlenme halinde bulunurlar. Abdomenlerinin hafif sallayarak harekete geçirip yavaş bir şekilde yüzeye doğru yükselirler. Bunun dışında bariz bir vücut hareketi sergilemezler. Pupa yükselirken ve batarken cephalothorax üstte olmak üzere dik bir şekilde durur. Su yüzeyinde respiratör hornları havayla temas edecek şekilde vertikal olarak uzanırlar. Su yüzeyini abdomenlerini hafif sallayarak bırakırlar ve kademeli olarak dibe dalarlar. Su yüzeyinde eğer rahatsız edilirlerse ani bir şekilde yüzeyi bırakıp hemen dalış gösterirler. Bu davranış şekli ritmik olup şüphesiz pupanın respiratör gerekliliği ile kontrol edilmektedir. Pupanın yüzme özelliği çıplak gözlede görülebilir olan cephalothorax içindeki gaz içeriği ile ilişkilidir. Pupa hareketleri atmosferik basıncın suni etkisiyle kontrol edilebilir ve atmosferik basıncın artışıyla yüzeye çıkışlarının engellendiği durumlarda muhtemel oksijen eksikliği sebebiyle pupalar ölebilir (56).

Tip C (Su altında kalan ve tabanda oyuk oluşturan pupa)

Gelgitli nehir ağzlarındaki kum birikintilerinde gelişim gösteren bir kısım *Culicoides* türlerinin pupaları bu şekilde davranış sergilerler. Bu türler yüzmezler ve buldukları yerden çıkarıldıklarında abdomenin ilk halkasının uç kısmının lateral hareketleriyle hızlı bir şekilde (genellikle 15 saniyede) kum içerisine gömülürler. Pupanın anal segmentinin posterolateral çıkıntısı ve abdominal bristelleri anterior olarak kıvrılır. Bu posterolateral çıkıntılar, deniz kumunda yerleşim gösteren *C. melleus* türünde de benzer şekildedir. Nehir kumlarından da çıkarılan diğer iki Avusturalya türü *C. molestus* ve *C. subimmaculatus* da benzer çıkıntı ve bristallara sahiptir. Bazı *Culicoides* türlerinin pupaları medceziirlere bağlı olarak dönüşümlü olarak yüzeyde çıplak halde ve su altındaki kum birikinti alanlarında bulunmaktadır. Bu bölge dalgaların hareketleriyle de

oluşturulabilen bir alan olup güneş ışınlarıyla ısıtmakta ve kurutulmaktadır. Bu pupaların aktif hareketlerinin, kum birikintileri içerisindeki lokasyonlarını korumayı garantiye almak amacıyla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca pupalar kum yüzeyinin çok kuru ve sıcak olduğu durumlarda kendilerini daha derine gömebilirler (56).

2.1.2.3 Çiftleşme

Diğer birçok Culicomorpha ve geniş çapta diğer Diptera'da olduğu gibi *Culicoides* soyuna bağlı birçok türün erkekleri kümeler halinde birarada bulunurlar. Bu toplu halde bulunmanın esas amacı tartışmalı olsa da çiftleşmenin etkinliğini artırmak olduğu kaydedilmiştir (8). *Culicoides* kümeleri genellikle zemin üzerinde koyu ve açık alanların karışımı tarzında görsel markerlar oluştururlar. Birçok türde bu kümelenme alacakaranlıktan hemen önce şekillenmeye başlar ve her zaman dişilerden çok daha fazla erkekleri içerir (8). Downes (57), bu görsel kümelerin hem erkek ve hem de dişileri cezbediğini ve bu kümelerin erginlerin bir araya gelmesi için ve çiftleşmeyi kolaylaştıran bir mekanizma olduğunu bildirmiştir. Downes (58) sonradan bu kümelenmenin erkeklerde spermatidlerin hızlı transferine imkan sağlayan spermatophore üretimini stimüle edebildiğini ve dolayısıyla kopulasyon için gerekli zamanı düşürdüğünü kaydetmiştir.

Anlaşılabildiği kadarıyla erkekler, küme içerisindeki dişileri bulmak için işitsel sinyalleri kullanmaktadırlar (59). Culicomorpha'nın birçok türünde erkeklerin antenleri bazal segmentte helezon tarzında mekanoreseptiv duyu tüyler (sensilla chaeticae) ihtiva eder ve bunlar ses dalgalarını algırlar. İşitsel sinyaller bu mekanoreseptiv tüyler tarafından alınır ve antenlerin pedicel üzerindeki Johnston's organında kaydedilir. Buna zıt olarak dişilerin antenleri çok daha az mekanoreseptiv tüy bulundurur ve işitsel sinyallere duyarlı olarak gözükmemektedirler (60). Birçok diğer grupların kümelenmeyi çiftleşme stratejisi olarak kullanmalarına karşın bu anten dimorfizminin Culicomorpha ile sınırlı olması dikkat çekicidir (8).

Küme oluşturmadan çiftleşme davranışı bazı *Culicoides* türlerinde görülebilmektedir. Downes (57), *C. nubeculosus* ve *C. sonorensis* için fakültatif kümelenme davranışı bildirmiş olup, bu karakterleri bu türlerin laboratuvar kolonilerinin oluşturulmasını mümkün kılmıştır. Araştırmacı (57) ayrıca *C. utahensis*'in omurgalı konağı üzerinde çiftleştiğini ve tarif edilmemiş diğer bir türün de yerde çiftleştiğini gözlemlemiştir.

Bu son iki türde modifiye çiftleşme davranışı erkek anten morfolojisine de yansımış olup büyük ihtimalle küme oluşturmeyen erkeklerin küme içerisinde dişiye bulmak için duyuşal işitme aparatlarına ihtiyacı olmamasıyla ilişkilidir. Wirth ve Hubert (22) ve Dyce (61) sonraları *C. kusaiensis* ve *C. agas* erkeklerinde anten tüylerinin bulunmamasının bir kümelenme olmayan çiftleşme stratejisini yansıttığını kabul etmişlerdir.

2.1.3 *Culicoides*'lerin Sağlık ve Ekonomik Önemi

Ceratopogonidae ailesindeki türler diğler hematofagöz insektlerde olduğu gibi, alerjik reaksiyonlara yol açmaları ve çeşitli bakteriyel, viral ve parazit patojenleri çeşitli konaklara nakletmeleri açısından yüksek medikal ve veteriner öneme sahiptirler. Öte yandan çiftlik hayvanlarında yol açtıkları vektör-borne hastalıklarla ülke ekonomilerine ağır yükler getirirler ve yıkıcı sonuçlara neden olurlar.

2.1.3.1 Rahatsız Edici Etkileri

Tek bir sinek tarafından emilen kan miktarı yaklaşık 0,03µl (62) olup çok sayıda sinekle enfestasyonlar dahi kan kaybına bağılı problemlere yol açmamaktadır. Bununla birlikte ışık tuzaklarıyla çok fazla sayıda sinek toplanabilmekte olup (46) bunların sokucu popülasyonun yalnızca %1'ini temsil ettiği kaydedilmiştir (63). *Culicoides* türlerine dünya çapında verilmiş olan bazı yaygın isimler bu sineklerin Dünya çapında rahatsız edici etkilerinin önemini yansıtmaktadır. Öyle ki bu sinek türleri bilimsel lakaplarla anılmaktadırlar. Bu kötü şöhretlerine örnek olarak bilimsel lakab taşıyan *molestus*, *damnosus*, *irritans* ve *diabolicus* gibi türler verilebilir (8).

Kıyıya yakın Avusturalya'nın çeşitli bölgelerinde, *Culicoides* türleri uzun zamandır insanlar için pest problemi oluşturmaktadır. İnsan pest türleri olarak isimlendirilen ilk Avusturalya türleri *C. molestus* ve *C. marmoratus*'dur. Son yıllardaki nüfus artışı ve turizm bu problemi daha da alevlendirmiştir. Kanal sulama sistemlerinin inşaaş, ırmak kenarlarının drene edilmesi gibi çevresel etmenlerden dolayı bazı bölgelerde bu sinekler için yeni yaşam habitatları meydana gelmiştir (64).

İnsanlarda enfestasyon önemlerine rağmen sadece birkaç bilimsel makalede bu konuya değinilmiş ve özellikle de bu yayınlarda sivrisineklerin etkileriyle kıyaslamalar yapılmıştır. Hendry (65), İskoçya'nın yüksek kesimlerinde *C. impunctatus*'un sosyo

ekonomik etkileri hakkında bazı anektodlar vermiştir. Yine Linley ve Davies (66), Karayipler’de bu sineklerin turizme etkileri hakkında raporlar sunmuşlardır. Queensland’in Hervey Bay bölgesinde *C. ornatus* türünün 25 milyon dolarlık ekonomik kayba yol açtığı rapor edilmiştir (67). Avusturalasya bölgesi diğer endemik bölgelerde olduğu gibi içerdiği faunasının az bir kısmı (<%3) insanlardan beslenen pestler olarak rapor edilmiş ve bu türler Pasifik’te *C. belkini* ve *C. peliliouensis* (68, 69) ve Avusturalya’da *C. ornatus*, *C. longior*, *C. molestus*, *C. marmoratus* ve *C. subimmaculatus* türleri olarak bildirilmiştir (64). Diğer yandan Türkiye’de halk arasında *Culicoides* türleri özel bir isimle adlandırılmamakla birlikte “sokucu” sinekler olarak bilinirler.

2.1.3.2 Allerjik Dermatit

Bazı *Culicoides* türlerinin rahatsız edici etkileri şüphe götürmezken, atakları takiben ciddi medikal rahatsızlıklara yol açtıklarına dair çok az rapor bulunmaktadır. Wirth ve Blanton (70) Panama’da bu sineklerin ataklarını takiben sekonder enfeksiyonların şekillendiğini, Wongsathuaythong ve ark. (71) ise Tayland’da sinek sokmalarını takiben insanlarda deri erozyonlarının oluştuğunu bildirmişlerdir.

Culicoides sokmalarına bağlı alerjik dermatit olguları bir kısım konaklardan bildirilmiş olmakla birlikte en yaygın ve ağır reaksiyonlar atlarda bildirilmiştir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde *C. imicola*, *C. pulicaris*, *C. obsoletus*, *C. brevitarsis*, *C. impunctatus* ve *Culicoides* sp. gibi türlerin hayvanlarda güçlü kaşıntı, dermatit, hipersensitivite ve Kasen hastalığı gibi alerjik reaksiyonlara sebep oldukları rapor edilmiştir (72-76).

2.1.3.3 Vektörlük Roller

Farklı gruplardan birçok organizma artropodlar tarafından nakledilebilirken, *Culicoides*lerin yalnızca nematodlar, protozoonlar ve viruslarla ilişkili olduğu bilinmektedir. *Culicoides* türlerinin vektörlük rolleri üzerine çalışmaların büyük çoğunluğu medikal ve veteriner öneme sahip patojenler üzerine yoğunlaşmıştır. *Culicoides* türlerinin naklettikleri patojenler en ciddi olarak ruminantları etkilemektedir (8).

Genel olarak nativ *Culicoides* türleri bölgeye dışarıdan gelmiş memelilerin patojenlerini nakledemezler (62, 77-80). Buna karşın bu yerli türler özellikle kuş ve keseliler olmak üzere nativ omurgalıların virusları ile ilişkilidirler (62, 81).

Nematodlar

Culicoides türlerinin vektörlüklerini yaptıkları nematodlar yalnızca *Filarioidea* üst ailesinde bulunan nematodlardır. Bu nematodların bazıları gerek insanlarda gerekse hayvanlarda parazitizme yol açmalarına karşılık yüksek patojeniteye sahip değillerdir. *Culicoides* türlerinin naklettikleri türler arasında *Onchocerca sweetae*, *O. gibsoni*, *O. gutturosa*, *O. cervicalis*, *O. reticulata*, *Dipotalonema perstans*, *D. ozzardi*, *D. marmosetae*, *D. streptocercum*, *D. cauduspina*, *D. gracile*, *D. llewellyni*, *Splendidofilaria californiensis*, *S. picacardina*, *Chandierella quscali*, *C. striatospicula*, *C. chitwoodae*, *Eufilaria longicaudata*, *E. bartlettae*, *E. delicata*, *E. kalifai*, *Macacanema formosana*, *Cercopithifilaria johnstoni*, *Durikainema macropi* ve *Ornithofilaria fallisensis* gibi nematodlar bulunmaktadır (82-88).

Protozoa

Culicoides türleri yalnızca *Haemosporidea* takımındaki protozoonların vektörlüğün yapmaktadır. Bu protozoonların çoğu kuş parazitleridir. Protozoonlardan *Hepatocystis kochi*, *H. brayi*, *H. levinei*, *Lecucocytozoon* sp. *L. caulleryi*, *Haemoproteus meleagridis*, *H. danilewski*, *H. fringillae*, *H. nettionis*, *H. meleagridis*, *H. desseri*, *H. canachites*, *H. velans*, *Trypanosoma* spp., *Try. bakeri*, *Try. chabaudi*, *Try. davidmolyneuxi*, *Try. evertii*, *Try. gentilnii* ve *Try. avium* türler bu sinekler tarafından taşınmaktadır (8, 89-93).

Viruslar

Culicoides türleri bazı önemli nematod ve protozoon parazitlerini de naklettikleri halde esas itibariyle en önemli vektörlük rolleri naklettikleri viruslardan gelmekte olup bu viral hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Culicoides* türleri başta ruminantlar ve atlar olmak üzere birçok hayvan türüne çeşitli virusları nakledebildikleri halde insanlara yalnızca bir virüs türünü (Oropouche) nakletmektedirler. Naklettikleri viruslar arasında Orbiviruslar (African horse sickness, Bluetongue virüs, bunyiip creek, CSIRO village, D'Aguilar, Epizootic hemorrhagic disease virüs, Equine encephalosis

virüs, Eubenangee, Kasba, Letsitele virüs, Marrakai, Midjinbarry, Nyabira, Wallal, Warrego, Wongorr), Bunyaviruslar (Akabane virus, Aiono virus, Ananindeua, Belmont, Bunyavirus sp., Douglas virüs, Keterah), Alphavirus (Barmah forest), Lyssaviruslar (Barur, Bivens arm, Bovine ephemeral fever virüs, Humpty Doo, Kimberley, Ngaingan, Tibrogargan) ve Vesiculovirus (Vesicular stomatitis, New Jersey strain) yer almaktadır (8, 62, 94-100).

***Culicoides* ile İlgili Olan Fakat Nakledilmeyen Diğer Organizmalar**

Culicoides türleri ile mikroorganizmler arasındaki ilişkiler hakkında birçok araştırma yapılmış olup bu sineklerin viruslar, bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve nematodlar gibi birçok organizmayı taşıdıkları saptanmıştır (101). Bu organizmaların birçoğunun kommensal simbiyont oldukları kanıtlanmış olup *Heleidomermis* soyundaki mermithid nematodların *Culicoides* türleri için oldukça patojen oldukları ve sinek popülasyon dinamiklerini etkiledikleri bildirilmiştir (102).

Ceratopogonidlerin mermithid parazitleri Palearctic, Nearctic, Oriental ve Afrotropical bölgelerden rapor edilmiştir. Debenham (103), Avustralyan *Forcipomyia (Lasiohelea)* türlerinde nematodların varlıklarını rapor etmiş, bunların muhtemelen mermithid olabileceğini bildirmiştir (102).

Genellikle mermith parazitlerle enfeste sinek larvalarının büyük çoğunluğu bu parazitler tarafından öldürülürler. Mermithidler bazen yetişkin sinekleri de enfeste edebilmekte olup bu sineklerde normal olmayan morfolojik karakterler görülmektedir (104). Enfeste yetişkinlerde en sık görülen semptomlar erkek genital organlarında, antenlerde, palplerde ve ağız parçalarında görülmekte olup erkeklerde dişilere benzer karakteristik özellikler şekillenmektedir (104).

2.1.4 *Culicoides* Türlerinin Yayılımı

Culicoides türlerinin ve diğer insektlerin yayılımı genellikle kısa mesafeli veya uzun mesafeli olabilmektedir. Vektörlerin yayılım karakterleri üzerine yapılan birçok çalışma bitki viruslarının vektörleri üzerinde odaklanmış olup *Culicoides* türlerinin davranışlarının tahmin edilebilmesi henüz tam anlamıyla uygulanabilir değildir (105).

2.1.4.1 *Culicoides* erginlerinin kısa mesafe hareketleri

Culicoides erişkinleri genellikle zayıf uçucular olup 10 km'nin üzerindeki uzun mesafelere uçabilmeleri için rüzgara ihtiyaç duyarlar (36). Avusturalya'da yapılan çalışmalarda *Culicoides* erişkinlerinin uçuş mesafeleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda *C. flumineus*, *C. immaculatus*, *C. molestus* ve *C. subimmaculatus* için 400m ve *C. longior* için 800m (64), *C. ornatus* için 1,6-3 km (64, 106), *C. brevitarsis* için 40 m-2 km (107, 108) ve *C. marmoratus* için 16 km'lik (64) uçuş mesafeleri tespit edilmiştir.

2.1.4.2 *Culicoides* erginlerinin uzun mesafe hareketleri

İnsektlerin uzak mesafelere uçabilmeleri oldukça zordur. İnsektlerin uçuş mesafelerini ve davranışlarını kıyaslamak için karada veya karaya yakın seviyelerde [örn., direk tuzakları (109), vakum tuzakları (110), ışık tuzakları (111)], karaya yakın su kenarlarında (112), düşük rakımlarda (113) ve yüksek rakımlarda (114) gibi değişik birtakım teknikler kullanılmıştır.

Vektörlerin uzak mesafelere uçuşlarının indirekt ve tesadüfi kanıtları, rüzgar yörüngesindeki hastalık salgınları (115, 116) veya egzotik virüs istilalarına dayandırılarak değerlendirilmektedir (117, 118). Bu fenomen *Culicoides* türleri tarafından nakledilen 6 virus üzerinde Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Avusturalya bölgelerinde çalışılmış ve bu fenomenun oldukça yaygın olduğu ve ortak seyrettiği gözlemlenmiştir (119-121).

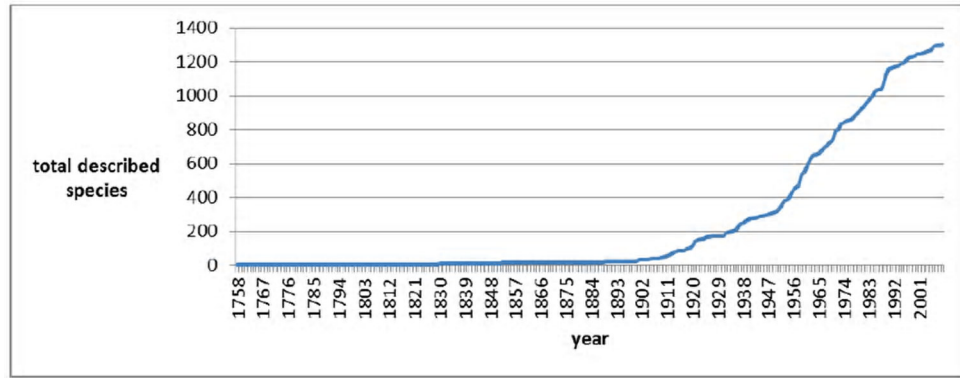
Son yıllarda elde edilen genetik bilgiler ışığında Haemotophagous insektlerin uzak mesafe uçuşları hakkında kanıtlar sağlanmıştır. Chapman ve ark. (122), Papua Yeni Gine ile Kuzey Avusturalya'daki sivrisinek popülasyonları arasında gen aktarımı olduğunu göstermişlerdir. Yine Kuzey Akdeniz ve Kuzey Afrika arasında *C. imicola* türlerinin multiple istilalar gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir (123).

2.1.5 Sistematik

Ekonomik önemlerine rağmen *Culicoides* türlerinin erişkinlerine muhtemelen çok küçük ebatlarda olmalarıyla ilişkili olarak önceki taksonomi araştırmacıları tarafından yeterli önem verilmemiştir (8). *Culicoides* türleri ilk kez 1758 yılında Linnaeus tarafından bildirilmiş ve 1900'lü yıllarda 22 tür tanımlanmıştır (8). Bu yıldan sonra tanımlanan tür sayısı Wirth'in (124) yeni sınıflandırmada monografi formatına kadar

hızlı bir şekilde artmıştır (Şekil 2.3). Japonya (125), Mikronezya (68); Papua Yeni Gine (68, 126), İngiltere (14), Filipinler (127), Doğu Afrika (128), Laos (129), Rusya (130), Güneydoğu Asya (22) ve son olarak da Çin'i (131) de kapsayan monografiler dünyada tanımlanan *Culicoides* türlerine çok büyük katkı yapmıştır. Taksonomik aktivitedeki bu büyük oran ve hareketliliğin 1990'lı yıllardan sonra düşmeye başladığı görülmektedir (Şekil 2.3) (8).

Culicoides cinsi barındırdığı türler açısından oldukça zengindir. Dünyadaki ilk fauna hakkındaki dokümanlar Arnaud (125) tarafından girilmiş olup 671 türün listesini çıkarmıştır. Daha sonra Arnaud ve Wirth (132) bu listeyi güncellemiş ve 671 türün üzerine 244 yeni tür ilave etmişlerdir. Wirth ve Dyce (133) *Culicoides* soyunda bulunan tür sayısını liste vermeksizin 1123 olarak rapor etmişlerdir. Daha sonra Boorman ve Hagen (134) 1537 türlü yeni bir liste yayımlamış, fakat sinonimleri tanımlamamışlardır. Bu sebeple araştırmacıların bildirdiği toplam sayı geçerli türlerin gerçek sayısını yansıtmamıştır. Borkent ve Wirth (135) geçerli tür sayısının 1247 olduğunu belirtmiş ve bunlardan 37'sinin fosil tür olduğunu kaydetmişlerdir. Bu liste Borkent (1) tarafından interaktif olarak yayımlanmış ve Şubat 2012'de toplam sayı 1366'ya çıkarılmıştır. Bununla birlikte *Culicoides* soyu içerisinde henüz tarif edilmemiş çok sayıda kriptik türlerin mevcut olduğu bilinmektedir. Örneğin, Dyce (136), Avustralasya faunasında 118 tarif edilmemiş türün olduğunu işaret etmiştir. Aynı şekilde Meiswinkel ve ark. da (46) Güney Afrika'da yaklaşık 40 tarif edilmemiş türün varlığını bildirmişlerdir. Ilango (137) Hindistan'dan 26 türün kaydını yapmıştır. Borkent'e (1) göre Hindistan'da tarif edilmiş olan toplam 48 türün, Laos [62 tür kayıt edilmiştir (129)] gibi coğrafik olarak daha küçük yüzölçümlü ülkelerle kıyaslandığında oldukça düşük kaldığı ve muhtemelen Hindistan'da tarif edilmemiş tür sayısının daha yüksek olduğu hipotez edilmiştir.



Şekil 2.3 *Culicoides* soyundaki tarif edilmiş yeni türlerin yıllara göre dağılım oranları (1).

2.1.5.1 Generik sinonimler

Culicoides cinsi ilk olarak Latreille (1809) tarafından *Ceratopogon punctatus* olarak tarif edilmiş ve yaklaşık 100 yıllık bir periyotta bu sınıflandırma geçerli kabul edilmiş ve bu yıldan sonra türler çoğunlukla *Ceratopogon* olarak sınıflandırılmışlardır. *Culicoides* soyunun sinonimleri olarak *Oecacta* Poey 1853; *Psychophaena* Philippi 1865; *Haematomyidium* Goeldi 1905; *Cotocripus* Brethes 1912; *Oxyhelea* Kieffer 1921; *Diplosella* Kieffer 1921; *Haemophoructus* Macfie 1925; *Synhelea* Kieffer 1925, *Prosapelma* Kieffer 1925 ve *Neoculicoides* Boorman ve Lane 1979 gibi isimlendirmeler yapılmıştır (8). Özellikle *Oxyhelea*, *Prosapelma* ve *Neoculicoides*, Borkent (1) tarafından geçerli alt soylar olarak klasifiye edilmişlerdir.

2.1.5.2 Subgenerik Klasifikasyon

Culicoides soyundaki gibi çok büyük ve geniş soylarda türlerin tamamının klasifikasyonlarını yapmak oldukça zordur. Soyların evrimleşme süreçlerinin anlaşılması ve ilgili türleri gruplandırılması mavidil virusunun muhtemel kompetent vektörünün *Avaritia* alt soyuna ait türlerin olduğu spekülasyonlarına yol açmıştır (79). Bu spekülasyon, son yıllarda Avrupa'da benzeri görülmemiş salgınlarda bu alt soya ait birçok türün Mavi Dil virusunun orijinal vektörleri olduklarının belirlenmesiyle desteklenmiştir (138).

Root ve Hoffman (139), Nearktik fauna üzerinde çalışarak *Culicoides*'lerin sınıflandırmasında yaptıkları subgenerik kalsifikasyonla ilk teşebbüsü yapmışlar ve takiben de Edwards ve ark.(140) da Palearktik bölgelerdeki fauna üzerinde benzer klasifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Fox (141) ve Vargas (142) ilaveten 2 alt soy oluşturmuştur. Wirth ve Blanton (70), resmi bir alt soy taksa oluşturma olayından

kaçınmış ve daha büyük faunaların incelenmesi için ve “prioriat kuralları ve nomenklatör sistemi” oluşturulana dek beklemeyi tercih etmiştir. Türleri gayriresmi tür grupları içerisinde yerleştiren bu sistem yaygın olarak benimsenmiş ve halen formal alt soylardan (29 soy) daha çok sayıda resmi alt soy içerisinde yerleşmemiş grup (39 soy) bulunmaktadır (1).

Tür gruplarının birçoğu tüm *Culicoides* faunasını dikkate alan çalışmalardan daha ziyade bölgesel faunalardaki revizyonları takiben oluşturulmaktadır. Bu nedenle, Campbell ve Pellham-Clinton'un (14) İngiliz faunasında ve Khamala ve Kettle'in (128) da Doğu Afrika faunasında yaptıkları revizyonlara dayalı monografik çalışmalar, türleri coğrafik bölgelerine spesifik gruplar şeklinde uygun yerlere yerleştirmektedir. Bazı bilinen tür grupları muhtemelen monofiletik ve alt soy gibi değerlendirilirken, Campbell ve Pellham-Clinton'un (14) Segnis tür grubu Vargas (143) (*C. subg. Wirthomyia*) tarafından subgenerik durumuna yükseltilmiştir.

Borkent ve Grogan (2009), *Culicoides*'lerin mevcut subgenerik sınıflandırmalarının tatmin edicilikten uzak olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, monofiliyi denemesi veya subgenerik grupların akrabalıklarının saptanması amacıyla hiçbir filogenetik analiz yapılmadığını ve morfolojik özelliklerin öneminin genellikle kesin olmadığını ve morfolojiye göre yapılan çalışmalarda bir grubun içerisinde yer alan dişilerin ilgili gruba yakınken, aynı grup içerisinde bulunan bazı erkeklerin ise farklı bir gruba yakın olduğunu belirtmişlerdir. İsimlendirilmiş alt soyların test edilmemiş olması sıklıkla alt soyların sinonimi içine yada dışına çıkarılmasına ve aynı zamanda türlerin *Oecacta* gibi alt soy durumu zayıf olan alt soylara türlerin yerleştirilmesine yol açmıştır (133). *Culicoides Wirthomyia* alt soyu sinonimiye alınıp sonra çıkarılan subgeneralara bir örnektir. Bu subgenera Vargas (143) tarafından oluşturulmuş, Wada (144) tarafından ise yok sayılmış ve "Segnis grup" olarak isimlendirilmesi tercih edilmiş, Remm (145) tarafından *C. subgen. Oecacta* olarak değerlendirilmiş, Delécolle ve Kremer (146) tarafından yeniden ortaya sürülmüş ve Wirth ve ark. (147), Glukhova (130) ve Phillips ve ark. (148) tarafından da alt soy statüsü doğrulanmıştır. Bu alt soyun mevcut durumu tam net olmayıp Yu ve ark. (131) tarafından yapılan son düzeltmeye göre *Wirthomyia* alt soyunun tipik türü olan *C. segnis*, *C. subgen. Oecacta* içerisinde yerleştirilmiş ve ilgili soy altı tekrar yok sayılmıştır. Yu ve ark. (131) bu sinonimi üzerine herhangi bir

hareketlilik önermemiş ve Borkent de (1) mevcut sinoniminin doğruluğuna dair görüş bildirmiştir.

2.1.6 *Culicoides* Türlerinin Klasifikasyonunda Morfolojik Karakterlerin Kullanımı

Culicoides türlerinin sistematikleri üzerinde önceki çalışmalarda kullanılan morfolojik özelliklerin birçoğu ya erkeklere ya da dişilere spesifiktir. Bununla birlikte kanatlardaki desenler her iki cinsiyet için de kullanılmaktadır. Kanatlardaki bu desenler erkek ve dişi cinsiyetlerde türlerle ilgili en önemli ortak noktaları oluşturmaktadır. Dişilerin morfolojik özelliklerinde sıklıkla kullanılan özellikler arasında; kanat macrotrichiası, mesonatal desenler, göz ayrımı, 3. palpal segmentin şekli, mandibular dişlerin sayısı ve şekilleri, cibarial armature, spermatekanın genişliği, sayısı ve şekli, distalden proximale antennal segmentlerin uzunluk oranları, birinci ve ikinci arka tarsal segmentlerin uzunluk oranları, costal damarların ve kanatların uzunluk oranları, proboscis ve başın uzunlukları yer almaktadır. Erkeklerin morfolojik özellikleri arasında ise; erkek aedeagus ve paramerlerinin şekli, 9. sternit üzerinde spikülün varlığı, 9. tergite üzerindeki postero-lateral çıkıntılarının gelişim derecesi, gonocoxit'in dorsal ve ventral kökünün gelişim derecesi gibi özellikler yer almaktadır (1, 8).

2.1.7 Moleküler İdentifikasyon

İnsektlerin ve diğer canlıların identifikasyonlarının yapılması amacıyla DNA tabanlı moleküler analizler 1980'li yıllardan beri kullanılmaktadır (8, 149). Standard DNA bölgelerinin kullanımı Hebert ve ark. (150) tarafından "DNA barkodlaması" olarak isimlendirilmiştir. Türlerin isimlendirilmesi ve taksaların sistemik yerleşimine yardımcı olmak amacıyla rutin DNA kullanımına olan ilgi sonucu moleküler taksonomi çalışmaları hız kazanmıştır (151). Kullanılan DNA teknikleri, morfolojistler tarafından yapılan sistemik hipotezlerin test edilmesinde çok güvenilir teknikler olsa da bazı çalışmalarda geleneksel taksonomi tabanlı çalışmalara da ihtiyaç duyulabilmektedir (152). Modern çalışmalar, Dayrat'ın (153) "integrative taksonomi" modelini kullanma eğilimindedirler (154).

DNA barkodlama prensibi, tüm türlerin mitokondrial cytochrome oxidase I (COI) gen bölgesi içerisinde ortak bir m-DNA'ya sahip oldukları temeline dayanmaktadır (150). Ancak benzer barkodları paylaşan çeşitli türler de bulunmaktadır (152, 155). Yine çok

sayıda farklı haplotiplere sahip tek türler de bulunmaktadır (123). Barkodlamanın esas amacı, tanımlanmış türlerin identifikasyonlarının yapılması olup hayat siklusundaki farklı dönemlerin de ayrımlarının yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Morfolojik özelliklere bakılarak yapılan identifikasyonlar insektlerin hayat sikluslarının farklı dönemlerinin ayırımında yetersiz kalabiliyorken DNA barkodlama tekniği sayesinde türlerin farklı dönemlerde ayırımı da çok daha kolay olmaktadır. Örneğin bazı dişi veya olgunlaşmamış dönemdeki örneklerde morfolojik ayırım olanaksızken, COI barkodlaması bu örneklerin ayırımına da imkan vermektedir. Genellikle COI barkodlaması ve morfolojik ayrımlar birlikte kullanılmaktadır. DNA taksonomisinin türlerin belirlenmesinde ve morfolojik olarak ayrılamayan kriptik türlerin ayırımında çok kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır (156).

2.1.8 *Culicoides* Türlerinin DNA Analizi

Culicoides türleri üzerine ilk genetik analizler Tabachnick (157) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı (157) starch jel elektroforezi kullanarak *C. variipennis*'in farklı alt türlerinin genetik farklılıklarını belirlemek amacıyla 7 izo-enzim kullanmıştır. Bu çalışma sonucu 3 alt tür, tür seviyesine yükseltilmiştir (158).

Culicoides türlerinin ayırımında PCR teknolojisinin ilk kullanımı, Nearktik *Culicoides* türlerinin ayırımında polimorfik DNA'yı rastgele çoğaltan tRNA'yı bulan Raich ve ark. (159) tarafından gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda, COI, COII, 16S, ITS-1 ve ITS-2 DNA bölgelerini kullanarak yapılan genetik analizler ve rapid amplified polymorphic DNA markerları morfolojik olarak ayrımları oldukça zor olan *Culicoides* türlerinin ayırımında başarıyla kullanılmaktadır (8).

Bu çalışmaların büyük çoğunluğu Avrupa'da yapılmış olup genellikle veteriner önemi olan *Avaritia* ve *Culicoides* alt soyları üzerine yoğunlaşmıştır (3, 4, 21, 160-164). Subgenerik gruplandırma ITS-1 (165) ve COI ile COII (166) gen bölgeleri bazı gruplar için kullanılmış olup bu genlerin tür ayırımında oldukça etkili oldukları rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları kriptik türlerin varlığını ortaya çıkarmış ve sadece morfolojik bilgilere göre yapılan önceki sinonimlerde düzeltmeler yapılması ihtiyacını doğurmuştur (4, 161).

Subgenerik gruplandırmaların test edilmesi amacıyla moleküler tekniklerin kullanımı daha az dikkate alınmıştır. Bunun muhtemel sebebi morfolojik olarak benzer gruplar içerisindeki vektör türlerinin ayrımındaki ekonomik öncelikler olabileceği düşünülmektedir (örn. Avrupa’da Mavi Dil virusunun naklinden sorumlu *Obsoletus* ve *Pulicaris* grupları). Sebastiani ve ark. (164) ve Linton ve ark. (162) *Avaritia* alt soyunun *Imicola* kompleksindeki Afrotropikal türlerin filogenik araştırmalarında COI gen bölgesini kullanırken, Gomulski ve ark. (167) aynı alt soyda yer alan *Obsoletus* kompleksindeki türlerin araştırılmasında ITS-2 gen bölgesini kullanmışlardır. Perrin ve ark. (165) *Culicoides* soyundaki Fransa türlerinin filogenisinde ITS-1 genini kullanmıştır. Matsumoto ve ark. (166) Japonyada inceledikleri bazı türlerinin morfolojik analiz sonuçlarıyla COI+COII filogenetik analizleri arasında kuramamışlardır.

Ceratopogonidae soy seviyesinde genelde çalışılmamış olup yalnızca bir çalışmanın varlığı görülmektedir. Bu çalışmada (168) COII gen bölgesi kullanılmış ve *Ceratopogonidae*’nin soy seviyesinde analizlerinde muğlak sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar (168) çalışmalarında data setlerinde bulunan her ne kadar üç *Culicoides* türünü ayırabilmişler de bu üç türün birlikte gruplanma göstermemiş olması ilgili genin bu aile için sınırlı bir kullanımının olduğunu göstermiştir. CAD gibi nükleer markerların kullanıldığı insektler üzerindeki diğer çalışmalar (169-171) bu gen bölgesinin kullanışlı olduğunu kanıtlamış ve *Culicoides* soyundaki çeşitli grupların çözümlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir (8).

2.2 KANATLI HAEMOSPORIDIAN PARAZİTLERİ

Apicomplexa anaç altında kanatlılarda enfeksiyona yol açan Haemosporidia takımındaki *Hemoproteus*, *Leucocytozoon* ve *Plasmodium* soylarındaki türler, özelleşmiş organellerden oluşan ve konak hücreye penetrasyonda önemli olan bir apikal kompleks yapıya sahip olup vektör kaynaklı (vector-borne) karakterdedirler. Vektör-kaynaklı hastalıklarda bulaşma etkinliği geniş olarak vektörlerin biyolojik ve ekolojik özelliklerine bağlıdır. Vektör popülasyonlarında ekolojik çalışmalar farklı kanatlı komünitelerinde Haemosporidianların yayılışı ve dinamikleri açısından kilit role sahiptir. Bu kısımda *Culicoides* türlerinin vektörlüğünü yaptığı Haemoproteidae ailesindeki Haemosporidian parazitler hakkında bilgiler verilmiştir.

2.2.1 *Haemoproteidae* Ailesindeki Parazitlerin Morfoloji ve Biyolojisi

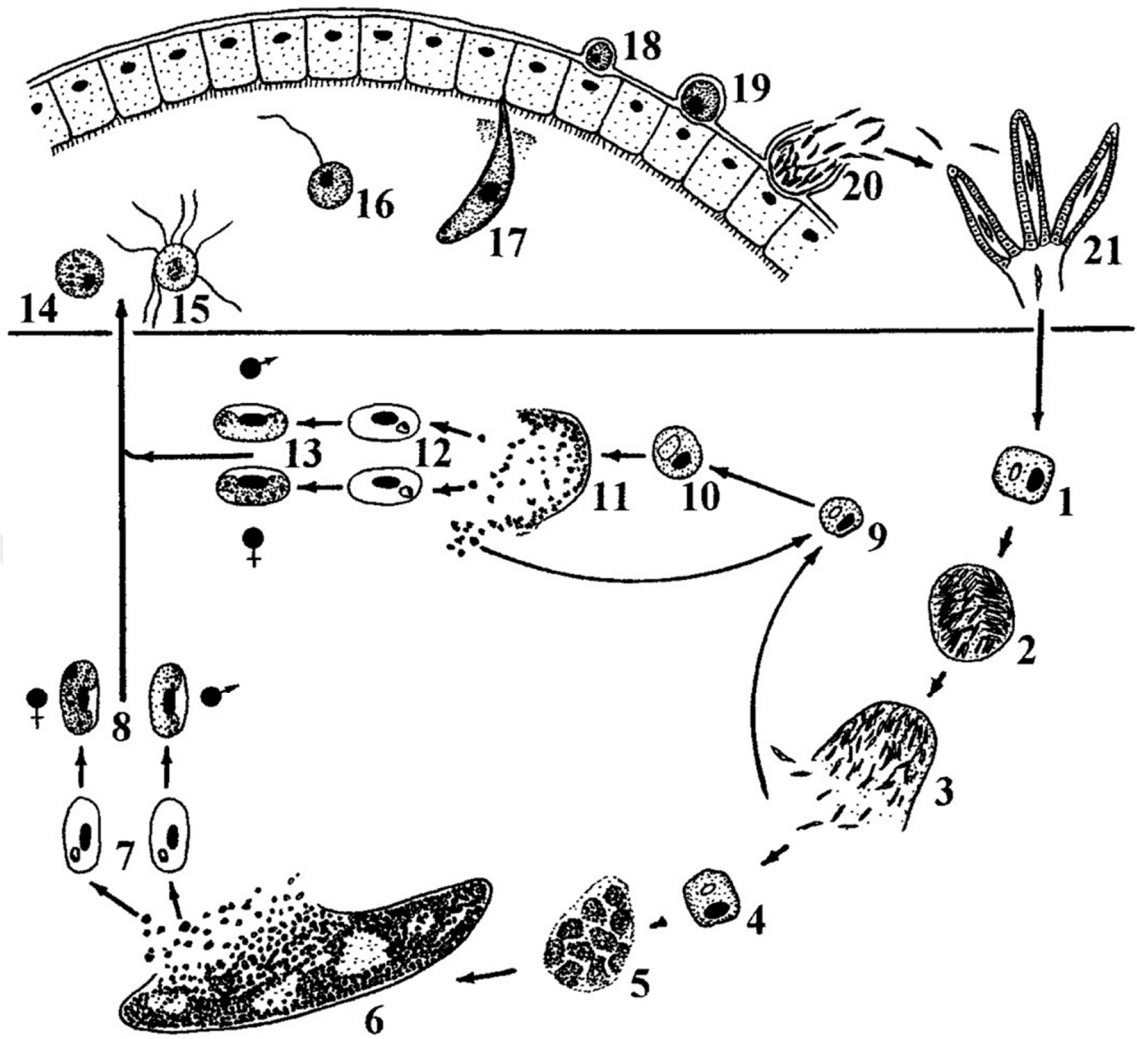
Zorunlu heteroksen olan Haemosporidian parazitlerin yaşam döngüleri oldukça karmaşıktır. Gelişimleri sırasında konaklarını ve üreme şekillerini değiştirerek morfofonksiyonel açıdan çeşitli gelişim aşamalarını oluştururlar. Kanatlı Haemosporidianların gelişimi genele oranla daha anlaşılırdır. Parazitler, omurgalı hayvan (kuş) ve vektörler (kan emici dipteranlar, Insecta: Diptera) olmak üzere iki konak grubunda gelişim göstermektedirler. Seksüel siklus gametogony ve takiben gelişen sporogony safhaları vektör sineklerde geçmektedir. Beslenme esnasında vektörler sporozoitleri kanatlılara inokule ederler ve agamik basamağa geçerler. Bu basamak, ekzoeritrositik meront veya şizont safhası olarak bilinir. Merontlardaki multiple veya agamoz bölünmenin bir sonucu olarak uninükleer merozoitler şekillenir. Ekzoeritrositik merozoitler yeni bir merogoni safhasını ve/veya kan hücrelerinde seksüel siklusun gelişimini oluşturan gametositler veya gamontları indükler. Gametositler, morfolojik olarak farklı yapıları makrogametosit ve mikrogametositler olup seksüel potansiyele sahip gametleri (unizogamet) üretirler. Makrogametleri üreten hücreler makrogametosit, mikrogametleri oluşturanlar da mikrogametosit olarak bilinirler. Makrogametositler seksüel dimorfik karakterlerinden ötürü kolaylıkla mikrogametlerden ayırt edilebilirler. Makrogametosit çekirdekleri nükleolusa sahipken mikrogametlerde bu oluşum yoktur. *Haemoproteidae* ve *Plasmodiidae* ailelerindeki türler ayrıca pigment granüllerine (hemozin) sahiptirler. Gametositlerdeki seksüel dimorfizm Haemosporidian parazitlerin ayırt edici özelliklerinden biridir. Gametositler vektörler için enfektiftir (172).

Kanatlılardaki enfeksiyon şu şekilde meydana gelmektedir: 1-Prepatent evre; bu safhada parazitler kan dokusu dışında dokulara yerleşirler ve çok sayıda merozoitin oluşumunu sağlayacak şizontları geliştirirler. 2-Akut safha; bu dönemde çok sayıda merozoit kan dokusuna ulaşır ve kan hücrelerini enfekte ederler ki, bu evre kanda parazitlerin görülmesi ve paraziteminin keskin bir şekilde artmasıyla karakterizedir, 3-Kriz safhası; parazitemi pik safhaya ulaştığında görülür, 4- Kronik safha ve 5-Latent enfeksiyon; parazitemi keskin bir şekilde düşer ve daha sonra konağın immun sistemine bağlı olarak parazitler elimine olur (172).

Genel bir kural olarak parazitler kuşlarda daimi bir şekilde kalırlar. Bir kuş bir kere enfekte olduktan sonra yıllarca parazitin taşıyıcılığını yapar ve böylelikle potansiyel bir

enfeksiyon kaynağı adayı olur. Vektörler enfekte kanatlılardan beslendikten kısa bir süre sonra gametositler vektörün bağırsaklarında gametogenezise uğrar ve oogami tip seksüel safha şekillenir. Gametogenezisin şekillenmesinde oksijen ve karbondioksit konsantrasyonları, en belirgin uyarıcı görevi görmektedir. Bir makrogametosit bir makrogamet üretirken diğer yandan bir mikrogametosit de exflagellation safhasına geçer. Fertilizasyon extracellular olarak şekillenir ve zigot teşekkül eder. Takiben zigot uzamış ve hareketli bir ookinete dönüşür. Ookinet, vektörün peritrofik membranına penetre olur ve bağırsak epitellerine geçer. Ookinet, bazal laminaya geçerek burada ookist şekline dönüşür. Ookist oluşum safhası süresince (sporogoni) ookistler içerisinde sayısız uzamış ve çekirdeksiz cisimcikler (sporozoitler) şekillenir. Daha sonra sporozoitler, hemosele geçer ve vektörün tükürük bezi hücrelerine penetre olurlar. Kanatlılar için enfektif form, sporozoit formudur. Vektör sineğin tükürük bezindeki sporozoitler, kan emme esnasında omurgalı konaklara nakledilirler. Zigot safhası hariç bütün gelişim dönemlerinde Haemosporidian parazitler haploid karakterdedir. Yalnızca zigot diploid kromozoma sahiptir (172).

Kanatlı Haemoproteidlerin hayat siklusu bilinen türlerden yalnızca %7'sinde çalışılabilmiştir. Hayat siklusunun genel olarak görünümü Şekil 2.1.'de verilmiştir. Ceratopogonidler ve Hippoboscidler kanatlı Haemoproteidlerin vektörüdürler (172).



Şekil 2.4 Kanatlı hemoproteidlerinin yaşam döngüsünün şematik görünümü (örnek *Haemoproteus mansonii*). Üst kısım vektörde; alt bölüm kanatlılarda: 1- endotel hücrede sporozoit; 2, 3- uzamış merozoitlerle birinci neslin ekzoeritrositik merontları; 4 - endotel hücre içindeki merozoit; 5, 6- sırasıyla iskelet kaslarında gelişen ve olgunlaşan megalomerontlar; 7- eritrositlerdeki merozoitler; 8- olgun gametositler; 9- dalaktaki retikuloendotelial hücrede merozoit; 10,11- sırasıyla dalakta gelişen ve olgunlaşan merontlar; 12-eritrositlerdeki merozoitler; 13-olgun gametositler;14-makrogamete;15-mikro-gametlerin exflagellasyonu;16-makrogametin fertilizasyonu;17-peritrofik membrana nüfuz eden ookinet;18-geçmiş ookist; 19, 20-sporogoni; 21-vektörün tükürük bezlerinde sporozoitler (172).

Ekzoeritrositik merogoni kanatlı epitel hücrelerinde şekillenir. Gametositler olgun eritrositlerin içinde gelişir. Merogoni kan hücrelerinde oluşmaz. Vektör tarafından kanatlı kan dolaşımına enjekte edilen sporozitler ekzoeritrositik meront gelişimini başlatır (173, 174). Sıklıkla merontlar akciğerlerde, daha seyrek olarak da karaciğer, dalak, böbrek, kalp, iskelet kası ve diğer organlarda bulunurlar. Merontlar, akciğer endotel hücrelerinde farklı şekillerde görülebilirler. Merontlar gelişimleri süresince birçok çekirdek içeren bölümlere (sitomerler) ayrılabilirler.

Merontların büyüklükleri değişken olmakla birlikte genellikle 100 µm civarındadırlar. Akciğerdeki megalomerontlar merontlara oranla bir hayli büyüktürler. En büyük parazitin uzunluğu yaklaşık 400 µm kadardır. Parazitler kas fibrilleri boyunca yapışır ve kalın bir hyalin duvarla kaplanırlar. Birinci nesil merontlar kapillerlerin endotelinde ve myofibroblastlarda gelişirler. Bu merontlar 20 µm uzunluğa erişebilir ve uzamış merozoitleri meydana getirirler. İkinci nesil merontlar (megalomerontlar) enfeksiyondan 17 gün sonra olgunlaşırlar ve içerisinde yuvarlak şekilde 1µm genişliğinde merozoit içerirler (172) .

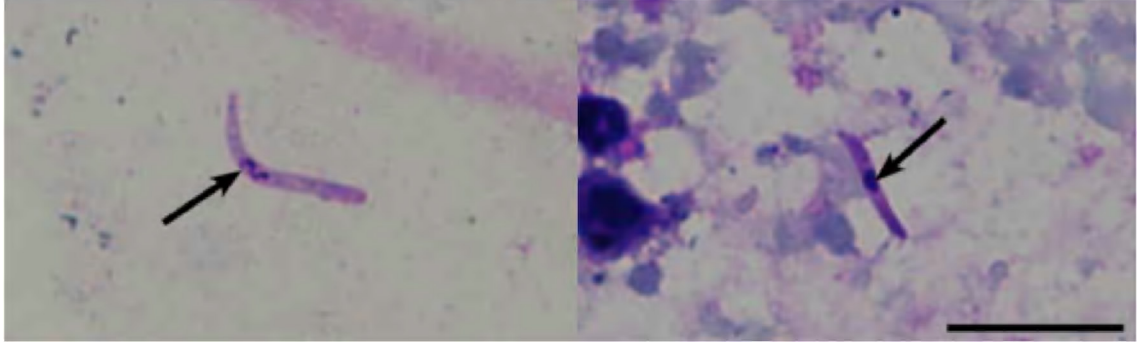
Haemoproteid türlerin büyük bir kısmının prepatent süresi 11 gün ile 3 hafta arasında değişmektedir. Yalnızca gametositler kan hücreleri içerisinde gelişim göstermektedir. Malaryal pigment (hemozoin) altınimsı kahverenkli, kahverenkli veya siyah renkteki granül formlarının içindeki gametositlerde şekillenir. Gametositlerdeki bu pigmentlerin sayısı, şekli ve pozisyonları türlerin ayırımında kritik rol oynamaktadır (172).

Merozoitlerin eritrositlere penetrasyonu takiben 2.-6. günleri arasında gametositler görünmeye başlar. Daha sonra gametositlerin gamet üretebilme kabiliyeti düşer. Enfekte kanatlıların (sıklıkla 1000 eritrosit başına birden az) kanındaki canlı gametositlerin çok azı iç organlarda merogoni safhasında hayatta kalabilmektedir.

Güncel verilere göre gametositlerin morfolojileri ve enfekte eritrositler üzerindeki etkileri tür ayırımında temel teşkil etmektedir. Enfekte kanatlılardan beslenmeyi takiben birkaç dakika içerisinde, vektörün bağırsaklarındaki olgun gametositler yuvarlaklaşmaya başlar ve eritrositlerden çıkarlar. Bütün Haemosporidianlarda gametogenesis, fertilizasyon, zigot gelişimi ve ookinetler uniform bir yapıda gelişir. Ayrıca ookinet gelişimi süresince ookinetin distal ucunda rezidüel bir cisimcik şekillenir. Bu cisimcik bir parça sitoplazmaya ve pigment granüllerine sahiptir. Mikrogametlerin uzunluğu, zigotun yapısı, ookinetlerin büyüklüğü ve oranları türlere göre değişiklik gösterebilmektedir (175).

Ookinetler vektör bağırsağının epitel sınırlarına göç eder ve bazal laminada ookistlere dönüşür. Ceratopogonid ve Hippoboscid sineklerdeki Haemosporidian türlerin sporogoni safhaları farklıdır. Kanatlı Haemoproteid türlerin büyük çoğunluğunun gelişimi Ceratopogonid'lerde meydana gelmektedir. Bu durumda tek germinatif merkeze sahip olan küçük ookistler şekillenmektedir. Sporozoitlerin ortalama uzunluğu

10 µm civarındadır (Şekil 2.5). Ceratopogonid'lerdeki sporogoni genellikle 10 günden daha az bir sürede tamamlanmaktadır (176).



Şekil 2.5 *H. noctuae* sporozoitleri (177)

Olgun ookistler genellikle parçalanmakta ve sporozoitler vektör hemoceline penetre olmaktadır. Ookistlerden sporozoitlerin kademeli salınımı birçok Haemoproteid türünde gözlemlenmektedir. Bazı sporozoitler kan emen insektlerin tükürük bezine penetre olmaktadır.

2.2.2 Haemoproteidae Türlerinde Epidemiyoloji

Haemoproteus türleri evcil ve yabani kanatlılarda oldukça yaygın bir şekilde seyretmektedir. Kanatlılarda yapılan çalışmalarda, 72 farklı aileden, 130'un üzerinde *Haemoproteus* türü olduğu rapor edilmiştir (172, 178). *Haemoproteus* türleri, özellikle Coraciiformes, Piciformes ve Galliformes dizilerinde, morfolojik çeşitlilik ve tür sayısı bakımından yüksek bir diversiteye sahiptir. Ancak bu türler, Passeriformes dizisinde yer alan kuşlarda daha yaygın olarak görülmektedir. Ayrıca en fazla tür sayısı da Passeriformes dizisinden bildirilmiştir (179), (Tablo 2.1). Diziler arasında tespit edilen bu farklılığın, vektör sineklerin dağılımı-yaygınlığı ve kuşların yaşama alanları ile doğrudan ilişkili olduğu rapor edilmiştir (180), deniz ve sahil kuşlarında *Haemoproteus* prevalansının diğer kuşlara göre daha düşük oranda belirlenmesi, hippoboscid veya ceratopogonid sineklerin bu kuşları daha sınırlı enfeste edebilmesi ile ilişkilendirilmiştir (181). Bunun yanında düşük prevalans değerlerinin, konak dirençliliği ve immun yanıtla da ilgili olabileceği rapor edilmiştir (182, 183).

Tablo 2.1 Kanatlı haemosporidianlarının kanatlı dizilerinde yer alan ve araştırmalara dahil edilen kuş turlerindeki yzdesel dağılımı (179).

Kanatlı Takımı	Konak Turu	İncelenen Tür Sayısı	Enfekte Tür Sayısı	Enf. %
Sphenisciformes	16	16	0	0
Gaviiformes	4	3	0	0
Podicipediformes	21	7	0	0
Procellariiformes	100	30	0	0
Pelecaniformes	57	44	0	0
Tinamiformes	47	12	0	0
Apterygiformes	3	1	0	0
Struthioniformes	8	4	0	0
Ciconiiformes	124	89	40	45
Falconiformes	296	168	83	49
Strigiformes	162	66	49	74
Anseriformes	154	113	56	50
Galliformes	270	133	74	56
Gruiformes	203	87	47	54
Charadriiformes	339	154	36	23
Columbiformes	323	135	87	64
Psittaciformes	344	143	43	30
Cuculiformes	153	84	40	48
Caprimulgiformes	106	51	8	16
Apodiformes	414	75	20	27
Piciformes	402	201	60	30
Coliiformes	6	3	0	0
Coraciiformes	202	118	13	11
Trogoniformes	39	20	7	35
Passeriformes	5,211	2,409	2,047	85

Haemoproteus turleri, hippoboscid veya ceratopogonid vektör sinekler tarafından kan emme esnasında alınmaktadır. Ancak parazitin vektör sinek tarafından başarılı bir şekilde nakledilebilmesi, sporogoni evresinin tamamlanması, sporozoitlerin üretilebilmesi ve tükürük bezlerine ulaşmasına bağlıdır. Nitekim, bu safha bazı zamanlarda çeşitli faktörlere bağlı olarak tamamlanamadığı ve dolayısıyla naklin gerçekleşemediği yapılan araştırmalarda rapor edilmiştir (176, 184, 185). Ancak bu faktörler henüz tam olarak çözümlenememiştir (180).

Hippoboscid sineklerle nakledilen *Haemoproteus* türlerinin aynı şekilde ceratopogonid sineklerle de nakledilebilme olasılığı deneysel olarak ispatlanamamasına rağmen Bobwhite bıldırcınlarından izole edilen *Haemoproteus lophortyx*'te yapılan çalışmalarda, bu parazit türünün *Culicoides bottimeri*, *Stilbometopa impressa* ve *Lynchia hirsuta* türü sineklerle nakledildiği ve dolayısıyla hem hippoboscid hem de ceratopogonid sineklerle aynı parazit türünün naklinin mümkün olabildiği bildirilmiştir (186-188). Ancak *H. lophortyx* ile ilgili yapılan bu çalışma tekrar gözden geçirildiğinde çalışmada (187, 188) kullanılan vektör ceratopogonid sineklerde parazit taramasının yeterli ölçüde yapılamadığı dolayısıyla öne sürülen hipotezin tartışmalı olduğu rapor

edilmiştir (Tablo 2.2) (172). *Haemoproteus* türleri ve vektör spesifiteleri ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise (189), matemli kumrularda (*Zenaida macroura*) *Haemoproteus* türleri araştırılmış ve *Haemoproteus sacharovi*'nin bu konaklarda yüksek prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmada *H. sacharovi*'nin vektörü olarak bilinen hippoboscid sineklerin konak üzerinde veya çevresinde çok nadir olarak bulunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar (189) *H. sacharovi*'nin naklinde ceratopogonid sineklerin de rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak bu hipotez, diğer bilimsel çalışmalarla desteklenememiş ve yapılan son filogenetik çalışmalarda bu *Haemoproteus* türünün vektör spesifitelerinin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulanmıştır (190).

Tablo 2.2 *Haemoproteus* türleri ve aseksüel sporogonik gelişmelerini tamamladıkları hippoboscid (*Lynchia*, *Microlynchia*, *Ornithomyia*, *Pseudolynchia*, *Stilbometopa*) ile ceratopogonid (*Culicoides*) sinekler (180).

Tür	Konak Takımı	Vektör
<i>Haemoproteus nettionis</i>	Anseriformes	<i>Culicoides downesi</i>
<i>Haemoproteus columbae</i>	Columbiformes	<i>Pseudolynchia canariensis</i> <i>Pseudolynchia brunnea</i> <i>Microlynchia pusilla</i>
<i>Haemoproteus sacharovi</i> *	Columbiformes	<i>Pseudolynchia canariensis</i>
<i>Haemoproteus maccallumi</i>	Columbiformes	<i>Pseudolynchia canariensis</i>
<i>Haemoproteus turtur</i> †	Columbiformes	<i>Pseudolynchia canariensis</i>
<i>Haemoproteus palumbis</i>	Columbiformes	<i>Ornithomyia aviculria</i>
<i>Haemoproteus lophortyx</i> ‡	Galliformes	<i>Stilbometopa impressa</i> <i>Lynchia hirsuta</i> <i>Culicoides bottimeri</i>
<i>Haemoproteus mansoni</i>	Galliformes	<i>Culicoides sphagnumensis</i>
<i>Haemoproteus meleagridis</i> §	Galliformes	<i>Culicoides edeni</i> <i>Culicoides hinmani</i> <i>Culicoides arboricola</i> <i>Culicoides haematopotus</i> <i>Culicoides knowltoni</i>
<i>Haemoproteus handai</i>	Psittaciformes	<i>Culicoides nubeculosus</i>
<i>Haemoproteus velans</i>	Passeriformes	<i>Culicoides stilobezziodes</i> <i>Culicoides sphagnumensis</i>
<i>Haemoproteus fringillae</i>	Passeriformes	<i>Culicoides crepuscularis</i> <i>Culicoides stilobezziodes</i> <i>Culicoides sphagnumensis</i> <i>Culicoides impunctatus</i>
<i>Haemoproteus danilewskii</i>	Passeriformes	<i>Culicoides crepuscularis</i> <i>Culicoides stilobezziodes</i> <i>Culicoides sphagnumensis</i> <i>Culicoides edeni</i> <i>Culicoides knowltoni</i> <i>Culicoides arboricola</i>
<i>Haemoproteus balmorali</i>	Passeriformes	<i>Culicoides impunctatus</i>
<i>Haemoproteus dolniki</i>	Passeriformes	<i>Culicoides impunctatus</i>
<i>Haemoproteus tartakovskyi</i>	Passeriformes	<i>Culicoides impunctatus</i>
<i>Haemoproteus belopolskyi</i>	Passeriformes	<i>Culicoides impunctatus</i>
<i>Haemoproteus lanii</i>	Passeriformes	<i>Culicoides impunctatus</i>

Ceratopogonid sinekler tarafından nakledilen *Haemoproteus* türleri mevsimsel olarak kanatlı konaklara bulaşmakla birlikte bu bulaşma daha çok bahar ve yaz aylarında gerçekleşmektedir (191). Ancak subtropikal iklimlere sahip bölgelerde bulaşma, uygun vektör sineklerin varlığıyla birlikte yıl boyunca da meydana gelebilmektedir (192). Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde hippoboscid sineklerle nakledilen *H. columbae*'nin kanatlı konaklara bulaşması yine mevsimsel olmakla birlikte özellikle vektör sineklerin popülasyonlarıyla yakından ilişkilidir. Genellikle sonbahar ve kış aylarında bulaşma oranlarında artış görülürken vektör popülasyonunun düşmesiyle birlikte bulaşma oranlarında da önemli derece düşüş meydana gelmektedir (193). Tropik ve subtropik bölgelerde yapılan sınırlı sayıda çalışmalardan elde edilen veriler, hippoboscid sineklerin popülasyonlarının değişmemesi durumunda, *Haemoproteus* türlerinin bulaşma ve prevalans değerlerinin de yıl boyunca sabit kaldığını göstermiştir (194, 195).

Kanatlı konakların uzun mesafeli, kıtalararası göçleri ve göç davranışları, kanatlı haemosporidianlarının yaşam sikluslarını önemli derecede etkilemektedir (196-198). Nearktik ve Palearktik bölgelerde yapılan araştırmalardan elde edilen sınırlı veriler; kanatlı haemosporidian parazitlerin göçmen kuşlara, göç ettikleri üreme alanlarında, tropik ve subtropik bölgelerdeki kışlama alanlarında veya her iki alanda birden bulaşabildiğini ortaya koymuştur. Böylece bulaşmanın gerçekleşebilmesinde, belirli coğrafik alanların etkili olduğu ve coğrafik alanlardaki vektör-parazit ilişkilerinin de bulaşmada önemlilik arz ettiğini anlaşılmıştır (196, 199, 200).

Ilıman iklime sahip bölgelerde “bahar yükselmesi (spring relapse)” adı verilen sezonsal olarak parazit yoğunluğunun artması olayı, kanatlı konakların üreme mevsimleriyle aynı zaman diliminde gerçekleşmektedir. Ayrıca bu dönemde kan emen insektlerin ve yavru kuşların popülasyonlarında da artış görülmektedir (201). Hormonsal değişikliklerin enfeksiyonların seyri üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda *Plasmodium* kaynaklı kronik enfeksiyonların kortikosteron ile tetiklendiği ve nüks ettiği bildirilmiştir (202). Bunun yanında, fotoperiyoddaki artışların ve takiben sirkadiyen ritimleri düzenleyen melatonin gibi hormonların seviyesinde meydana gelen fizyolojik değişikliklerin *Plasmodium* enfeksiyonlarında olduğu gibi *Haemoproteus* enfeksiyonlarının da nüks etmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir (201). Ayrıca, bireysel konaklardaki enfeksiyon yoğunluğunun, enfeksiyonun ilk akut fazından sonra değiştiği ve konak immun yanıt,

fotoperiyoddaki mevsimsel değişmeler ile üreme zamanlarında meydana gelen hormonal değişikliklerin bu yoğunluğu ve kronik enfeksiyonların nükslerini etkilediği belirlenmiştir (180). Bunun yanında, konakların üreme eforu (203), besin arayışı (204), diğer parazitler ile konkominant enfeksiyonu (205) ve yırtıcılara maruz kalma sonucu ortaya çıkan strese bağlı olarak immun sistemde meydana gelen değişikliklerin de enfeksiyon yoğunluğunu etkilediği bildirilmiştir (206).

Kanatlı haemosporidianları, sahip oldukları yüksek diversite nedeniyle geniş çapta araştırılmış ve prevalansları başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. Diğer hematozoan türlerinde araştırmalara dahil edilmesiyle birlikte elde edilen veriler daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmeye başlanmış ve bu parazitlerin diğer türlerle olan akrabalık ilişkileri analiz edilerek prevalansları belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen verilerin yüksek miktarda çeşitlilik arz etmesi konuyla ilgili daha farklı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğunu göz önüne koymuştur. Bu kapsamda yapılan çalışmalar, kayıt altına alınan verilerdeki çeşitliliğin; parazitlerin konak spesifitesi (207), konağın immun yanıtı (182), genotipi (208), yaşı ve cinsiyeti (209-211), konak türlerinin coğrafik dağılımı (212), konağın göç edip etmediği (191, 213-215), tüy rengi (216) ve konağın yiyecek arama ile yuva yapma davranışları (217, 218) gibi birçok iç ve dış faktörden kaynaklanabileceğini ortaya koymuştur.

Habitat, coğrafik bölge ve mevsim gibi dış faktörler, vektör dağılımı ve popülasyonu üzerinde oldukça kritik bir öneme sahiptir (181, 195, 219). Bu nedenle farklı bölgelerde yaşıyan aynı konak türündeki enfeksiyon prevalansı, vektör popülasyonu ve dağılımında meydana gelen farklılıklar nedeniyle önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir (181, 195, 219). Ancak, prevalans değerlerinde meydana gelen bu farklılıklar sadece vektör popülasyonu ve dağılımına bağlı değildir. Enfekte kuşların kış mevsiminde ölmesi ve yeni enfeksiyonların insekt vektörlerle enfekte olmayan yavru kuşlara bulaştırılması gibi faktörler de parazit prevalansında mevsimsel olarak değişikliklere yol açabilmektedir (180).

2.2.3 *Haemoproteidae* Türlerinde Klinik ve Patogenez

Klinik semptomlar düşük parazitemiyle seyreden enfeksiyonlarda genellikle belirleyici olmamaktadır. Fakat enfeksiyon, eritrositik paraziteminin görüldüğü ve dokulardaki merontların pik yaptığı akut safhada ise o zaman klinik olarak belirgin semptomlar

görülebilmektedir. *H. meleagridis* ile deneysel enfekte evcil hindilerin bir veya her iki bacaklarında topallık ve kontrol grubundakilere oranla önemli derecede kilo kaybı gözlemlenmiştir (220). Benzer şekilde *H. lophortyx* ile doğal enfekte Bobwhite bıldırcımında (*Colinus virginianus*) halsizlik, kabarmış tüyler ve deprese olmuş bir görünüm, denge kaybı gibi nörolojik belirtiler ve yürümekte güçlük gibi klinik semptomlar bildirilmiştir (221). Kaya güvercinlerinde enfeksiyona bağlı klinik belirtiler arasında halsizlik, anemi ve anoreksi gibi semptomlar bulunmaktadır (222, 223). Dolaşım kanında lenfosit, heterofil, bazofil, euzinofil ve monosit gibi hücrelerin sayısında artış meydana gelmesi doğal ve deneysel *Haemoproteus* enfeksiyonlarında gözlemlenmiş olup bu durum parazitin gerek eritrositik gerekse preeritrositik safhalarında hücrel immun yanıtın arttığına bir göstergesidir (224, 225). Enfekte ve enfekte olmayan mavi alakargada klinik olarak plazma protein ve hemoglobin konsantrasyonlarında, hematokrit değerlerinde ve kiloda çok önemli farklılıklar görülmemiştir (226). Yapılan diğer çalışmalarda *H. meleagridis* ile deneysel enfekte evcil hindilerde (Atkinson vd. 1988b) ve büyük baştankara (*Parus major*) türünde *Haemoproteus* spp. (225). enfeksiyonlarında önemli derecede anemi görülmemiştir. Buna karşın, O'Roke (187) ve Cardona (221) *H. lophortyx* ile enfekte Kaliforniya bıldırcını (*Callipepla californica*) ve Bobwhite bıldırcımında (*Colinus virginianus*) şiddetli anemi tespit etmişlerdir. *Haemoproteus noctuae* (227) ile enfekte kar baykuşunda (*Bubo scandiacus*) ve *H. syrnii* (228) ile enfekte kar baykuşu, alaca baykuş (*Strix aluco*) ve Amerika puhu kuşunda (*Bubo virginianus*) belirgin polikromozami ile seyreden şiddetli rejeneratif anemi rapor edilmiştir. Bu konaklarda aneminin şekillenme mekanizmasının tam olarak bilinmemekle birlikte enfekte bir konağın sınırlı besin kaynağına bağlı olarak stres altında kaldığında ve fizyolojik olarak kaynaklarını kaybettiğinde bu durumun anemiyle sonuçlanabileceği ileri sürülmüştür (220).

Haemoproteoid enfeksiyonlarının patogenezi hakkında neredeyse hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Çünkü bu parazitlerin doğal ve deneysel enfekte konaklardaki gelişimi hakkında sınırlı bilgi vardır. Kalın duvarlı merontların gelişimiyle alakalı olarak birkaç konak üzerinde çalışma bulunmaktadır (229, 230). Bugüne kadar yapılmış en kapsamlı çalışmalardan birinde, *H. danilewskii* deneysel enfekte mavi alakargada post enfeksiyonu takiben 31 gün sonra preeritrositik merontlarla alakalı olarak herhangi bir immun yanıt şekillenmediği gözlemlenmiştir. Buna karşın 57 gün sonra juvenil

alakargaların karaciğer, dalak ve akciğer dokusunda lezyonlar şekillendiği görülmüştür. Karaciğerde rastlantısal nekroze alanlar, lenfositik infiltrasyon ve akciğer dokusunda bronşlar çevresinde epitelyal hiperplazi meydana geldiği rapor edilmiştir. Yine dalak dokusunun histolojik yapısında endotelyumun hiperplazisi, lenfosit nekrozu, makrofajlarda, plazma hücrelerinde ve Mott hücrelerinde artış gibi değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (226).

Bazı kanatlı türlerinde kalın duvarlı megalomerontların gelişimiyle alakalı şiddetli myositis meydana geldiği ve bu durumun megalomerontlardaki rupturlarla alakalı olduğu bildirilmiştir. Kalp ve iskelet kasında koyu hemorajik alanlar ve beyaz benkler görülmüştür. Bu lezyonlar *Sarcocystis* enfeksiyonlarına nazaran daha yüzeysel şekillenmiştir.

Mikroskopik olarak megalomerontlar; makrofajlar, heterofiller, dev hücreler, kırmızı kan hücreleri gibi hücrelerden oluşan bir infiltrasyon ile çevrelenmiş ve kas fibrillerinin sıklıkla nektorik ve kalsifiye olduğu bildirilmiştir (220, 231). Diğer lezyonlar arasında karaciğer ve dalak makrofajlarında yoğun pigment birikimi ve bu organların büyümesi gibi belirtiler bulunmaktadır (174, 232).

2.2.4 Kanatlı *Haemoproteidae* Türlerinin Halk Sağlığı ve Evcil Hayvan Sağlığı Açısından Önemi

Halk Sağlığı Açısından Riskler: *Haemoproteidae* ailesindeki parazitlerle enfekte kuşlar, insanlar için herhangi bir sağlık tehlikesi oluşturmazlar.

Evcil Hayvanlar Açısından Riskler: Yabani hindilerin paraziti *Haemoproteus meleagridis*, yerli hindi üretiminde potansiyel bir tehdit oluşturur. Ancak pratikte bunun kapalı sistem entegre endüstriyel hindi yetiştiriciliği, bakımından bir riski bulunmamaktadır. Bununla birlikte güvercinlerde ve kumrularda *Haemoproteus* türlerinin patojenik enfeksiyonlarına ilişkin raporlar bulunmaktadır. Bunlar genellikle yüksek parazitemilerle ve megalomerontların ortaya çıkmasıyla ilişkilidirler (233). Ancak enfekte güvercin ve kumruların çoğu klinik bulaşma bulgusu olmaksızın çok yüksek parazitemilere tolerans gösterebilirler. Doğal rezervuar konağı Kaliforniya bıldırcını olan *H. lophortyx*'un Kaliforniya'da yöresinde yaşayan Yeni Dünya bıldırcınları olarak da bilinen (Northern Bobwhite) bıldırcınlarda önemli salgınlara yol

açtığı bildirilmiştir. Salgınların sıcak havalarda ceratopogonid popülasyonlarının arttığı zamanlarda ortaya çıktığı da belirtilmiştir (221). Benzer şekilde, *Haemoproteus* türlerinin özellikle muhabbet kuşlarında ölümcül *Leucocytozoon*-benzeri enfeksiyonlar gibi hastalıklara yol açabilecekleri hakkında çeşitli raporlar bulunmaktadır (234-236). Bütün bu durumlarda, kafes kuşları doğal alanların dışında tutulmuştur.

2.3 Moleküler Veriler Işığında Kanatlı Haemosporidianlarında Global Diversite

Kanatlı malaria'sı (*Plasmodium* spp.) ve diğer Haemosporidianlar (*Haemoproteus* ve *Leucocytozoon* spp.) vektör kaynaklı kan parazitlerinin çeşitlilik gösteren bir grubu olup birçok kanatlı familyasında yaygın olarak bulunurlar (172). Kanatlı haemosporidianların yaşam geçmişleri, morfoloji ve klasifikasyonları geleneksel olarak ışık mikroskopisi ile çalışılmıştır (172). Ancak moleküler yöntemlerin enfeksiyonların identifikasyonunda kullanılmaya başlanması araştırmalarda artışa yol açmış ve parazitlerin genetik diversitesi ve konak spesifikliğı üzerine etkileyici bakış açıları getirmiştir (237, 238). Bunun yanında enfeksiyonların araştırılmasında nested PCR primerlerinin dizaynı saptama etkinliğini artırmış ve bu da özellikle tipik olarak düşük düzey parazitemi bulunan kronik enfeksiyonlarda fayda sağlamıştır (239). Moleküler çalışmalar günümüze kadar 2700'ün üzerinde yegane kanatlı Haemosporidian nesli identifiye etmiş ve dolayısıyla bu sonuçlar da nesillerin dağılımının kaydı ve global modellerin araştırılmasının kolaylaştırılması için koordine bir veri bankasının (Mal- Avi <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) oluşturulmasında yönlendirici olmuştur (240). Örneğin, MalAvi kayıtları, Hawaii'de bulunan dominant kanatlı *Plasmodium* nesli GRW4'ün, birçok kanatlı familyasını kapsayan konaklardan ve ABD'den Fransız Polinezyası'na kadar coğrafik alanlar boyunca kaydedildiğı görülmektedir (241-243). Bu hızlı gelişen alandaki yeni görüşler ortaya çıkarılırken, primer olarak moleküler ve mikroskopik metodların avantaj ve dezavantajları üzerinde yoğunlaşmıştır (244, 245). Örneğin, yeni bulguların, miks türlerle oluşan Haemosporidian enfeksiyonların yaygın PCR yöntemleriyle büyük oranda gözden kaçırıldığını öne çıkardığı dolayısıyla bu noktada miks enfeksiyonların identifikasyonu ve tarif edilmesinde kullanılan mevcut metodolojilerin sınırlı kaldığı vurgulanmıştır (246, 247).

Mt-cytb gen bölgesini hedef alan Nested PCR, 2004 yılından bu yana en yaygın moleküler tarama yöntemi olmuş ve tüm yayınların %61,7'sinde kullanılmıştır (Tablo

2.3). Mitokondrial taramaya zıt olarak yayınların %8,9'unda nükleer markerlar kullanmıştır (Tablo 2.3). Toplamda 6 farklı nükleer marker kullanılmıştır. Ancak bunlardan ikisi (DHFR-TS ve SSUrRNA) birden fazla kanatlı konak üzerindeki makalede hedef alınmıştır. Hem kanatlı hem de vektör konaklar için *Leucocytozoon* spp.'nin *Plasmodium* veya *Haemoproteus* spp.'ye oranla çok daha az çalışıldığı görülmektedir (Tablo 2.8). Yine kanatlı konak üzerinde yürütülen çalışmaların yarısından az olmak üzere (%47,4) kan frotilerinin mikroskopik analizleriyle birlikte PCR analizlerinin gerçekleştirildiği dikkati çekmektedir (Tablo 2.3). Kanatlı konak çalışmalarının %16,3'ünün enfeksiyonları karakterize etmek için çoklu genetik markerları kullandığı görülmesine karşın hiçbir vektör konak çalışmasında çoklu markerlar kullanılmamıştır (Tablo 2.3). Yine miks türle enfeksiyonlar spesifik olarak kanatlı konak çalışmalarının %30,7'sinde araştırılmış ve mikroskopi en sık kullanılan yöntem olmuştur (Tablo 2.3). Miks enfeksiyonların belirlendiği tek vektör konak çalışmasında restriksiyon enzim analizleri uygulanmıştır (Tablo 2.3).

Kanatlı haemosporidian cytb nesilleri üzerine araştırmalar, biyocoğrafik bölgeler boyunca heterojenik olarak dağılım gösteren yüksek çeşitlilikte parazit nesillerini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte gözlenen ve tahmin edilen nesil diversitesinin global modelleri iki parazit soyu, *Plasmodium* ve *Haemoproteus* arasında değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (248). Kontinental kanatlı diversitesi sıcak noktalarının, kanatlı sıcak noktalar olmayan ve okyanus bölgelerine göre hem *Haemoproteus* hem de daha az olmak üzere *Plasmodium* spp. için daha yüksek nesil zenginliği açısından yatkinlik gösterdiği bilinmektedir. Clark ve ark. (248), düşük enlemlerde yüksek diversite gösteren biyocoğrafik modellerin olduğunu göstermişler, bu sonuçların da parazitleri de kapsayan bir dizi taksa boyunca yaygın bilinen modellerle (249) uyum gösterdiğini kaydetmişlerdir. Kanatlı Haemosporidianları için sıcaklık ve yağış, parazit gelişimini ve vektörün beslenme fırsatlarını teşvik ederek parazit diversifikasyonuna yardımcı olabilen önemli abiotik değişkenlerdir (250, 251). Ancak, tropikal takım adaların kanatlı Haemosporidianları diversitesindeki etkileri sınırlıdır ki, bu durum iklimik şartların tek başına diversiteyi yönlendiremeyeceği tezini desteklemektedir. Bundan ziyade Haemosporidian diversitesi, kanatlı ve/veya vektör konak diversitesinin bir fonksiyonu olabilir. Nitekim her ikisi de tropikal kontinental bölgelerde artış göstermektedir (252, 253).

Tablo 2.3 Kanatlı haemosporidian yayınlarında incelenen moleküler tarama yöntemleri ve konak-parazit sistemleri (1995–2012) (248).

	Toplam	Kanatlı Konak	Vektör Konak
	162	140	26
Hedef soy			
<i>Plasmodium</i>	146	127	22
<i>Haemoproteus</i>	126	115	15
<i>Leucocytozoon</i>	43	39	4
Mitochondrial marker	154	133	25
Cyt- <i>b</i>	153	132	25
Cytochrome oxidase 3	5	5	0
Nuclear marker	14	13	1
DHFR-TS	4	4	0
SSU-rRNA	9	8	1
DGAT	1	1	0
LSU-rRNA	1	1	0
TRAP	1	1	0
ClpC	1	1	0
Yöntem			
Nested PCR	100	85	17
Quantitative PCR	9	7	2
PCR + 1	1	1	0
Miks enf. identifikasyonu	44	43	1
Mikroskopi	19	19	0
Restriction enzyme digestion	11	10	1
TA cloning	14	14	0
Soy spesifik primerler	2	2	0
İncelenen kanatlı takımları			
Passeriformes	114	–	–
Columbiformes	21	–	–
Falconiformes	14	–	–
Strigiformes	11	–	–
Piciformes	10	–	–
Galliformes	9	–	–
Charadriiformes	9	–	–
Coraciiformes	5	–	–
Cuculiformes	5	–	–
Apodiformes	5	–	–
Other orders	22	–	–

^aBazı çalışmalar eş zamanlı olarak hemkanatlı hem de vektör konakları analiz etmiştir.

Kanatlı haemosporidianları için, birçok vektörün çok çeşitli kanatlı konak türünden beslenebilmesi (254, 255) parazitlerin yeni konakları enfekte edebilmesi için fırsatları artırmakta (Örn., konak değişimi) ve bu durum da daha çok tür zenginliği düşük olanlardan ziyade yüksek olan vektör-konak sistemlerinde gerçekleşmektedir. Filogenetik ve moleküler çalışmalar, potansiyel konakların filogenetik olarak orijinal konağa yakın olduğu durumlarda daha da kolaylaşan konak değişiminin (host-switching) prosesinin (256) kanatlı haemosporidianlarında yaygın olduğunu göstermektedir (257, 258). Dolayısıyla potansiyel konakların yüksek diversitesi, daha fazla fırsat sağlar (259). Neticede tropik bölgeler daha kısa jenerasyon süresi olsa dahi

evrimsel oranı hızlandırabilir (260). Zaman kalibreli filogeniler tropik bölgelerdeki parazitlerin ılıman bölgelere oranla daha hızlı farklılaşma gösterme durumunu belirleme amacıyla kullanışlı olabilir (261, 262). Fakat kanatlı Haemosporidianları için moleküler zaman ölçümü tahmin edilirken (263), bu parazitlerin evrimsel geçmişindeki sık konak değişimi üzerine kanıtlar, farklılaşma oranlarının tahmin edilmesinde probleme yol açmaktadır (264)

Haemoproteus spp.'nin *Plasmodium* spp.'ye oranla göstermiş olduğu yüksek nesil zenginliği ve bu iki soy tarafından sergilenen farklı biyocoğrafik yapılar iki soydan nesillerin farklılaşması bakımından zorunlu farklılıkları desteklemektedir. Nesil diversitesi kaynakların (Örn., kanatlı ve vektör konaklar) paylaşılmasını indükleyen bir yaşam geçmişi stratejisi olan ve türlerin bir arada bulunmasını kolaylaştıran yüksek derecede konak özgünlüğü sonucu olabilir (265). Bir kısım çalışmada bildirilen konak bulunma bilgileri *Haemoproteus* spp.'nin *Plasmodium* spp. ile kıyaslandığında konak spesifikliğine daha fazla eğilim gösterdiğini öne çıkarmıştır (266-268). Bu çıkarımlarda *Haemoproteus* spp. diversite tahminlerinin neden *Plasmodium* spp. tahminlerinden fazla olduğunu açıklayabilir. Kaynakların daha fazla paylaşımı ayrıca *Haemoproteus* spp. diversitesinin, yüksek konak diversitesi olan kontinental bölgelerde neden artış gösterdiğini buna karşın *Plasmodium* spp.'de bu artışın görülmediğini açıklayabilir. Tropik bölgelerde daha fazla potansiyel kanatlı konağın bulunabilirliğiyle konakların rölatif bolluğu özellikle konak özgünlüğü için yatkınlık gösteren parazitlerde olmak üzere ekolojik ortam spezializasyonunu destekleyebilir (269). Alternatif olarak *Haemoproteus* spp. enfeksiyonları, basitçe moleküler tekniklerle daha kolay olarak saptanabilir. Örneğin *Haemoproteus* spp.'de nükslerin süresi (Örn., konak kanında sekonder parazitemi) *Plasmodium* spp.'ye oranla uzamaya (birkaç aya kadar) eğilimlidir (172). Parazit yoğunluğunun çok düşük olduğu durumlarda PCR, DNA amplifikasyonu yapamadığı (239) için, *Haemoproteus* nesillerinde rapor edilen yüksek zenginliğin sekonder parazitemilerin saptanmasındaki daha uzun zaman aralığının parsiyel bir artefaktı olabilirliği de mümkündür (248).

Haemoproteus nesillerindeki yüksek diversite yapısının bir istisnası Güney Amerika'da gösterilmiştir. Bu bölge *Plasmodium* spp. için diğer bölgelere oranla oldukça fazla nesil kayıtları ve yüksek nesil diversitesi göstermektedir. Güney Amerika'daki bu *Plasmodium* nesillerindeki yüksek zenginlik, biri güney doğu Brezilya (270), diğeri

Ekvador'un batı Amazon bölgesinde (271) iki ayrıntılı çalışma ile örneklenmiştir. Ekvador'un batı Amazon bölgesinden örneklenen *Plasmodium* nesilleri *Haemoproteus* nesillerinden daha spesiyalist belirlenirken, güney doğu Brezilya'da örneklenen 55 *Plasmodium* nesili yalnızca bir tür konak dağılımı göstermiştir. Bu veriler, *Plasmodium* spp.'nin Güney Amerika'nın ekolojik olarak farklı tropikal habitatlarında kanatlı konakların yanı sıra nadir bir yayılım deneyimi geçirmiş olabileceğini gündeme getirmiştir. Ancak, her ne kadar Güney Amerika en zengin kanatlı ve sivrisinek topluluklarını içeriyor (253, 272) olsa da bu durum *Haemoproteus* nesil diversitesinin bu bölgede neden benzer şekilde yükseliş göstermediğini açıklamamaktadır. Güney Amerikada'ki *Plasmodium* nesillerinin filogenetik olarak farklı olması ve miks enfeksiyonlar boyunca *Haemoproteus* nesillerinin saptanma oranını artıran belirli cytb sekanslarını içeriyor olmaları mümkündür (247). Ancak, kanatlı Haemosporidian diversitesinin değerlendirilmesini artırmak ve bu yegane biyocoğrafik modellerin varlığının teyit edilmesi için Güney Amerika'nın farklı habitatlarından daha fazla örnekleme ihtiyacı bulunmaktadır (248).

Haemoproteus spp. kolonizasyonunu engelleyen diğer bir durum da *Plasmodium* nesilleri ile kıyaslandığında *Haemoproteus* nesilleri için konak spesiyalizasyonunun daha yüksek derecede olmasıdır ki, bu durumda *Haemoproteus* spp.'nin izole ada topluluklarındaki yeni kanatlı konaklara geçişi ve adaptasyonunda zorluklara sahip olabileceği kaydedilmiştir (248). Buna karşın adaları da içeren geniş coğrafik aralık boyunca generalist *Haemoproteus* nesillerinin rapor edildiği çeşitli olgular bulunmaktadır (266, 273). *Haemoproteus* spp.'nin, enfekte konak ve/veya uygun vektörlerin antropojenik bilgilerinin mevcut olmadığı bu parazitlerin doğal kolonizasyonundan oldukça izole olan adalarda görülmemesi daha olası gözükmektedir (248, 274). Adalarda *Haemoproteus* spp. dağılımını sınırlayan bu mekanizmalar olmasına karşın, insan hareketlerindeki artış ile hızlanan yaban hayatı hastalıklarının oluşturduğu tehdit açısından bilinen bu Haemosporidian parazitlerin monitorize edilmesi değerli olabilir (275).

Moleküler çalışmalardaki diversite modelleri, yalnızca mikroskobik verilerin kullanıldığı ve zoocoğrafik bölgelerin çoğunluğu için *Haemoproteus* spp. zenginliğinin yüksek bulunduğu çalışmalarla desteklenmektedir (172). Örneğin Bennett (276) sub-Saharan kuşlarda *Haemoproteus* spp. (63 tür) zenginliğini *Plasmodium* spp.'den (16 tür)

daha yüksek belirlemişlerdir. Benzer model batı Avrupa'da da belirlenmiş 28 *Haemoproteus* spp. ve 12 *Plasmodium* spp. bildirilmiştir (277). Bununla birlikte Neotropik bölgelerden bazı mikroskopik bulgular, hem Amazon Havzası hem de Orta Amerika'daki kanatlı konakların *Haemoproteus* spp.'ye nazaran daha yüksek *Plasmodium* spp. prevalansına sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (278). Ancak Clark ve ark. (248), cytb nesillerinin analizleri sonucu, biyocoğrafik bölgeler boyunca daha önce yalnızca mikroskopik veriler ile (172) not edilmeyen neotropikal bölgelerde yüksek *Plasmodium* spp. diversitesi ve tropik bölgelerde daha yüksek Haemosporidian diversitesi gibi varyasyonların bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu farklılıkların doğal enfeksiyonlardaki sık görülen düşük parazitemi sonucu göz ardı edilen enfeksiyonlardan dolayı ortaya çıkabileceği kaydedilmiştir.

Yüksek kanatlı diversitesi olan bölgelerde rölatif olarak sınırlı örnekleme birlikte tahmin edilen keşfedilmemiş Haemosporidian zenginliği, ideal olarak mikroskopik çalışmalarla kombine moleküler çalışmalara ihtiyaç göstermektedir. Ancak, mevcut araştırmaların yayılımı, Avrupa ve Kuzey Amerika passerin toplulukları boyunca çapraşıklık göstermektedir. Bu konak parazit topluluklarında kanatlı Haemosporidianların prevalansı, mevsimsellik, diversite ve konak dağılımları üzerine çok sayıda veri (257, 279, 280) bulunmasına karşın başka yerlerdeki mevcut bilgi sınırlıdır (248). Örneğin Avustralya'da önceki mikroskopik tanımlamalar sınırlı kolonizasyon ve diversifikasyonun ve az sayıda mikroskopik çalışmanın bulunmasının bir sonucu olarak düşük sayıda Haemosporidian türlerini göstermiştir (172). Fakat gün geçtikçe Avustralya'nın özellikle *Haemoproteus* spp. olmak üzere yüksek Haemosporidian nesil diversitesine sahip olduğu belirgin hale gelmektedir (281-283). Bununla birlikte Passeriformes kanatlı takımlarından en yüksek diversiteyi gösteren takım olması (284) ve Haemosporidian faunası için en yüksek diversiteyi gösteriyor (172) olmasına karşın Columbiformes, Falconiformes ve Strigiformes gibi diğer takımlardan örnekleme Haemosporidialar için bu takımlarda da yüksek diversite ve kriptik tür evrimleşmesi olduğunu göstermektedir (285-288). Tür zenginliği yüksek olan habitatlardan ve bir kısım kanatlı konak takımlarından sınırlı örnekleme Haemosporidianlarda tam anlamıyla diversitenin ve filogenetik ilişkilerin açıklanmasını engellemektedir.

MalAvi veri bankasının oluşturulması, tek Nested PCR protokolünün uygulanmasının yaygınlaşmasına destek olmuş, bu yönüyle moleküler çalışmaların çoğu arasında metodolojik konfirmasyonun sağlanmasına öncülük etmiş ve Haemosporidian diversitesinin anlaşılmasında yüksek katkı sağlamıştır. Nükleer gen tabanlı araştırmaların yetersizliği, parazit diversitesinin doğru tahmininde bir engel olarak görülebiliyor olmasına karşın eş zamanlı uygulanan nükleer ve mitokondrial çalışmaların kanıtları birçok cytb nesillerinin muhtemelen reproduktif olarak izole varlıkları ortaya çıkardığını desteklemektedir (266, 289). Ancak moleküler çalışmalarda bu hızlı artış, ayrıntılı mikroskobik inceleme gibi geleneksel parazitolojik metodlardan uzaklaşmaya yol açmış gözükmektedir (245). Bu açıdan PCR tabanlı tekniklerle nesil saptama ve karakterizasyon temelinde sonuçların yüksek olduğu görülmektedir. Bu moleküler teknikler çok düşük saptama hassasiyetinde ve uygun olmayan konaklarda parazitlerin bulunma noktasında dahi Haemosporidianların farklı gelişim evrelerinden DNA'yı amplifiye etme yeteneğindedirler (290). Ancak bu noktada dipteran vektörler tarafından kanatlı konak dolaşım kanına enjekte edilen sporozoitlerin gelişim göstermeden perifer kan dolaşımında belirli bir süre kalabilmeleri problem oluşturabilir (172). Her ne kadar bu tip abortif enfeksiyonlar parazit-konak bulaşma dinamiklerinin anlaşılmasını sınırlıyor gözüküyor olsa da, bu tip enfeksiyonların bölgeye göre görülen nesiller hakkında bilgi vermesi yönüyle biyocoğrafik yapıların çıkarımları daha az etkinleşmiştir (248).

Vektör ve konak uygunluğunun yanı sıra mikroskopi ile birlikte uygulanan moleküler teknikler filocoğrafik çalışmalar için zorunlu olan ve kanatlı Haemosporidianların evrimsel tarihçesinin daha iyi anlaşılabilmesini sağlayan parazit diversitesinin genetik ve morfolojik açıklamasına yüksek katkı sağlayabilir (291, 292). Ancak birçok konak parazit topluluklarındaki çalışma eksikliği, bu parazitlerin gerçek diversitesinin yeterli düzeyde anlaşılmasını zayıflatmaktadır (245). Miks enfeksiyonların dinamikleri ve sıklıkları da ayrıca mikroskobik analizlerin kullanılmadığı durumlarda göz ardı edilebildiği ve bu durumun da Haemosporidian diversitesi üzerine bilgileri kısıtlayan bir faktör olarak etki gösterdiği kaydedilmiştir (247, 293). Perifer kan frotilerinin incelenmesinin moleküler analizlerle birlikte yürütülmesinin, kanatlı konaklardaki enfeksiyonların karakterize edilmesinde en ideal yaklaşım olduğu vurgulanmıştır (248).

Vektörlerde Haemosporidian enfeksiyonlarının analizi üzerine çalışmaların yetersizliği, parazit nesillerinin gerçek diversitesinin ve haemosporidian bulaşma dinamiklerinin anlaşılmasını sınırlamaktadır (251). Örneğin, Güney Malezya'da yürütülen moleküler çalışmalarda vektörlerde yüksek sayıda *Plasmodium* ve *Haemoproteus* spp. nesilleri identifiye edilmiş ve bunların bölgedeki kanatlı konaklardan henüz izole edilemediğinin altı çizilmiştir (294, 295). Seksüel reproduksiyonun vektör konakta gerçekleşmesi (172) sebebiyle, vektörler Haemosporidian türlerin reproduktif izolasyonu için zorunludur (296). Bu açıdan vektör uygunluğunun teyit edilmesi oldukça önemli bir kriterdir. Bu teyit, mikroskopik analizlerle sporozoitlerin görülmesi ile sağlanmaktadır. Diğer yandan vektör uygunluğu açısından insektlerin baş/toraks (sporozoit gelişimi) ve abdomenlerinin (kan besleme ile alınan Haemosporidian nesilleri) diseke edilerek ayrı moleküler analizleriyle de destekleyici veriler elde edilebilmektedir. Vektör konak spesifitesi üzerine çalışmalar da, kanatlı konaklar arasında nesil dağılımının yönlendirilmesinde vektörlerin rolünü belirlemeye yardımcı olabilir (297). Ancak vektörlerin beslenme modelleri kompleks olabilir ki nitekim bazı türler konak mevcudiyetine göre beslenme tercihlerini ayarlayabilir (251). Bazı araştırmalar nesiller arasında vektör konak spesifitesi için bir eylem olduğunu öne çıkarmış ve bu durumun da vektörlerin kanatlı konaklara kendi diyetlerine özgü olan nesillerin geçişini kısıtlamak suretiyle ekolojik bariyerler olarak fonksiyon gösterebildiğini ortaya çıkarmıştır (298, 299). Bu durum, farklı habitatlarda parazit prevalanslarındaki farklılıkların güçlü bir şekilde uygun vektörlerin varlığı veya yokluğu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (181, 300, 301). Parazit nesilleri arasındaki vektör-konak (vektör sinek türü) spesiyalizasyonu ve bunun parazit diversifikasyonunu yönlendirilmesindeki rolü üzerine ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (248, 251).

Cytb gen bölgesini hedef alan nested PCR global kanatlı Haemosporidian diversitesinin ortaya çıkarılmasında bir araç olarak kullanılmasına karşın ileriki çalışmalarda merozoite surface protein-1 gibi insan malaria araştırmalarında halihazırda yaygın olarak uygulanan çeşitli nükleer markerların kullanımından da fayda sağlanabilir (302, 303). Kanatlı Haemosporidian çalışmaları için geliştirilecek markerlar, parazit nesillerinin konak spesifitesinin ve coğrafik sınırlamalarının daha iyi anlaşılmasını ve daha sofistike taksonomik revizyonları sağlayabilir (248, 304, 305). Bununla birlikte saf parazit kalıplarının izolasyonu için yöntemlerin geliştirilmesiyle de, kanatlı

Haemosporidian çalışmalarının popülasyon genetiği bazında daha doğru ölçekte branşlaşabileceği ve ilgili omurgalı Haemosporidianları arasındaki filogenetik analizlerin daha bilgilendirici olabileceğinin altı çizilmektedir (264).

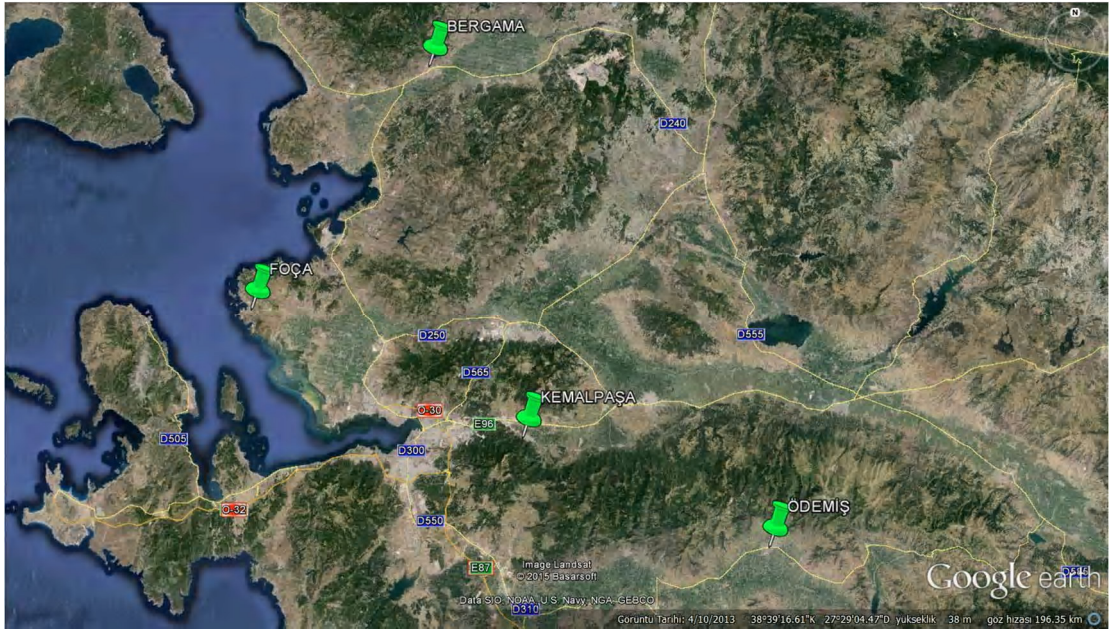


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 SAHA ÇALIŞMALARI

3.1.1 Araştırma Sahası ve *Culicoides* Örneklerinin Toplanması

Çalışmada, *Culicoides* popülasyonunun yüksek olduğu 2016 yılının Mayıs-Ağustos ayları arasında bir sezon boyunca İzmir il sınırlarında yer alan Bergama, Ödemiş, Kemalpaşa ve Foça ilçelerinde belirlenen istasyonlardan *Culicoides* örnekleme yapılmıştır. İzmir ilinde kuzeyden güneye doğru bir hat oluşturan dört ilçede hayvancılık işletmelerinde (Şekil 3.1) kurulan “EVS Black CO2 Light Trap, 4W Black Light Tube (Bioquip Inc., 2801BL)” ve Onderstepoort ışık tuzakları ile (Şekil 3.2) numuneler toplanmıştır. Işık tuzakları akşam, güneşin batışına 1 saat kala, yaklaşık 1,5-2 metre yükseğe kurularak sabaha gün ışığından 1 saat sonrasına kadar çalıştırılmıştır.



Şekil 3.1 Sinek tuzakları kurulum noktaları



Şekil 3.2 Işıklı sinek tuzakları

Yakalanan örnekler saha çalışma istasyonunda öncelikle tutuldukları fileler içerisinde -20°C'de derin dondurucuya konularak insektlerin ölmesi sağlanmış ve tekniğine uygun olarak stereo mikroskopta incelenerek içerisinde *Culicoides* örnekleri ayıklanmıştır. Ayıklanan örnekler identifikasyon ve moleküler analizler için %70 alkol içerisinde alınmış ve kayıtları sağlanarak laboratuvara intikal ettirilmiştir.

3.2 LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

3.2.1 *Culicoides* Örneklerinin İdentifikasyonu

Saha çalışmalarında toplanan ve ayıklanarak %70 alkol içerisinde alınan *Culicoides* örneklerinin identifikasyonları dijital kamera ataçmanlı stero-mikroskop (Olympus SZX-16) altında ilgili teşhis anahtarlarına (306, 307) göre yapılmış görüntüleme işlemleri CellSens Standard 1.13 (Olympus) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İdentifiye edilen örneklerde dişi ve erkekler ayrılmış, toplanma tarihi ve türe göre kategorize edilerek %70 alkol içerisinde moleküler analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.2 *Culicoides* Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Culicoides örneklerinin tür teşhislerinden sonra örneklerden moleküler analizler için DNA ekstraksiyon kitleri (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA, Corning; GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific) ile ilgili basamaklar takip edilerek genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %70'lik etil alkol içerisinde muhafaza edilen ve morfolojik identifikasyonları sağlanan dişi *Culicoides* örneklerinden genotiplendirme ve filogenetik analizler için bireysel örnekler

ayrılmış geri kalan örneklerden Haemosporidian parazitlerin araştırılması amacıyla havuzlar (~10 örnek/havuz) oluşturulmuştur. *Culicoides* örneklerinin muhtemel vektörlük potansiyellerinin gösterilmesi için tür ve toplanma bölgesi temelinde her bir örneğin baş/toraks (sporozoit gelişimi) ve abdomeni (kan besleme ile alınan Haemosporidian nesilleri) diseke edilerek ayrı steril mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve havuzlar oluşturulmuştur. Genomik DNA izolasyonundan önce bireysel ve havuz örneklerinin sıvı azot ve steril pestlelar ile ön homojenizasyonu gerçekleştirilmiş ve örneklerle lysis buffer eklenerek bir gece 56°C'de su banyosu ve/veya kuru ısıtılmalı blokta inkübe edilmiştir. Final basamakta elüsyon 35 µl'ye ayarlanmıştır. Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir. Örneklerle ait genomik DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Moleküler İdentifikasyon ve Genotipleme için *Culicoides* Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (mt-COI) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Morfolojik identifikasyonları sağlanan dişi *Culicoides* bireysel örneklerinin tür identifikasyonlarının doğrulanması ve filogenetik analizleri için mt-COI gen bölgeleri PCR'da amplifiye edilmiştir. Bireysel dişi *Culicoides* örneklerden izole edilmiş genomik DNA ekstraktları *Culicoides* genusunun mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) geninin 523 bp parsiyel kısmını amplifiye eden C1-J-1718(F) (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3') ve C1-N-2191(R) (5'-CCCGGTAAAATTTAAAATAT AA ACTTC-3') (308) primerleri ve aynı bölge için modifiye edilmiş C1-J-1718M (F) (5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT-3') ve C1-N-2191M(R) (5'-CAGGTAAAATTTAAAATATAAACTTCDGG-3') (160) primerleri ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase ve 10-20 ng template DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol ön denatürasyon: 94°C'de 3 dk; 35 siklus, denatürasyon: 94°C'de 30 s, bağlanma: 50°C'de 30 s, uzama: 72°C'de 30 sn; final uzama: 72°C'de 7 dk olarak ayarlanmıştır.

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Anabilim Dalında mevcut referens DNA izolatları ve çalışma süresince elde edilen genomik ve plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) % 1,5'lük agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4 *Culicoides* mt-COI Gen Bölgesi Amplikonlarının Klonlanması ve Rekombinant Plazmid Pürifikasyonu

Bireysel *Culicoides* örneklerine ait mt-COI amplikonları sekans analizleri için jel pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilmiştir. *Culicoides* mt-COI gen bölgesi sekanslarının kayıpsız ve kaliteli olarak elde edilebilmesi için jel pürifiye amplikonlar uygun plazmid vektöre klonlanmış ve akabinde rekombinant plazmid pürifikasyonları yapılmıştır. Klonlama ve plazmid pürifikasyon basamakları aşağıda açıklanmıştır:

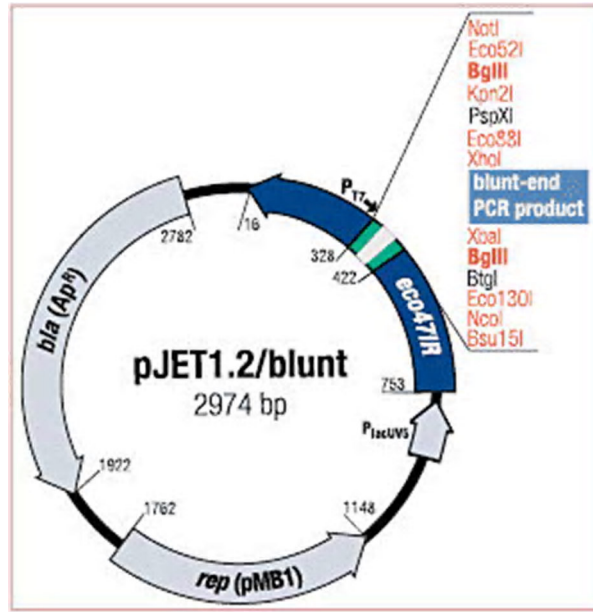
3.2.4.1 İlgili Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin pJET1/2 Plazmidine Ligasyonu

Jel pürifikasyonu yapılmış PCR ürünlerinin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu üreticinin önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaksiyon Buffer	10 µl
PCR ürünü Jel Pürifiye Örnek	2 µl
DNA Blunting enzim	1 µl
Steril Deiyonize Su	5 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilmiş ve sonrasında hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışıma daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 22°C'de 30 dk bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü

3.2.4.2 Rekombinant Plazmidin Kompetan Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon için 5 µl'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan 100 µl OneShot TOP 10 chemically competent *Escherichia coli* hücrelerine (Invitrogen, ABD) eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda karışım, 42 °C'de 1 dk tutulmuş ve hemen ardından buz üzerinde 3 dk bekletilmiştir. Böylece rekombinant plazmidin transformasyonu sağlanmıştır. Daha sonra karışıma oda ısısında bekletilen 250 µl S.O.C. medium (%2 Tryptone, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glikoz) eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı inkubatörde 1,5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı daha sonra LB (lysogeny broth) katı besiyerine ekilerek bir gece yine 37 °C'de inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerindeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyerine tekrar ekilmiştir. Besiyeri, 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4).



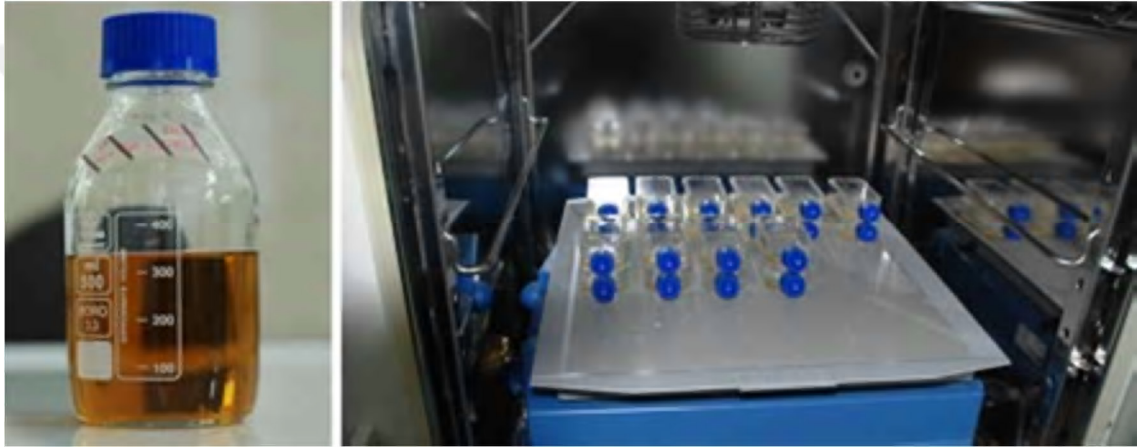
Şekil 3.4. Rekombinant plazmidin kompetan hücrelerine transformasyonu aşamalarındaki çalışmalar

3.2.4.3 Klonlamanın PCR Tarama ile Doğrulanması

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediğini tespit etmek için koloni PCR taraması yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) – (Thermo Fisher Scientific, ABD), 0,4 µl pJET1.2 Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') ve pJET1.2 Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') primerleri ile karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlara katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılmıştır. Karışımlar steril deiyonize su ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyclerda protokol; ön denatürasyon: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denatürasyon: 94 °C'de 30 s, bağlanma: 60 °C'de 30 s, uzama: 72 °C'de 1 dk; final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampliconlar %1,5'lük agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4.4 PCR Tarama ile Transformasyonu Doğrulanmış Kolonilerin Sıvı Besi Yerinde Çoğaltımı

Pozitif bulunan kolonilerden rekombinant plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler steril flasklar içinde 100 µl/ml ampisilin içeren 5 ml'lik LB sıvı besi yerlerine ekimi yapılarak 37°C'de 110 rpm'de çalkalayıcıda bir gece inkübe edilmiştir (Şekil 3.5). Üreme gözlenen sıvı besi yerlerinden alınan örnekler 2 ml'lik ependorflar içerisine alınarak 6000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelletler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



3.2.4.5 Rekombinant Plazmidlerin Saflaştırılması

Hüresel peletlerden plazmid izolasyonu AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen, ABD) ve GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, ABD) kitleri ile ilgili prosedürlere göre yapılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid DNA lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.6 Hedef Gen Bölgesi Insetlerinin Konfirmasyonu için PCR Analizleri

Miniprep kitlerle saflaştırılan rekombinant plazmidler, vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı teyit edilmiştir. Bu amaçla plazmid DNA izolatları pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerleri ile PCR'da analiz edilmiş, takiben elde edilen ampikonlar %1,5' luk agaroz jelde yürütülmüş ve CLP Jel Dokümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile UV ışın altında görüntülenmiştir. Konfirmasyonu sağlanan rekombinant plazmid DNA'lar sekans analizlerine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5 *Culicoides* Havuzlarından Elde Edilen Genomik DNA İzolatlarında Haemosporidan Parazitlerin Mitokondrial Cytochrome b (Mt-cytb) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Culicoides baş/toraks ve abdomenlerinden oluşturulmuş havuzlardan elde edilen genomik DNA izolatları haemosporidan parazitlerin mt-cytb gen bölgesinin 524 bp kısmını hedef alan primerler ile Nested PCR'da analiz edilmiştir. Nested PCR analizlerinin birinci basamağında haemosporidianlar için genel HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAATATGGAG-3') ve HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'); ikinci basamağında *Leucocytozoon* spesifik HaemFL (5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3') ve HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') ve *Plasmodium/Haemoproteus* spesifik HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') ve HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') primerleri kullanılmıştır (199, 309, 310). Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 20 µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 10X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 100 nM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 2,5U Taq DNA polymerase olarak hazırlanmıştır. Bazı örneklerin PCR miksi için Maxima Hot Start PCR Master Mix (Thermo scientific) kullanılmıştır. 1. PCR reaksiyonu için 3µl template DNA, 2. PCR reaksiyonu için ise ilk reaksiyon sonucu elde edilen amplikondan 1 µl kullanılmıştır. Thermalcyclerda protokol her iki PCR basamağı için ön denatürasyon: 94°C'de 3 dk; 30 siklus (1. PCR) 35 siklus (2. PCR), denatürasyon: 95°C'de 30 s, bağlanma: 50 C'de 30 s, uzama: 72°C'de 45 s; final uzama: 72°C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. Nested PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını tespit edilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında mevcut referens genomik ve plazmid DNA izolatları, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1,5'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Analizler sonucu pozitif belirlenen izolatlara ait amplikonlar jel pürifiye (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) edilerek sekans analizlerine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6 Sekans ve Filogenetik Analizler

Culicoides mt-COI gen bölgesini içeren rekombinant plazmidler vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleriyle, havuzlarda belirlenen Haemosporidian mt-cytb jel pürifiye amplikonları ise Nested PCR primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious R10 (311) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak, vektör nükleotid dizisi içerisinde, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenerek izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Haemosporidian mt-cytb gen bölgesi final nükleotid dizilimleri de forward ve reverse sekansların kromotogramlarının dikkatlice analizinden sonra contig edilmeleriyle elde edilmiştir. İlgili sekanslardan ayrıca PCR primerleri trimlenerek Haemosporidianlar için barkod bölge sekansları sağlanmıştır. Elde edilen sekansların Geneious R10 yazılımı (311) üzerinden BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması ve ayrıca kanatlı Haemosporidian mt-cytb sekansları için MalAvi Haemosporidian nesilleri sekans veri bankası (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) kullanılarak mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla çoklu hizalamaları yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve akabinde GenBank ve MalAvi kayıtları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatlarda DNA polimorfizmi ve haplotip yapısının belirlenmesinde DnaSP 5.10.01 (312) yazılımı kullanılmıştır. Intra ve inter-spesifik genetik farklılıklar Kimura two-parameter (K2P) uzaklık modeli (313, 314) kullanılarak MEGA 7 yazılımında (315) gerçekleştirilmiştir. *Culicoides* türlerinin ve Haemosporidian nesillerinin filogenetik yapılanmalarının belirlenmesinde Bayesian inference (BI) analizleri uygulanmıştır. BI analizlerinde sekans evrimi için en uygun substitution modelin belirlenmesinde jModelTest v.0.1.1 (316) kullanılmış ve en düşük AIC (Akaike Information, Criterion, correction) değerine sahip belirlenen modeller filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılmıştır. BI analizleri Geneious R10 (311) yazılımı üzerinden MrBayes (317) plugin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BI analizlerinde, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç) “burn in” olarak çıkarılmıştır.

3.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Culicoides türlerinde Haemosporidian parazitlerle minimum enfeksiyon oranlarının (MIRs) belirlenmesinde aşağıdaki standart formülasyon kullanılmıştır.

MIRs= Pozitif Baş/Toraks havuz sayısı/İncelenen toplam insekt sayısıX1000 (295).

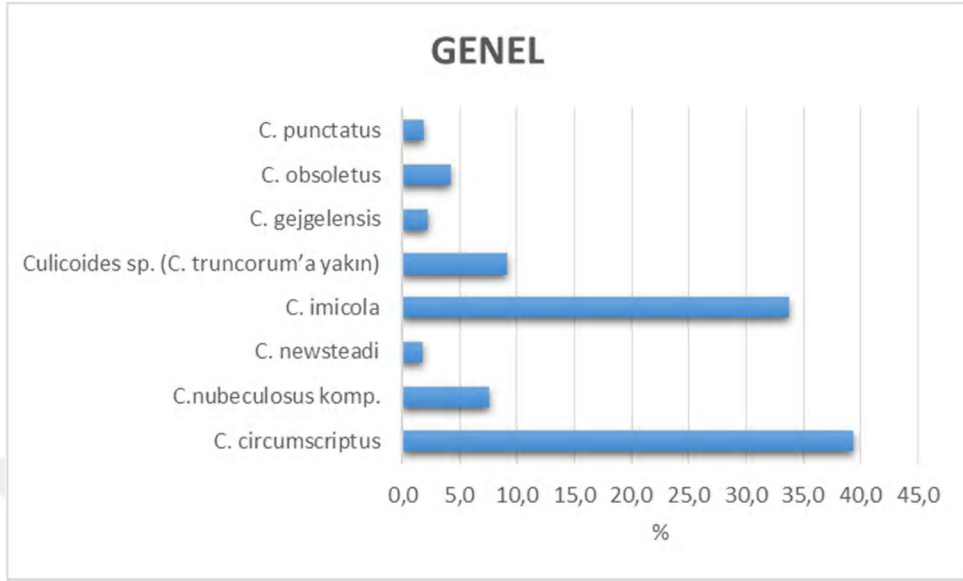


4. BULGULAR

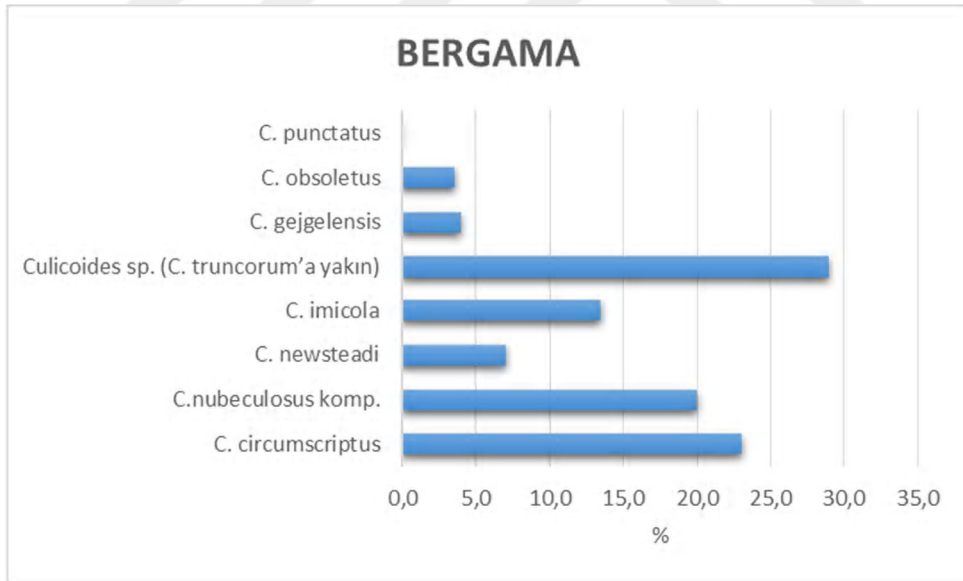
4.1 ARAŞTIRMA YÖRESİNDE BELİRLENEN *CULICOIDES* TÜRLERİ VE DAĞILIM ORANLARI

4.1.1 İdentifiye Edilen Türler ve Dağılım Oranları

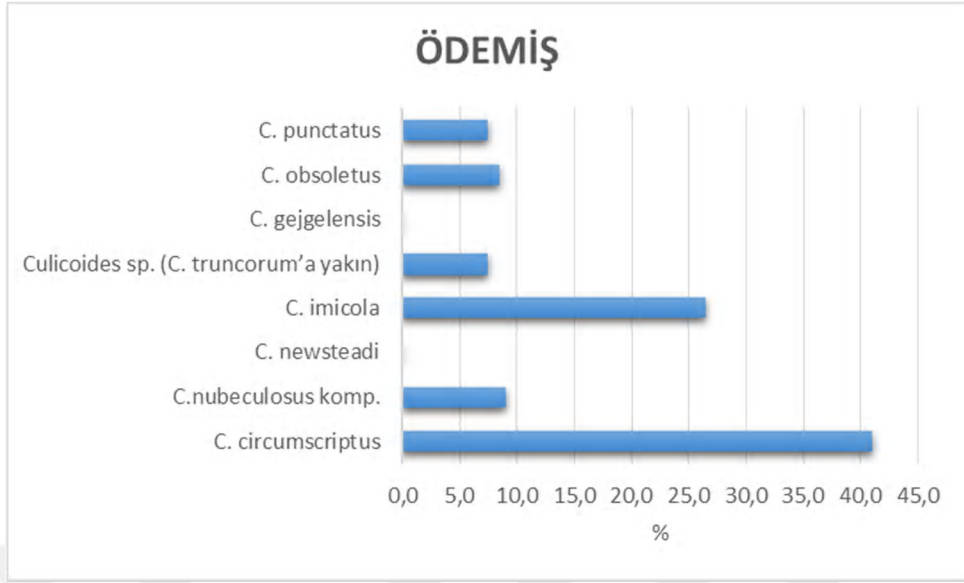
Saha çalışmalarında İzmir İli Bergama, Foça, Kemalpaşa ve Ödemiş ilçelerinden her ilçeden aylık olarak 50 örnek olmak üzere 2016 Mayıs-Ağustos ayları arasında toplam 800 dişi *Culicoides* örneği (ilçe başına 200 örnek) araştırma materyaline dahil edilmiştir. İncelenen 800 dişi *Culicoides* örneğinin morfolojik identifikasyon sonuçlarına göre *C. circumscriptus*, *C. nubeculosus komp.*, *C. newsteadi*, *C. imicola*, *C. gejjelensis*, *C. obsoletus*, *C. punctatus* ve *Culicoides* sp. (*C. truncorum*'a yakın) türlerine ait oldukları belirlenmiştir. Saptanan türlerin araştırma bölgesi ve aylara göre dağılımı Tablo 4.1'de verilmiştir. Araştırma yöresinde genel olarak en yaygın türler %39,4 ile *C. circumscriptus* ve %33,8 ile *C. İmicola*, en düşük yayılışı gösteren türler ise %1,9 ile *C. punctatus* ve %1,8 ile *C. newsteadi* bulunmuştur. Araştırma yöresinde belirlenen türlerin genel yüzdesel dağılım oranları Şekil 4.1'de toplama bölgelerine göre dağılım oranları da Şekil 4.2-Şekil 4.5'de verilmiştir.



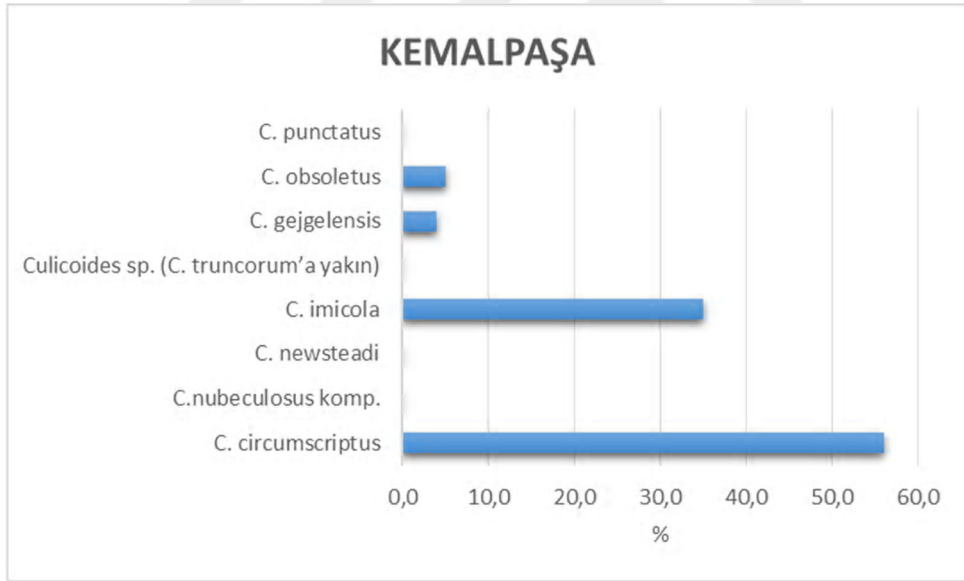
Şekil 4.1 Araştırma yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin genel yüzdesel dağılımı



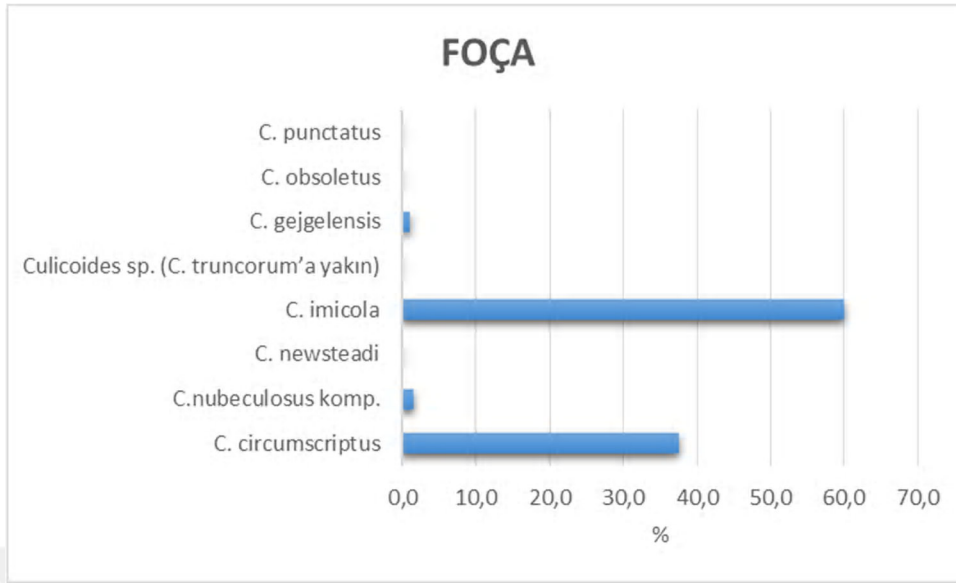
Şekil 4.2 Bergama yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin yüzdesel dağılımı



Şekil 4.3 Ödemiş yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin yüzdesel dağılımı

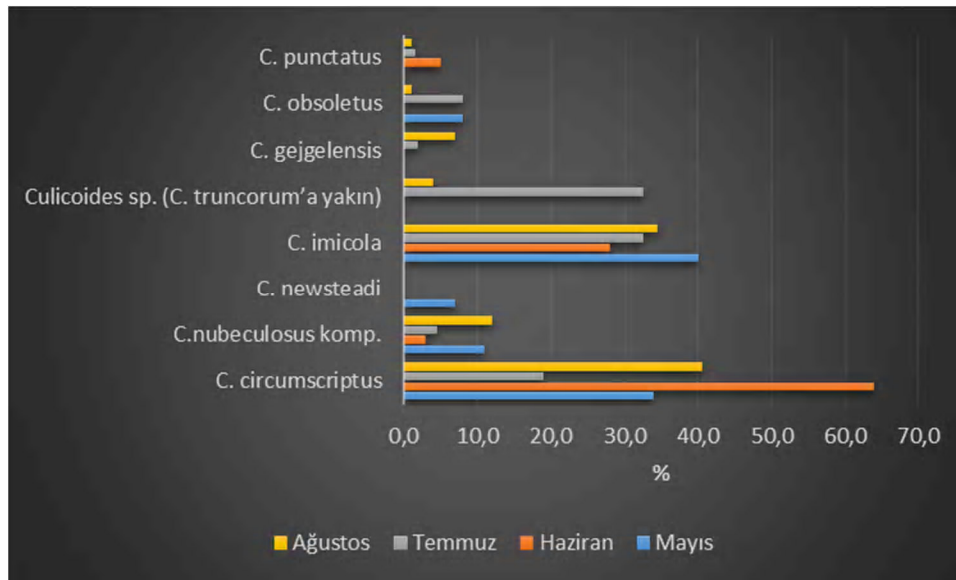


Şekil 4.4 Kemalpaşa yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin yüzdesel dağılımı



Şekil 4.5 Foça yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin yüzdesel dağılımı

Araştırma yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin aylara göre yüzdesel dağılım grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Çalışmada en yaygın belirlenen türlerden *C. circumscriptus*'un en yüksek oranı Haziran (%64,0) ve Ağustos (%40,5) aylarında, *C. imicola*'nın ise Mayıs (%40,0) ve Ağustos (%34,5) aylarında gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Araştırma yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin aylara göre yüzdesel dağılımı

4.1.2 İdentifiye Edilen Türlerin Kanat Morfolojisine Göre Belirlenen Özellikleri

Araştırma yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerinin kanat morfolojisine göre belirlenen genel özellikleri aşağıda verilmiş olup mikroskopik görüntüleri de Şekil 4.7-15'de verilmiştir.

C. circumscriptus: Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. 2. rad hücresi açık spotlar ile kaplıdır, costal kısım tamamen koyu ve homojendir. r3 ve m1 açık spotludur, distal kısımda r3 de bulunan spot m1deki spottan daha büyüktür. r3 ve m1deki açık spotlar birbirinden ve kanat kenarından ayrılmıştır. m2 de açık spot bulunmaktadır, m2 üzerinde proksimalden median kısma kadar bir açık bölgenin bulunduğu ve r-m crossvein üzerinde uzanan açık bölgenin m2 üzerinde açık spotla birleşme gösterdiği belirlenmiştir. m açık spotlu olup, r-m crossvein spot veya bir spot ile birleşmiştir. r3'de 3. koyu spotun anterior, median ve posterior kısımları yaklaşık eşit kalınlıktadır. Anal cell distal kısımda açık spotlu olup, iki açık spot birleşmiş ve iki açık spot ayrılmıştır. cua1 merkezi spotu vardır, bir açık spot koyu alanla çevrilmiştir. M1, M2 ve CuA1 açık spotları koyu alanlar ile çevrilmiştir. m ve anal cell'de bol miktarda macrotrichia bulunmakta olup arculus altında koyu spot yoktur. *C. circumscriptus* olarak tanımlanan örnekler için kanat morfolojisi Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7 *C. circumscriptus* kanat yapısı

C. imicola: Kanatlarda bir veya daha fazla açık spot bulunmaktadır. 2. rad hücresi açık spotlar ile kaplı olup costal kısmın 1/3'ünden fazladır. r3 ve m1 açık spotludur, distal kısımda r3 de bulunan spot m1deki spottan daha büyüktür. r3 ve m1deki açık spotlar birbirinden ve kanat kenarından ayrılmıştır. m2 de açık spot bulunmaktadır, m1 üzerinde proksimalden median kısma kadar belirgin bir açık spot bulunmaktadır ve r-m crossvein üzerinde uzanan açık

bölgenin m2 üzerindeki açık spotlar birleşmiş haldedir. m açık spotlu olup, r-m crossvein spot veya bir spot ile kaynaşmıştır. r3'de 3. koyu costal spot karşısında 4. açık costal spot mevcut olup, 3. koyu costal spot alan 4. açık costal spot alandan daha büyüktür. Median marjin anterior veya posterior marjinden daha dardır. Anal cell distal kısımda açık spotlu olup, iki açık spot ile birleşik konumdadır. cua1'da merkezi spotu vardır, bir açık spot koyu alanla çevrilmiştir. Arculus altında koyu spot mevcuttur. M1'de veini kaplayan geniş bir açık spot bulunur, M2'nin distal kısmın ortasında bir açık spot bulunmaktadır. M1, M2 ve CuA1'de en az bir açık spotlar koyu alanlar ile çevrilmiş olup distal kısım veinleri kanat kenarından birleşmiştir. M2'nin proksimal kısmında koyu spotlar bulunur. CuA1 ve 2. rad cell üzerinde sadece 2 koyu spot mevcuttur. m ve anal cell'de bol miktarda macrotrichia bulunmaktadır.



Şekil 4.8 *C. imicola* kanat yapısı

***Culicoides* sp. (*C. truncorum*'a yakın):** Kanatlarda bir veya daha fazla açık spot bulunmaktadır. 2. rad hücresi açık spotlar ile kaplıdır ve costal kısım tamamen koyu ve homojendir. r3 ve m1, m2'in distal kısmında açık spotlar bulunur. m1 ve m2'de proksimalden mediana kadar açık spotlar homojen değildir. m2, r-m crossvein üzerindeki açık spotlar birleşmiştir. m'de açık spotlar homojen değildir. r3'de 3. koyu costal spot karşısında 4. açık

costal spot mevcut olup, en az ikisinin olmaması. Açık spot alan koyu spot alandan daha küçük veya yaklaşık olarak eşit konumdadır. Anal cell'in distal kısmında açık spot bulunur fakat bir açık spot kanat marjini ile kaynaşmış veya birleşmiş durumda olabilir. cua1'de koyu alanla çevrilmiş bir merkez spot bulunur. Arculus altında koyu spot bulunur. M1'de veini kapsayan açık spot vardır. M1'in median kısmı ve M2'de veini kapsayan açık spot bulunmaz. M1, M2 ve CuA1'de en az bir açık spotlar koyu alanlar ile çevrilmiş olup distal kısım veinleri kanat kenarından birleşmiştir. M2'nin distal kısmında koyu spot bulunur. CuA1 ve 2. rad cell üzerinde sadece 2 koyu spot olup kanat açık renktedir. m ve anal cell'de bol miktarda macrotrichia bulunmaktadır.



Şekil 4.9 *Culicoides* sp. (*C. truncorum*'a yakın)

***C. nubeculosus* kompleks:** *C. nubeculosus* komplekste yer alan türlerin kanat morfolojileri büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. m1 açık spotlu olup proksimalden median kısma kadar belirgin görünmeyen spot/alan bulunmaktadır. m2 açık spotludur ve r-m cross vein üzerindeki açık spot m2 spot ile birleşmiştir. r3 de 4. açık costal spotun karşısında 3. radial koyu spot bulunmakta olup, açık kostal spotlar koyu kostal spotlardan daha büyüktür. Anal cell distal kısımda açık spotludur,

iki açık spot ayrılmış, iki açık spot birleşmiştir. cua1 merkezi spottur, 1 koyu alan açık alan ile çevrilmiştir. m2'nin proksimal kısmı koyu spotludur. m ve anal cell de yoğun macrotrichialar bulunmaktadır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 *C. nubeculosus* komp. kanat yapısı

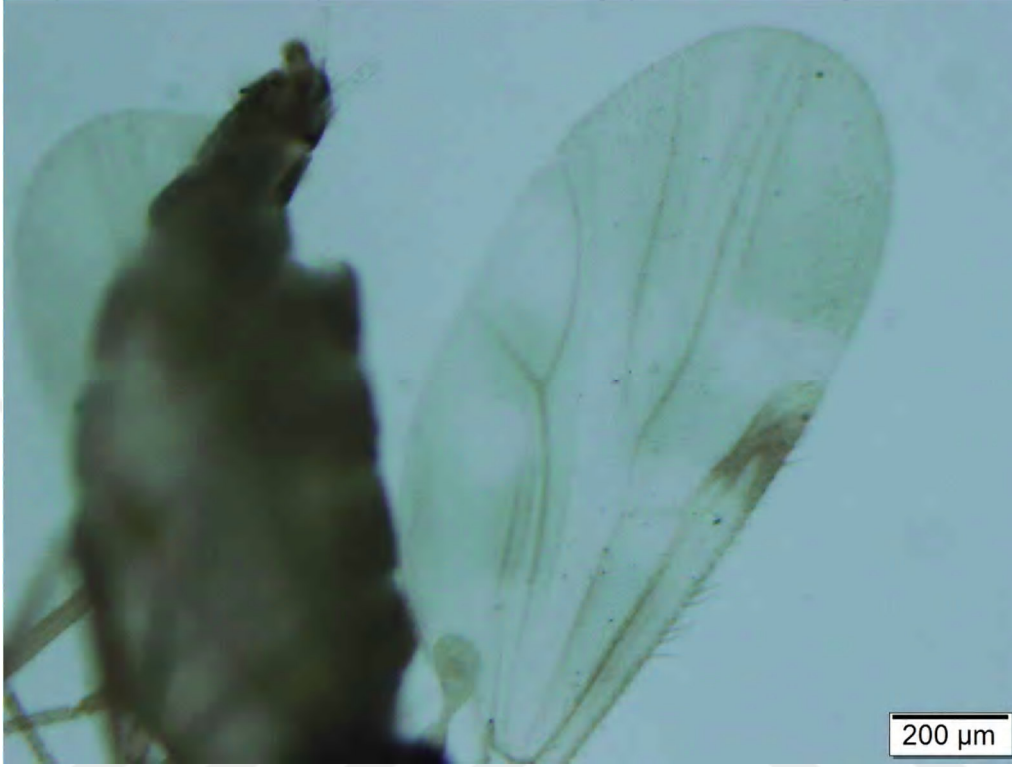
***C. gejgelensis*:** Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. r3 ve m1 açık spotlu olup, distal kısımları ayrılmıştır ve açık spotların distal kısımları hemen hemen eşit büyüklüktedir. m1 açık spotlu olup, proksimalden median kısma kadar belirgin görülen bir spot bulunmaktadır. m2 açık spotlu olup bu spot r-m crossvein üzerindeki açık spot ile birleşmiştir. m açık spotludur, bu spot r-m crossveinde bulunan spot veya bir spot ile birleşmiştir. Anal cell distal kısımda açık spotlu olup, bir açık spot kanat kenarı ile birleşmiş veya belirgin şekilde ayrılmıştır. r-m crossvein de M1 veinin köşesinde koyu spot yoktur. m ve anal cell de yoğun macrotrichialar bulunmaktadır. *C. gejgelensis* olarak identifiye edilen örneklerle ait kanat morfolojisi Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 *C. gejjelensis* kanat yapısı

***C. obsoletus*:** Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. 2. rad hücresi açık spotlar ile kaplı olup costal kısmın 1/3ünden fazladır. r3 ve m1'in distal kısmında açık spotlar vardır. m2'nin distal kısmında ve m1'in proksimalden mediana doğru açık spot bulunur fakat m1'de belirsiz olan spot/alan ve 1 tane belirgin spot mevcuttur. m1'de M1 ve M2 veinler boyunca açık spot tabakası vardır. m2 proksimalden mediana açık spot/alan bulunur ve r-m crossvein üzerindeki açık spotlar m2 spot ile birleşmiş konumdadır. m'de r-m crossvein spot veya bir spot ile birleşmiş açık spot/alan bulunmaktadır. r3'de 3. koyu costal spot karşısında 4. açık costal spot mevcut olup, en az ikisinin olmaması. Açık costal spot, koyu costal spotta daha küçük veya eşit büyüklüktedir. Anal cell'in distal kısmında bir açık spot mevcut olup kanat marjiniinden birleşmiş veya ayrılmış durumdadır. cua1'de koyu alanla çevrilmiş bir açık spot bulunur. r-m crossvein, M1 vein köşesinde ve arculus altında koyu spot bulunur. M1'de veini kapsayan açık spot/band vardır. M1'in median kısmında ve M2'yi kapsayan spot/band yoktur. M1, M2 ve CuA1'de en az bir açık spot koyu alan ile çevrilmiş olup distal kısım veinleri kanat kenarından birleşmiş durumdadır. M2 proksimal kısmında koyu spot bulunur.

CuA1 ve 2. rad cell üzerinde yalnızca 2 koyu alan olup kanat açık renktedir. m ve anal cell'de bol miktarda macrotrichia bulunur.



Şekil 4.12 *C. obsoletus* kanat yapısı

***C. punctatus*:** Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. r3 ve m1 distal kısmı açık spotludur. m1 açık spotludur, proksimalden median kısma kadar belli olmayan spot/alan bulunmaktadır. m açık spotlu olup, r-m crossvein spot veya bir spot ile birleşmiştir. Anal cell distal kısımda açık spotludur, bir açık spot belirgin bir şekilde kanat kenarı ile birleşmiş veya ayrıdır. cua1 merkez spottur, bir koyu spot açık alan ile çevrilmiştir. M2 proksimal kısımda koyu spotludur, bir koyu spotla çevrilmiştir. m ve anal cell de yoğun macrotrichialar bulunmaktadır. r3 de, 4. Açık costal spot alanı 3. radial koyu spot alanından daha büyüktür, median kenar, anterior ve posterior kenardan daha geniş olup arculus altında koyu spot yoktur. *C. punctatus* olarak identifiye edilen örneklere ait kanat morfolojisi Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13 *C. punctatus* kanat yapısı

***C. newsteadi*:** Kanatlarda bir veya daha fazla açık spotlar bulunmaktadır. 2. radial cell açık spot ile çevrelenmiş olup costal kısmın 1/3'den daha büyüktür. m1 de proksimalden median kısma kadar belirgin görünmeyen spot veya alanlar bulunmaktadır. m2 açık spotludur, proksimalinden median kısma kadar görünen bir spot bulunmaktadır. m açık spotlu olup r-m crossvein spot veya bir spot ile birleşmiştir. Anal celin distal kısmı açık spotludur, bir açık spot kanat kenarı ile birleşmiş veya ayrıdır. M1, M2 ve CuA1 deki açık spotlar koyu alanlar ile çevrilmiştir. M2 proksimalde koyu ve uzamış spotlu görünmektedir. m ve anal cell de yoğun macrotrichialar bulunmakta olup arculus altında koyu spot yoktur. *C. newsteadi* olarak tanımlanmış örnekler için kanat morfolojisi Şekil 4.14'de verilmiştir.

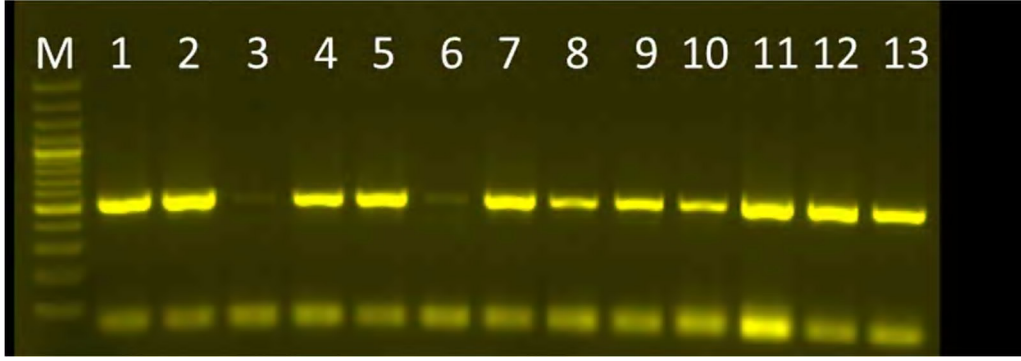


Şekil 4.14 *C. newsteadi* kanat yapısı

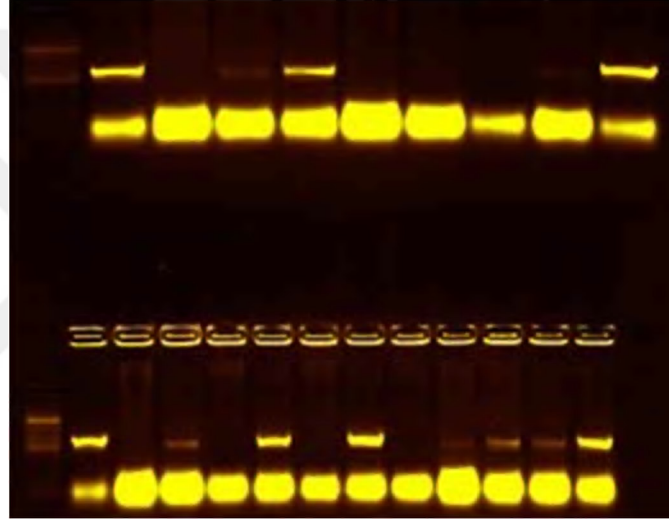
4.2 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

4.2.1 *Culicoides* Mt-COI Gen Bölgesi Amplifikasyon ve Sekans Analizi Sonuçları

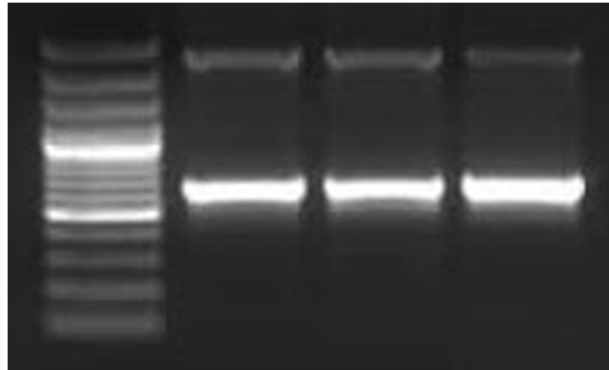
Morfolojik identifikasyonlarla belirlenen örneklere ait genomik DNA izolatlarının ilgili primerlerle mt-COI gen bölgesi amplifikasyonu sonucu hedef büyüklükte (553 bp) ampliconlar saptanmıştır (Şekil 4.15). Elde edilen örneklere ait ampliconların klonlanması sonucu katı besi yerinde üreyen kolonilerden PCR analizleri sonucu hedef gen bölgelerinin vektör DNA'sına insert olduğu belirlenmiş (Şekil 4.16) ve sonrasında sekans analizleri için kolonilerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerde hedef insert genlerin varlığı vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu (Şekil 4.17) konfirme edilmiştir.



Şekil 4.15 *Culicoides* türlerine ait izolatların parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif amplikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-13: *Culicoides* izolatları



Şekil 4.16 Koloni PCR sonucu vektör spesifik primerlerle *Culicoides* mt-COI gen bölgesini ihtiva eden vektör DNA'sının amplifikasyon sonuçları



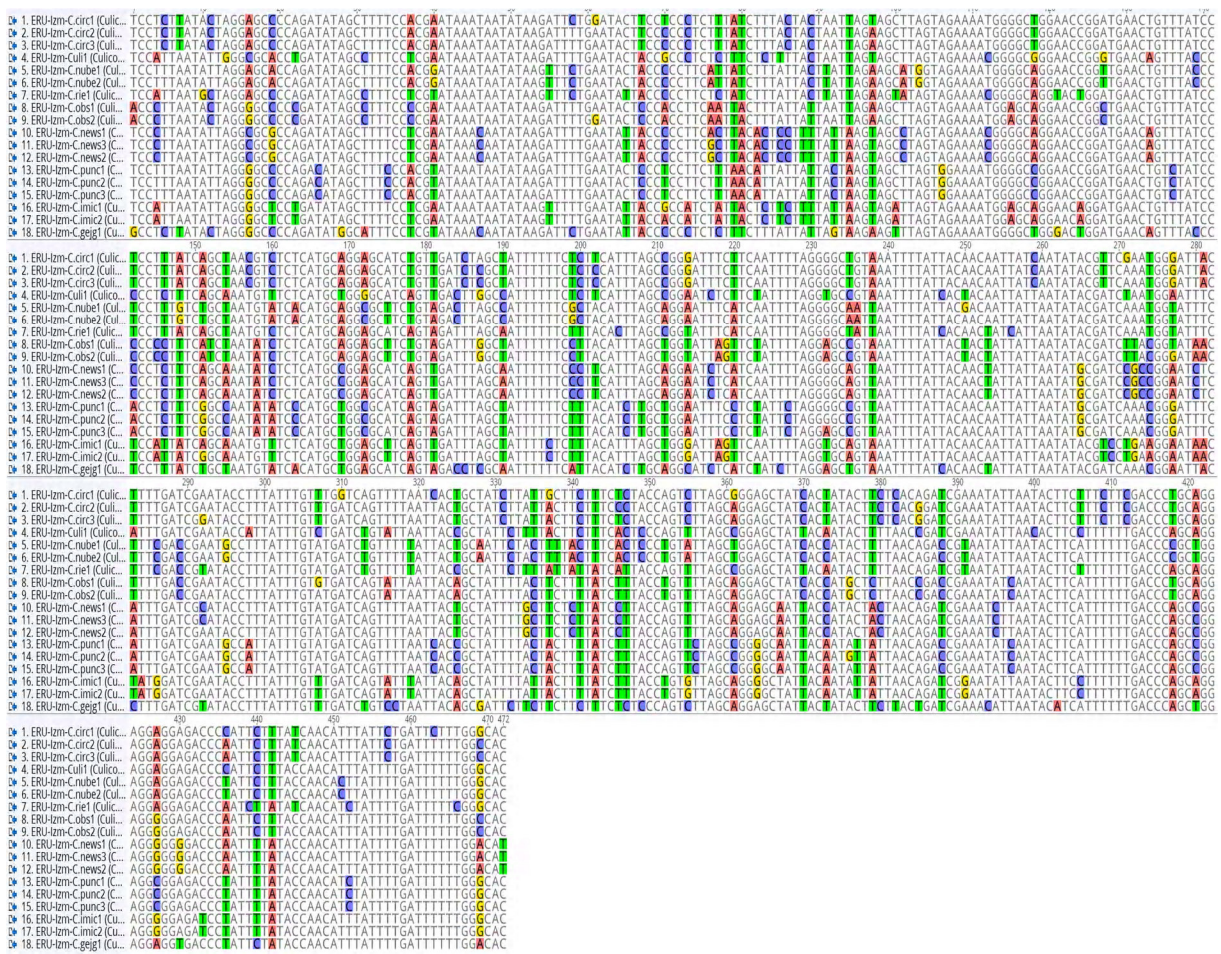
Şekil 4.17 Bazı plazmidlerde *Culicoides* mt-COI hedef insert genlerin vektör spesifik primerlerle PCR analizleri sonucu belirlenen amplikonlar

Mt-COI gen bölgesine göre mt-COI barkodlaması sağlanan ve moleküler karakterizasyonu yapılan izolatların, morfolojik identifikasyona göre ait oldukları türler, belirlenen haplotipleri ve GenBank aksiyon numaralarıyla birlikte Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler karakterizasyonları yapılan *Culicoides* türlerinde belirlenen haplotipler

<i>Culicoides</i> türü	Sekanslanan izolat sayısı	Belirlenen Haplotip		
		Adı	Sayısı	GenBank Aksesyon
<i>C. circumscriptus</i>	6	ERU-Izm-C.circ1	3	MF594384
		ERU-Izm-C.circ2	2	MF594385
		ERU-Izm-C.circ3	1	MF594386
<i>C. gejjelensis</i>	7	ERU-Izm-C.gejg1	7	MF594387
<i>C. imicola</i>	6	ERU-Izm-C.imic1	4	MF594388
		ERU-Izm-C.imic2	2	MF594389
<i>C. newsteadi</i>	7	ERU-Izm-C.news1	4	MF594390
		ERU-Izm-C.news2	2	MF594391
		ERU-Izm-C.news3	1	MF594392
<i>C. nubeculosus</i> komp.	7			
<i>C. nubeculosus</i>	6	ERU-Izm-C.nube1	5	MF594393
		ERU-Izm-C.nube2	1	MF594394
<i>C. riethi</i>	1	ERU-Izm-C.rie1	1	MF594400
<i>C. obsoletus</i>	13	ERU-Izm-C.obs1	6	MF594395
		ERU-Izm-C.obs2	7	MF594396
<i>C. punctatus</i>	6	ERU-Izm-C.punc1	4	MF594397
		ERU-Izm-C.punc2	1	MF594398
		ERU-Izm-C.punc3	1	MF594399
<i>Culicoides</i> sp. (<i>C. truncorum</i> 'a yakın)	7	ERU-Izm-Culi1	7	MF594401

Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen türlere ait mt-COI sekansları arasında 297 (%62,9) identik bölge belirlenirken karakterize edilen türlere bağlı 18 farklı haplotipi ortaya koyan 175 polimorfik bölge saptanmıştır. Mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterizasyonları yapılan *Culicoides* izolatlarının nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere izolatlar arasında farklı haplotipleri ortaya koyan interspesifik ve intraspesifik nükleotid varyasyonları belirlenmiştir. Sekanslanan izolatlar arasında ortalama ikili hizalama identiklik oranı %74,7 belirlenmiş olup ikili hizalama analiz sonucu belirlenen identiklik oranları ayrıca Tablo 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.18 Çalışmada belirlenen *Culicoides* türlerine ait izolatların mt-COI nükleotid sekanslarının çoklu hizalamaları

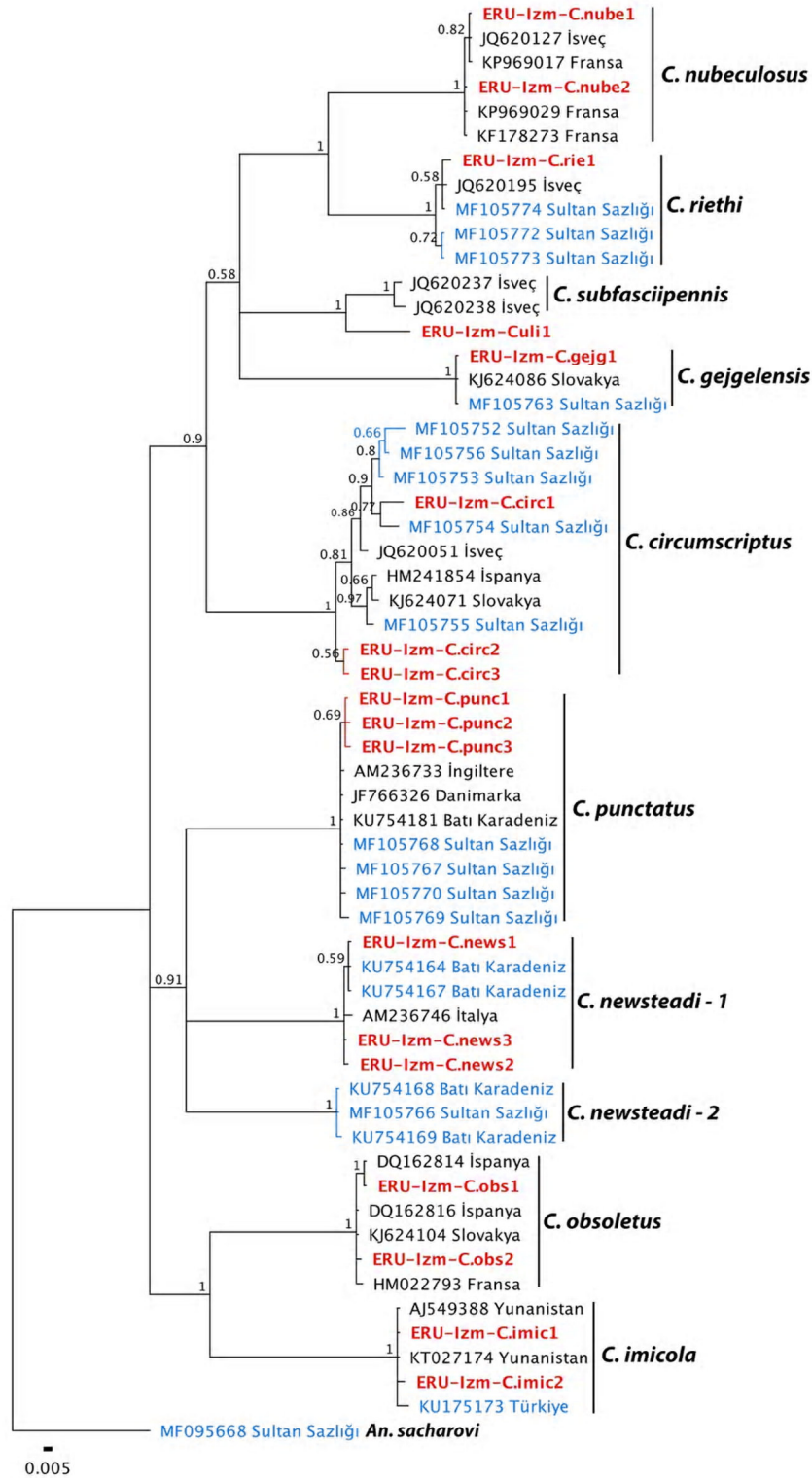
Tablo 4.3 *Culicoides* türlerinde belirlenen haplotiplerin mt-COI sekanslarının çoklu hizalama analizine göre identiklik oranları

	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	ERU-Iz...	
ERU-Izm-C.circ1		96.6%	96.6%	83.5%	83.3%	83.5%	83.1%	82.0%	82.4%	80.1%	80.1%	80.3%	81.1%	80.9%	80.9%	81.8%	81.6%	82.0%
ERU-Izm-C.circ2	96.6%		99.6%	83.9%	83.9%	84.1%	84.1%	83.7%	83.7%	81.1%	81.1%	81.4%	80.9%	80.7%	80.7%	82.2%	82.0%	83.5%
ERU-Izm-C.circ3	96.6%	99.6%		83.7%	83.7%	83.9%	84.1%	83.7%	83.7%	80.9%	80.9%	80.9%	80.9%	80.7%	80.7%	82.2%	82.0%	83.7%
ERU-Izm-C.cul1	83.5%	83.9%	83.7%		83.1%	83.1%	83.7%	82.8%	82.6%	83.5%	83.5%	83.7%	82.0%	81.8%	82.0%	83.5%	83.1%	82.6%
ERU-Izm-C.nube1	83.3%	83.9%	83.7%	83.1%		99.8%	86.4%	82.2%	82.0%	80.3%	80.1%	80.3%	81.6%	81.4%	81.4%	79.2%	79.2%	81.6%
ERU-Izm-C.nube2	83.5%	84.1%	83.9%	83.1%	99.8%		86.7%	82.2%	82.0%	80.5%	80.3%	80.5%	81.8%	81.6%	81.6%	79.4%	79.4%	81.8%
ERU-Izm-C.crie1	83.1%	84.1%	84.1%	83.7%	86.4%	86.7%		81.4%	81.1%	82.2%	82.2%	82.2%	81.8%	81.6%	81.6%	82.0%	81.8%	82.6%
ERU-Izm-C.obs1	82.0%	83.7%	83.7%	82.8%	82.2%	82.2%	81.4%		99.4%	83.1%	82.8%	83.1%	83.1%	83.3%	83.3%	84.5%	84.5%	79.9%
ERU-Izm-C.obs2	82.4%	83.7%	83.7%	82.6%	82.0%	82.0%	81.1%	99.4%		83.1%	82.8%	83.1%	83.3%	83.5%	84.3%	84.3%	84.3%	79.7%
ERU-Izm-C.news1	80.1%	81.1%	80.9%	83.5%	80.3%	80.5%	82.2%	83.1%	83.1%		99.8%	99.6%	84.1%	83.9%	83.9%	83.7%	83.5%	80.9%
ERU-Izm-C.news3	80.1%	81.1%	80.9%	83.5%	80.1%	80.3%	82.2%	82.8%	82.8%	99.8%		99.8%	84.1%	83.9%	83.9%	83.7%	83.5%	80.9%
ERU-Izm-C.news2	80.3%	81.4%	80.9%	83.7%	80.3%	80.5%	82.2%	83.1%	83.1%	99.6%	99.8%		84.3%	84.1%	84.1%	83.9%	83.7%	80.9%
ERU-Izm-C.punc1	81.1%	80.9%	80.9%	82.0%	81.6%	81.8%	81.8%	83.1%	83.3%	84.1%	84.1%	84.3%		99.8%	99.8%	82.4%	82.6%	79.9%
ERU-Izm-C.punc2	80.9%	80.7%	80.7%	81.8%	81.4%	81.6%	81.6%	83.3%	83.5%	83.9%	83.9%	84.1%	99.8%		99.6%	82.2%	82.4%	79.7%
ERU-Izm-C.punc3	80.9%	80.7%	80.7%	82.0%	81.4%	81.6%	81.6%	83.3%	83.5%	83.9%	83.9%	84.1%	99.8%	99.6%		82.4%	82.6%	80.1%
ERU-Izm-C.imic1	81.8%	82.2%	82.2%	83.5%	79.2%	79.4%	82.0%	84.5%	84.3%	83.7%	83.7%	83.9%	82.4%	82.2%	82.4%		99.6%	79.0%
ERU-Izm-C.imic2	81.6%	82.0%	82.0%	83.1%	79.2%	79.4%	81.8%	84.5%	84.3%	83.5%	83.5%	83.7%	82.6%	82.4%	82.6%	99.6%		79.0%
ERU-Izm-C.gej1	82.0%	83.5%	83.7%	82.6%	81.6%	81.8%	82.6%	79.9%	79.7%	80.9%	80.9%	80.9%	79.9%	79.7%	80.1%	79.0%	79.0%	

4.2.2 *Culicoides* Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları

Moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan türlere ait izolatların Türkiye ve Dünyada çeşitli bölgelerden rapor edilmiş izolatlarla birlikte filogenetik yapıları Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Şekil 4.19’da görüldüğü üzere *C. newsteadi* dışında tüm türlerin monofiletik yapı sergilediği ve bunun da yüksek posterior olasılıkla (1.00) desteklendiği belirlenmiştir. *C. newsteadi* türü içinde iki ayrı genogrup belirlenmiş ve bu türün parafiletik olduğu saptanmıştır. Çalışmada karakterize edilen türlere ait haplotipler arasında ortalama genetik heterojenite $25,3 \pm 2,4$ saptanmıştır. Çalışmada *C. nubeculosus* kompleks içinde tanımlanan ve moleküler karakterizasyonla *C. nubeculosus*’a ait olduğu belirlenen ERU-Izm-C.nube1-2 haplotipleri arasında genetik farklılık $0,2 \pm 0,2$ belirlenmiş, ERU-Izm-C.nube1 haplotipi İsveç (JQ620127) ve Fransa’dan (KP969017) bildirilmiş izolatlarla %100, ERU-Izm-C.nube2 haplotipi de Fransa izolatlarıyla (KP969029, KF178273) %100 identiklik göstererek kümelenme göstermiştir. Yine *C. nubeculosus* kompleks içinde tanımlanan ve moleküler karakterizasyonla *C. riethi*’ye ait olduğu belirlenen ERU-Izm-C.rie1 haplotipi Sultan Sazlığı (MF105774) ve İsveç’ten (JQ620237) bildirilen izolatlarla yüksek identiklik (sırasıyla %99,6 ve %99,4) göstererek küme oluşturduğu belirlenmiştir. İlgili izolat ayrıca Sultan Sazlığı’ndan bildirilen diğer *C. riethi* izolatlarıyla da %99,1 identiklik göstermiştir. Morfolojik analizlerle *C. truncorum*’a yakın olarak tanımlanan *Culicoides* sp. ERU-Izm-C.culi1 haplotipinin İsveç’ten bildirilmiş *C. subfasciipennis* izolatlarına genetik yakınlık gösterdiği (%92,9) ve küme oluşturdukları belirlenmiştir. *C. gejelensis* içerisinde karakterize edilen ERU-Izm-C.gejg1 haplotipi Sultan Sazlığı ve İsveçten bildirilmiş izolatlarla %100 identiklik göstermiş ve birlikte küme oluşturmuşlardır. Çalışmada analiz edilen *C. circumscriptus* izolatlarının monofiletik grup içerisinde üç ayrı küme oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). *C. circumscriptus* ERU-Izm-C.circ1 haplotipinin İsveç ve Sultan Sazlığı izolatlarına yüksek identiklik gösterip (Ort. %97,3) birlikte ilk kümeyi oluşturdukları görülmüştür. İkinci küme içerisinde İspanya, Slovakya ve Sultan Sazlığından birer izolat yer almıştır. Çalışmada karakterize ERU-Izm-C.circ2 ve ERU-Izm-C.circ3 haplotipleri arasında $0,4 \pm 0,3$ genetik farklılık belirlenmiş ve bu iki haplotip ilgili grup içerisinde üçüncü kümeyi oluşturmuştur. *C. punctatus* içerisinde karakterize edilen ERU-Izm-C.punc1-3 haplotipleri arasında $0,3 \pm 0,2$ genetik farklılık saptanmış ve ilgili haplotipler *C. punctatus* Sultan Sazlığı izolatlarına ortalama %99,5, Batı Karadeniz izolatına %99,7, İngiltere izolatına %99,4 ve Danimarka izolatına da %99,6 identik bulunmuşlardır. *C.*

newsteadi filogenetik analizlerinde biri *C. punctatus*'a yakın olmak üzere iki ayrı grubun varlığı görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen ERU-Izm-C.news1-3 haplotiplerinin birinci filogenetik grupta yer aldığı, ERU-Izm-C.news1 haplotipinin Batı Karadeniz izolatlarıyla (KU754164, KU754167) %100 identiklik göstererek grup içinde küme oluşturduğu belirlenmiştir. ERU-Izm-C.news2,3 haplotipleri ERU-Izm-C.news1 ve yine Batı Karadeniz izolatlarıyla en yüksek identikliği göstermiştir (Ort. %99,7). Karakterize edilen izolatlar ayrıca aynı filogenetik grup içerisinde yer alan İtalya'dan rapor edilmiş *C. newsteadi* izolatıyla (AM236746) da ortalama %99,5 identik bulunmuşlardır. *C. newsteadi* ikinci filogenetik grubunda Batı Karadeniz ve Sultan Sazlığı izolatlarının yer aldığı ve bu grubun *C. newsteadi* birinci filogenetik grubu ile ortalama %19,5±2,7 genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada *C. obsoletus* içinde karakterize edilen ERU-Izm-C.obs1 ve ERU-Izm-C.obs2 haplotipleri arasında %0,6±0,4 genetik farklılık belirlenmiştir. ERU-Izm-C.obs1 haplotipi İspanya'dan bildirilen izolatla (DQ162814) %100 identiklik göstererek küme oluşturmuştur. ERU-Izm-C.obs2 haplotipi ise en yüksek identikliği %99,8 ile İspanya (DQ162814) ve Slovakya (KJ624104) izolatlarına göstermiştir. Çalışmada *C. imicola* içinde karakterize edilen ERU-Izm-C.imic1 ve ERU-Izm-C.imic2 haplotipleri arasında %0,4±0,3 genetik farklılık bulunmuştur. ERU-Izm-C.imic1 haplotipi Yunanistan izolatları ile %100 identik bulunurken, ERU-Izm-C.imic2 haplotipi aynı izolatlara %99,6 identiklik göstermiştir. Ayrıca karakterize edilen haplotipler Konya yöresinden bildirilmiş izolatla (KU175173) da sırasıyla %99,4 ve %98,9 identiklik göstermiştir.



Şekil 4.19 *Culicoides* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde, Türkiye’den bildirilmiş izolatlar mavi renkte gösterilmiştir. Node’ların önündeki rakamlar BI posterior olasılığını göstermektedir. Dış grup *A. sacharovi* kullanılmıştır. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

4.2.3 *Culicoides* Türlerinde Haemosporidian Parazitlerin İdentifikasyonu, Dağılımı ve Moleküler Karakterizasyonu

Çalışma süresince örneklenen, morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla tür teşhisleri sağlanan *Culicoides* örneklerinden oluşturulmuş baş/toraks (~10 örnek/havuz) ve abdomen (~10 örnek/havuz) havuzlarında Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Mt-cytb nested PCR analizleri sonucu bazı izolatlarda belirlenen amplikonların agaroz jel üzerinde görünümü Şekil 4.20'de verilmiştir. Tablo 4.4'de görüldüğü üzere incelenen 88 abdomen havuzunun 9'u (%10,22), 88 baş/toraks havuzlarının ise 7'si (%7,95) *Plasmodium/Haemoproteus* tür veya nesilleri ile enfekte saptanmıştır. Örneklerin hiçbirinde *Leucocytozoon* sp. pozitifliği bulunmamıştır. Vektör potansiyelleri açısından sporozoit gelişimi temelinde baş/toraks pozitiflikleri temel alınmış ve minimum enfeksiyon oranları (MIRs) ilgili formülasyona göre hesaplanmıştır. Tablo 4.4'de görüldüğü üzere baş/toraks pozitiflikleri yalnızca *C. circumscriptus* türlerinden oluşturulmuş havuzlarda belirlenmiş ve bu tür için minimum enfeksiyon oranı (MIRs) %22,2 olarak tespit edilmiştir.



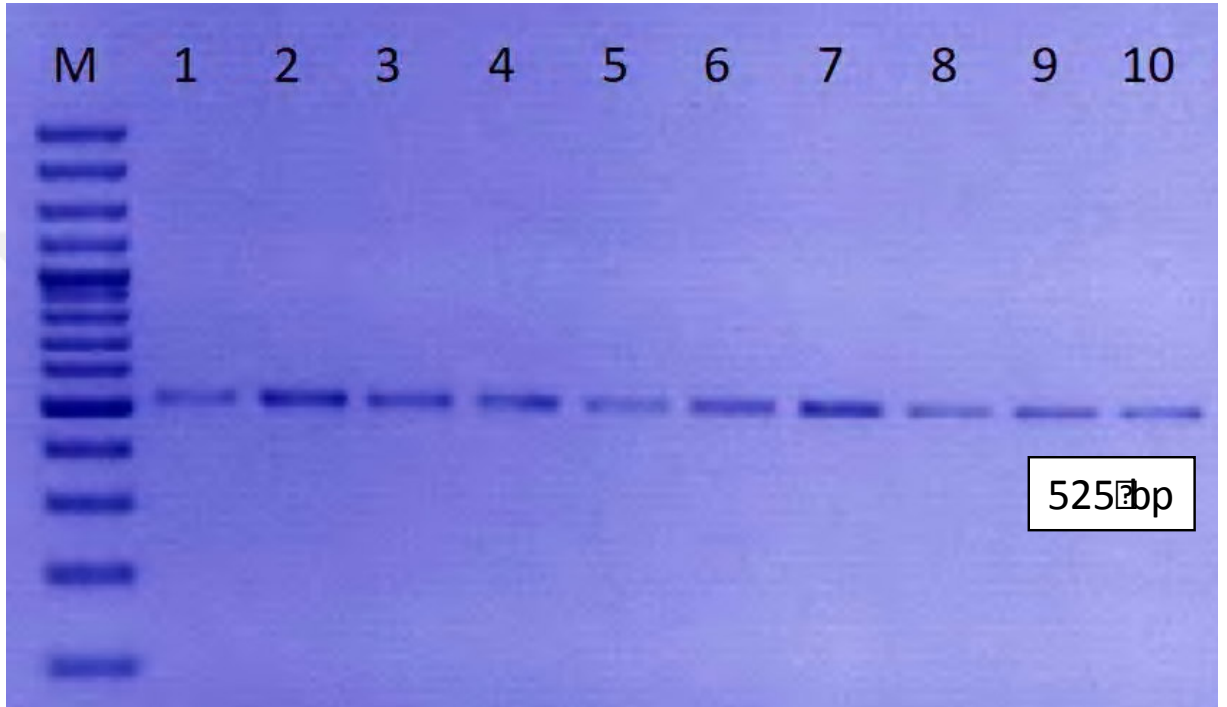
Şekil 4.20 Bazı *Plasmodium/Haemoproteus* pozitif *Culicoides* örneklerine ait izolatların mt-cytb gen bölgesini amplifiye eden primerler ile nested PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker; 1-5,8,9,11,13-15: *Plasmodium/Haemoproteus*,16: Negatif kontrol; 17: Pozitif kontrol DNA

Tablo 4.4 İncelenen *Culicoides* ve sivrisinek örneklerinde Haemosporidian parazitlerin moleküler analiz sonuçları

İnspekt Türü	İncelenen Havuz Sayısı										<i>Plasmodium/Haemoproteus</i> Pozitifliği									
	Bergama		Ödemiş		Kemalpaşa		Foça		Toplam		Bergama		Ödemiş		Kemalpaşa		Foça		Toplam	
	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT	A	BT
<i>C. circumscriptus</i>	5	5	7	7	10	10	7	7	29	29	1	1	0	1	0	3	0	2	1	7
<i>C. imicola</i>	3	3	6	6	7	7	11	11	27	27	0	0	0	0	1	0	2	0	3	0
<i>Culicoides</i> sp. (<i>C. truncorum</i> 'a yakın)	6	6	2	2	0	0	0	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. nubeculosus</i> komp.	4	4	3	3	0	0	1	1	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. obsoletus</i>	1	1	3	3	3	3	0	0	7	7	1	0	2	0	0	0	0	0	3	0
<i>C. gejelensis</i>	1	1	0	0	2	2	1	1	4	4	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
<i>C. punctatus</i>	0	0	3	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. newsteadi</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	22	22	24	24	22	22	20	20	88	88	2	1	2	1	3	3	2	2	9	7

A: Abdomen havuz; BT: Baş/Toraks Havuz

Culicoides türlerinde belirlenen *Plasmodium/Haemoproteus* izolatlarına ait amplikonlar jelden pürifiye edilmiş (Şekil 4.21) ve sonrasında gen spesifik nested primerlerle çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Sekansların değerlendirilmesinden önce PCR primerleri ilgili izolatlara ait sekanslardan trimlenerek çıkarılmış ve 479 bp barkod bölge elde edilerek MalAvi veri tabanında yapılan blast analizleriyle karakterize edilmiştir.



Şekil 4.21 Bazı *Plasmodium/Haemoproteus* izolatlarına ait jelpürifiye mt-cytb gen bölgesi amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: 100 bp marker, 1-10: *Plasmodium/Haemoproteus* amplikonları

Haemosporidian parazitlerle pozitif belirlenen *Culicoides* türlerine ait izolatların sekans analizleri sonucu belirlenen parazit tür veya nesilleri GenBank aksesyon numaraları ile birlikte Tablo 4.5’de verilmiştir. GenBank aksesyonları vektörlük potansiyellerinin bir göstergesi olması açısından yalnızca baş/toraks havuzlarında belirlenen izolatlar için sağlanmıştır. Tablo 4.5’de görüleceği üzere *C. circumscriptus* baş/toraks havuzlarına ait pozitif yedi izolattan dördünün *Haemoproteus* sp. GAGLA05 nesli, üçünün ise *H. minutus* TURDUS2 nesline ait mt-ctb sekansları gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlarla araştırma yöresinde *C. circumscriptus*’un ilgili *Haemoproteus* nesilleri için muhtemel potansiyel vektörlük yaptığı ortaya konmuştur. *Culicoides* türlerine ait pozitif reaksiyon veren abdomen havuz izolatlarının tamamında *Plasmodium* mt-cytb

sekansları izole edilmiş olup bu sonucun da enfekte kanatlı kanı beslenmesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca elde edilen sonuçlar araştırma yöresinde kanatlı popülasyonlarında başta *P. relictum* SGS1 nesli olmak üzere çeşitli *Plasmodium* nesillerinin yaygın olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır.

Tablo 4.5 Sekans analiz sonuçlarına göre Haemosporidian parazitlerin moleküler karakterizasyonu

Tür	Sekanslanan izolat sayısı		Haemosporidia Sekans Karakterizasyonu			
	A	BT	<i>Plasmodium</i> tür/nesil	Sayı (A)	<i>Haemoproteus</i> tür/nesil	Sayı (BT) (GenBank Aksesyon*)
<i>Culicoides</i>						
<i>C. circumscriptus</i>	1	7	<i>Plasmodium</i> sp./CXPIP10	1	<i>H. minutus</i> /TURDUS2	3 (MF594402)
					<i>Haemoproteus</i> sp./GAGLA05	4 (MF594403)
<i>C. imicola</i>	3	0	<i>P. relictum</i> /SGS1	2		
			<i>Plasmodium</i> sp./YWT4	1		
<i>C. obsoletus</i>	3	0	<i>P. relictum</i> /SGS1	1		
			<i>Plasmodium</i> sp./CXPIP23	1		
			<i>Plasmodium</i> sp./SYCON02	1		
<i>C. gejelensis</i>	2	0	<i>P. relictum</i> /SGS1	1		
			<i>Plasmodium</i> sp./YWT4	1		

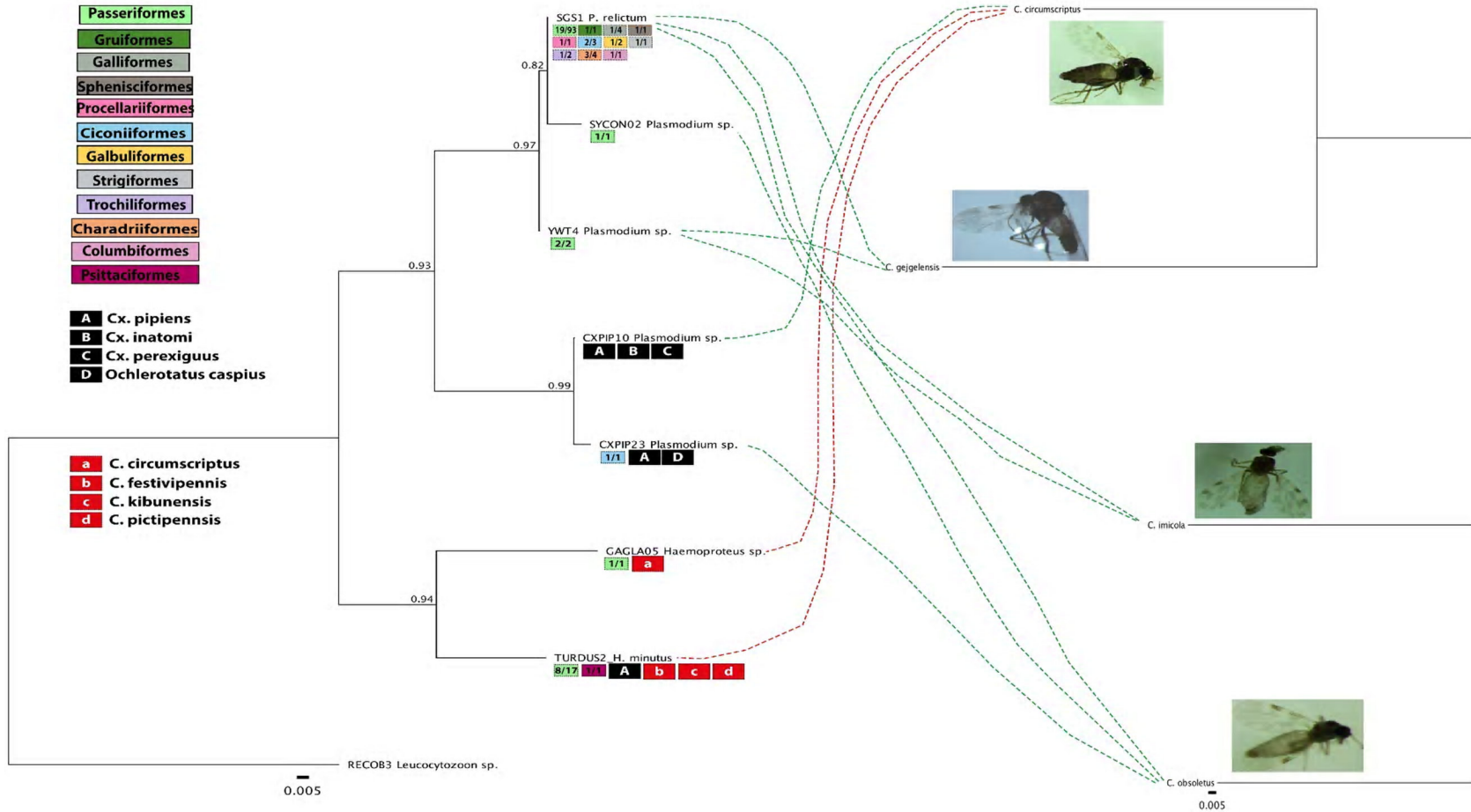
A: Abdomen havuzu; BT: Baş/Toraks havuzu

*: Vektörlük potansiyelleri açısından sadece BT havuzlarından elde edilen sekansların Haemosporidian tür ve nesli bazında GenBank kayıtları sağlanmış ve aksesyon numaraları verilmiştir.

4.2.4 *Culicoides* Türlerinde Moleküler Olarak Karakterize Edilen Haemosporidian Parazitlerin Filogenetik Analizleri

Araştırma yöresinde *Culicoides* türlerinde moleküler olarak karakterize edilen ve DNA barkodlaması sağlanan *Plasmodium* ve *Haemoproteus* tür ve nesillerinin filogenetik ilişkileri Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Çalışmada *C. circumscriptus* izolatlarında belirlenen *Haemoproteus* sp. GAGLA05 ve *H. minutus* TURDUS2 nesillerinin birbirlerine %7,2±1,5 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. *Haemoproteus* sp. GAGLA05 neslinin Malavi veri tabanındaki kayıtlara göre şimdiye kadar Passeriformes takımında bir kuş türünde ve yine *C. circumscriptus*'tan izole edildiği görülmüştür. *H. minutus* TURDUS2 neslinin ise Passeriformes takımında sekiz aileye

bağlı 17 kuş türü ve Psittaciformes takımında bir kuş türünden rapor edildiği dikkati çekmiştir. İlgili nesil ayrıca sivrisinek türlerinden *Cx. pipiens* ve *Culicoides* türlerinden *C. festivipennis*, *C. kibunensis* ve *C. pictipennis* türlerinden rapor edilmiştir. Çalışmada yine *C. circumscriptus* abdomen havuzlarından izole edilip karakterize edilen *Plasmodium* sp. CXPIP10 nesli *Cx. obsoletus*'tan izole ettiğimiz *Plasmodium* sp. CXPIP23 nesli ile %99,6 identiklik göstererek küme oluşturduğu belirlenmiştir. MalAvi kayıtlarında CXPIP10 neslinin çeşitli *Culex* türlerinden, CXPIP23 neslinin ise Ciconiiformes takımında bir kuş türü ile potansiyel vektörler *Cx. pipiens* ve *O. caspius*'tan bildirildiği görülmüştür. *C. gejjelensis*, *C. imicola* ve *C. obsoletus* izolatlarında karakterize edilen *P. relictum* SGS1, *C.imicola* ve *C. gejjelensis*'ten izole edilen *Plasmodium* sp. YWT4 ve *C. obsoletus*'tan izole edilen *Plasmodium* sp. SYCON02 nesillerinin genetik olarak yakın olduğu (ort. %99,3 identiklik) ve birlikte kümelenme gösterdikleri görülmüştür. MalAvi kayıtlarında *P. relictum* SGS1 neslinin 11 takımda çok sayıda kuş türünden, *Plasmodium* sp. SYCON02 ve YWT4 nesillerinin de Passeriformes takımındaki sınırlı sayıda kuş türünden rapor edildiği görülmüştür.



Şekil 4.22 Araştırmada *Culicoides* türlerinde belirlenen *Haemoproteus* ve *Plasmodium* tür ve nesillerinin mt-cytb gen bölgelerinin BI analizine göre filogenetik ilişkileri. Kırmızı yol ile gösterilenler baş/toraks izolatlarında, yeşil yol ile gösterilenler abdomen izolatlarında belirlenen Haemosporidian nesillerini işaret etmektedir. Node'ların önündeki rakamlar BI posterior olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Günümüze kadar ilgili nesillerin rapor edildiği kanatlı konak aile ve tür sayısı (her neslin altında ilgili takımın rengi ile beraber sırasıyla verilmiştir) ile vektör türleri ayrıca şekil üzerinde gösterilmiştir. Dış dal olarak *Leucocytozoon* sp. RECOB3 nesli kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) soyundaki sokucu sinekler kan ile beslenen en küçük sinekler olarak bilinmekte olup vücut uzunlukları 1-3mm arasında değişmektedir (9). *Culicoides* soyu medikal ve veteriner öneme sahip birçok patojene biyolojik vektörlük yapan çok sayıda türü içermesiyle önem arz etmektedir. Şimdiye kadar birçok nematod ve protozoon türünün yanısıra 50'nin üzerinde arbovirus türü çeşitli *Culicoides* türlerinden izole edilmiş olup bu türlerin veteriner (9, 46, 318) ve insan patojenlerinin (319, 320) naklindeki rolleri üzerine derlemeler yazılmıştır. *Culicoides* türlerinin insanlardan oportunistik beslenmesi de ayrıca turizm, ormancılık ve tarım endüstrisi üzerine etki gösterebilmektedir (9). Günümüzde *Culicoides* sineklerinin en büyük ekonomik etkisi mavi dil virüsü (BTV), epizootic haemorrhagic disease virüsü (EHDV) ve Afrika At Vebası virusunu (AHSV) nakletmeleriyle ilişkilidir. *Culicoides*lerin son zamanlarda Orthobunyavirus ve Schmallenberg virusun da vektörü oldukları ortaya konmuştur (321). Ayrıca çeşitli *Culicoides* türleri kanatlı haemosporidianlarından *Haemoproteus* türlerine ait nesillere aktif vektörlük yapmaktadır (322). İzmir ilinde iklim özelliğinden kaynaklı olarak (yüksek ısı ve nem) *Culicoides* aktivitesinin yılın uzunca bir döneminde devam ettiğinden dolayı sahada Mavi Dil Virüsü (BTV) sirkulasyonu devamlı olmaktadır. Bu sebeple de Mavi Dil hastalığının İzmir ilinde hayvancılık sektöründe her yıl önemli kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (323). Son yıllardaki salgınların dağılımı incelendiğinde Ege Bölgesinde 2011 yılında İzmir, Kütahya ve Aydın, 2012 yılında İzmir, Muğla, Denizli, Manisa ve Aydın, 2013 yılında İzmir ve Aydın, 2014 yılında İzmir, Aydın, Manisa, Muğla ve Denizli illerinde Mavidil hastalığı salgınları görülmüştür (323). Bu açıdan tez çalışmasında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın "Türkiye'de vektör kaynaklı önemli viral hayvan hastalıklarının (Mavi dil, Epizootik Hemorajik Ateş, Üç Gün Hastalığı ve Akabane) epidemiyolojik verilerinin ortaya konması ve vektörlerinin tespiti ile mücadele stratejilerinin belirlenmesi, erken uyarı sistemlerinin oluşturulması" konsepti ile de ilgili olarak İzmir ve çevresinde yaygınlık gösteren *Culicoides* türlerinin

morfolojik ve moleküler identifikasyonlarla belirlenmesi ve bu türlere ait izolatların genotipik karakterlerinin ve filogenetik yapılanmalarının ortaya çıkarılması ilk olarak hedeflenmiştir.

Biyolojik olarak nakledilen vektör kaynaklı patojenlerde, vektörlerin fenotipik ve genetik karakterleri bulaşmanın epidemiyolojisinin belirlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Birbirine yakın türlerin biyoloji ve ekolojisindeki göze çarpmayan farklılıklar bulaşma olasılığı üzerine önemli etki gösterebilmekte olup bu hususta en önemli nokta patojenle enfekte olabilme ve patojeni nakledebilme yeteneği (vektör-yeterliliği) ile spesifik konakla ilişki derecesidir (konak tercihi). Dolayısıyla türlerin doğru ve kesin ayrımı hastalık naklinin epidemiyolojisinin anlaşılmasında temel oluşturmaktadır (324). *Culicoides* soyu karışık bir soy olarak tarif edilmesine (325) karşın yaklaşık son otuz yıl içinde bu soydaki türler üzerine taksonomik çalışmaların büyük çoğunluğunun morfolojik analizlere dayandığı görülmektedir. Buna karşın “klasik” morfoloji taksonomisi uzmanlığı ve alt yapı mevcudiyetinin önemli derecede düşüş gösterdiği bilinmektedir. Sistematik için “moleküler entomoloji”nin gelişimi klasik taksonomi uzmanlığının gelişimine hızlı bir alternatif oluşturmuş (326), genetik karakterizasyon ve *Culicoides* türlerinin filogenetik tür konsepti yoluyla ayrımı artan bir önem kazanmıştır (324). Bu süreç özellikle arboviruslar ve *Haemoproteus* türlerine ait nesillerin yeni coğrafik bölgelerde ortaya çıkmasıyla hızlanmış olup klasik taksonomik uzmanlığın yokluğunda epidemiyolojik sorulara yanıt oluşturma için lokal faunanın hızlı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır (2).

Culicoides oldukça yüksek diversiteye sahip bir soy olup şimdiye kadar tarif edilmiş 1300’ün üzerinde tür ile tüm dünyada yayılış göstermektedir (324). Bu soy içerisinde Avrupa’da birçok türü tarif edilen *Culicoides* alt soyu oldukça önemli bir gruba oluşturmaktadır. *Culicoides* alt soyunda Türkiye’nin de içerisinde yer aldığı Palearktik bölgede bulunan tür sayısı kesin olarak bilinmemekte olup göstermiş oldukları geniş morfolojik çeşitlilik sebebiyle birçok araştırmacı tarafından “tür kompleksleri” olarak ifade edilmişlerdir. Bu son durum da ilgili taksayı birleştirmekte ve muhtemelen birçok tarif edilmemiş türü gizlemektedir (4, 46, 318). Bunun yanında farklı türlerin intraspesifik morfolojik ve genetik varyasyonlarının coğrafik dağılımlarını ortaya çıkarmak oldukça önem arz etmektedir (327).

*Culicoides*lerin tür düzeyinde identifikasyonları bazı durumlarda uzman taksonomistler için dahi güçlük oluşturabilmektedir. Tür kompleksleri içindeki sibling türlerin morfolojik ayrımlarının oldukça güç olduğu bildirilmiştir (4, 46, 318). Bu zorluğun üstesinden gelebilmek için özellikle evcil hayvanlarda hastalık oluşturan etkenlerin yayılımında sorumlu olan türler başta olmak üzere *Culicoides* türlerinin ortaya çıkarılmasında moleküler teknikler (COI-barkodları veya diğer moleküler markerlar) kullanılmaya başlanmıştır (3, 161, 328, 329). Örneklerin tür düzeyinde DNA barkod identifikasyonlarını takiben yeni morfolojik karakterlerin bulunması veya yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılan tür identifikasyonlarının konfirmasyonu mümkün olmuştur. Bu durum özellikle geniş çapta *Culicoides* örneklerinin identifikasyonunun zorunlu olduğu ekolojik çalışmalar kapsamında kullanışlı olmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılacak tipik olmayan örneklerin identifikasyonunu mümkün hale getirmiştir (327). Türkiye’de günümüze kadar *Culicoides* türlerine ait nesillerin genetik karakterizasyonları üzerine oldukça sınırlı veri bulunmakta olup günümüze kadar yapılan çalışmaların daha çok morfolojik identifikasyonlara dayalı prevalans çalışmaları olduğu görülmektedir. İlgili çalışmalarda daha çok kanat morfolojisi temelinde identifikasyonlara göre 61 *Culicoides* türünün Türkiye’de varlığı rapor edilmiştir (330). Çalışmamızda İzmir yöresinde araştırma bölgelerinde kanat morfolojisi temelinde morfolojik ve moleküler analizlerle *C. circumscriptus*, *C. nubeculosus komp.*, *C. newsteadi*, *C. imicola*, *C. gejjelensis*, *C. obsoletus*, *C. punctatus* ve *Culicoides sp.* (*C. truncorum*’a yakın) türleri identifiye edilmiştir. Bu türlerin *Culicoides sp.* (*C. truncorum*’a yakın) dışında tamamının daha önce Türkiye’nin farklı bölgelerinden rapor edilmiş türler olduğu görülmüştür. Araştırma yöresinde genel olarak en yaygın türler *C. circumscriptus* ve *C. imicola* belirlenirken en düşük yayılışı gösteren türler ise *C. punctatus* ve *C. newsteadi* bulunmuştur. Araştırmada ilçelere göre de genel olarak *C. circumscriptus* ve *C. imicola* yaygın türler olarak belirlenmiş yalnızca Bergama ilçesinde *Culicoides sp.*’nin (*C. truncorum*’a yakın) *C. imicola*’dan daha yaygın olduğu görülmüştür. Nitekim farklı yıllarda yapılan çalışmalarda *C. circumscriptus*’un Güney Anadolu (331), Batı Karadeniz (330) ve İç Anadolu (332, 333) Bölgelerinin çeşitli illerinde yaygın türlerden biri olduğu kaydedilmiştir. *C. imicola*’nın da benzer şekilde farklı dönemlerde yürütülen çalışmalarda Batı Karadeniz (330), Güney (334, 335), Güney Doğu (336) ve Ege Bölgeleri’nde (337) de dominant bir tür olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca her iki türün mavidil virüsü gibi çeşitli arboviruslara potansiyel

vektörlük yaptıkları (338-341) bilinmesine karşın kanatlı haemosporidian parazitler için günümüze kadar bu iki türden yalnızca *C. circumscriptus*'un muhtemel vektörlüğü üzerine kayıtlar (333, 342-344) bulunmaktadır. Bununla birlikte çalışmamızda identifiye edilen ve daha sınırlı yayılış gösterdiği belirlenen türlerden *C. newsteadi*, *C. obsoletus* ve *C. punctatus*'un da mavidil virusuna vektörlük yapabildikleri belirlenmiştir (339).

Türkiye'de Culicoides türleri ve vektörlük potansiyelleri üzerine moleküler çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde (336) Güney ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinden toplanmış *Culicoides* soyunda *Oecacta*, *Beltranmyia* ve *Monoculicoides* soy altlarında yer alan sırasıyla *C. schultzei*, *C. circumscriptus* ve *C. nubeculosus* türlerinin ribozomal ITS-1 gen bölgesi sekans analizleriyle moleküler identifikasyonu yapılmıştır. Yine Dik vd. (345) Antalya, Muğla, Aydın, İzmir, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale yörelerinden topladıkları ve morfolojik olarak identifiye ettikleri 13 *Culicoides* türüne ait örneklerde RT-PCR ile Epizootic Haemorrhagic Disease Virus (EHDV) ve Mavidil virus (BTV) araştırmışlar, 9 türe ait örneklerde (*C. imicola*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis*, *C. gejelensis*, *C. longipennis*, *C. nubeculosus*, *C. obsoletus*, *C. pulicaris* and *Culicoides* sp.) EHDV saptandığını buna karşın örneklerin hiçbirinde BTV'ye rastlanmadığını rapor etmişlerdir. Yıldırım ve ark. (346) yaptıkları çalışmada Batı Karadeniz Bölgesi ve Konya yöresinden toplanmış *Culicoides pulicaris* komplekste yer alan tür ve/veya haplotiplerin mt-COI gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonlarını ve filogenetik yapılanmalarını ortaya koymuşlardır. İlgili çalışmada (346) Pulicaris komplekste analizlere dahil edilen izolatlara ait nükleotid sekanslarında 22 farklı haplotip belirlenmiş ve *C. fagineus*, *C. flavipulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. pulicaris*, *C. punctatus* türleri moleküler olarak identifiye ve karakterize edilmiştir. Çalışma (346) ile ayrıca *C. lupicaris* türünün Türkiye'deki varlığı ilk kez moleküler düzeyde belirlenmiş ayrıca *Culicoides* alt soyunda morfolojik verilerle birlikte muhtemel yeni bir tür karakterize edilmiş ve haplotip bazında özellikleri ortaya konmuştur. Yıldırım ve ark. (333) Sultan Sazlığı yöresinde kanatlı haemosporidian parazitlerin moleküler ekolojisi üzerine yürüttükleri araştırmalarında morfolojik ve mt-COI barkod analizleri ile yörede en yaygın türleri *C. nubeculosus* kompleks türleri olarak belirlerken en düşük yayılışı gösteren türleri ise *C. dunningstoni* ve *C. gejelensis* olarak bulmuşlardır. Çalışmada

ayrıca bazı örneklerin spermateka incelemeleri ve sekans analizleri ile *C. nubeculosus* kompleks olarak nitelenen yöredeki türlerin *C. riethi* türüne ait olduğunu göstermişlerdir. Nitekim *C. nubeculosus* kompleksde yer alan türlerin kanat morfolojisinin büyük ölçüde simetrik bir yapı sergilediği ve kanat morfolojisine göre tür identifikasyonlarının zorluk arz ettiği bilinmektedir (306). Çalışmamızda benzer olarak *C. nubeculosus* kompleks olarak identifiye edilen izolatların bazılarının sekans analizleri ile *C. nubeculosus* ve daha az olarak *C. riethi* türlerine ait oldukları görülmüştür. Yıldırım ve ark. (333) yine çalışmalarında *C.riethi*, *C. circumscriptus*, *C. submaritimus*, *C. gejelensis*, *C. duddingstoni*, *C. longipennis* ve *C. festivipennis* türlerine ait nesiller için Türkiye’de ilk olarak mt-COI DNA barkodlarını sağlamışlar ve moleküler karakterizasyonlarını yapmışlardır. Ayrıca araştırmacıların (333) *C. submaritimus* ve *C. longipennis* nesillerine ait mt-DNA barkodları üzerine elde ettiği veriler Dünyada ilgili türler için ilk moleküler verileri oluşturmuş ve *C. longipennis* türü de moleküler taksonomiye kazandırılmıştır. Çalışmamızda İzmir yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerine ait mt-COI sekansları arasında 18 farklı haplotipi ortaya koyan 175 polimorfik bölge saptanmıştır. *Culicoides* türleri arasında belirlenen bu polimorfizm derecesi Yıldırım ve ark.’nın (333) Sultan Sazlığı yöresinde bildirmiş olduğu polimorfizm derecesinden (158 polimorfik bölge) yüksek olmasına karşın belirlenen haplotip sayısı daha düşük çıkmıştır. Ayrıca filogenetik analizler *C. newsteadi* dışında tüm türlere ait nesillerin monofiletik karakterde olduğunu göstermiştir. Bu sonucun da çeşitli araştırmacıların (3, 4, 333) bulguları ile paralel olduğu dikkati çekmiştir.

Nolan ve ark. (3) *C. newsteadi* için genetik heterojeniteyi oldukça düşük belirlemişler ve bu durumu sabit popülasyonlardaki gen akışıyla izah etmişlerdir. Ancak sonraki çalışmalar (4, 347) *C. newsteadi*’nin bir tür kompleksi olduğunu ve genetik olarak farklı haplotipleri barındırdığını ortaya koymuştur. Nitekim *C. newsteadi* içerisindeki bu farklı genotipik karakterdeki nesillerin yeni birer tür olabilecekleri ve yakın zamanda statülerinin ortaya konulabileceği de kaydedilmiştir (327). Bu durum da *C. newsteadi*’nin parafiletik durumunu açıklamaktadır. Çalışmamızda belirlenen *C. newsteadi* nesillerinin Batı Karadeniz izolatlarına yakın olduğu ve İtalya’dan rapor edilmiş bir izolatla birlikte *C. punctatus*’a yakın olarak *C. newsteadi* birinci filogenetik grubunda yer aldığı belirlenmiş ve Türkiye’de ikinci filogenetik grupta yer aldığı

belirlenen diğer Batı Karadeniz ve Sultan Sazlığı izolatlarıyla ortalama %19,5 genetik farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *C. nubeculosus*'a ait olduğu belirlenen haplotiplerin İsveç ve Fransa'dan rapor edilmiş izolatlarla %100 identik oldukları görülmüştür. Nitekim *C. nubeculosus* mt-COI barkodları Türkiye'den ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Belirlenen bu haplotiplerin Avrupa'nın farklı ülkelerinden bildirilen izolatlarla tamamen benzer olmaları bu tür için genetik heterojenitenin düşük olabileceğini işaret edebilir. Ancak Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilecek nesillerin genetik analizleriyle bu tür için genetik çeşitliliğin araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Yine *C. nubeculosus* kompleks içinde yer alan ve moleküler karakterizasyonla *C. riethi*'ye ait olduğu belirlenen haplotipin Sultan Sazlığı (%99,6) ve İsveç'ten (99,4) rapor edilen izolatlarla yüksek benzerlik gösterdiği görülmüştür. *C. nubeculosus* kompleks üzerine elde edilen bu sonuçlar Yıldırım ve ark.'nın (333) belirttiği Türkiye'de günümüze kadar morfometrik analizlerle bildirilmiş türlerin konfirmasyona ihtiyacı olduğunu göstermiştir. Bu durum özellikle vektör yatkınlığı ve surveiansı çalışmalarında oldukça önem arz etmektedir.

Morfolojik analizlerle *C. truncorum*'a yakın olarak tanımlanmış haplotipin en yüksek genetik yakınlığı İsveç'ten bildirilmiş *C. subfasciipennis* türü ile gösterdiği *C. truncorum* izolatlarına ise uzak olduğu belirlenmiştir. İlgili haplotipin *C. subfasciipennis* nesillerinden mt-COI gen bölgesi yönünden %7'nin üzerinde farklılık göstermiş olması bu haplotipin yeni bir tür olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Nitekim kanat morfolojisine göre ilgili haplotipe ait nesiller *C. subfasciipennis*'e belirli düzeyde benzerlik gösteriyor olmasına karşın farklılıkların da bulunduğu dikkati çekmiştir. Bu açıdan *Culicoides* sp. olarak karakterize edilmiş olan muhtemel bu yeni türün tanımlanması için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Yine elde edilen sonuçlar Türkiye'de *C. truncorum* bildirimlerinin de (348, 349) tekrar gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Araştırmamızda *C. gejjelensis* nesli olarak karakterize edilen haplotipin Sultan Sazlığı ve İsveç'ten bildirilmiş izolatlarla %100 identiklik gösterdiği görülmüştür. Yine bu sonuç da ilgili tür için genetik çeşitliliğin yüksek olmadığını işaret ediyor olabilir. Ancak *C. nubeculosus* türü için belirtildiği gibi bu tür için de Türkiye'de farklı

bölgelerden fazla sayıda neslin genetik olarak araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte ilgili türe ait kanat morfolojisinin *C. maritimus* ve *C. submaritimus* türleriyle büyük ölçüde benzediği görülmektedir (306, 307). Bu açıdan morfometrik identifikasyonlarda oldukça dikkatli olmak gerekmektedir.

Çalışmamızda *C. circumscriptus* içinde üç haplotip belirlenmiş olup bunlardan ilki (ERU-Izm-C.circ1) İsveç ve Sultan Sazlığı izolatlarına yüksek benzerlik göstermiş ve birlikte tür içinde oluşan üç clusterdan ilkinin oluşturmuşlardır. Filogenetik analizlerde ikinci cluster içerisinde İspanya, Slovakya ve Sultan Sazlığından bildirilmiş nesillerin yer aldığı görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen diğer haplotiplerin (ERU-Izm-C.circ2 ve ERU-Izm-C.circ3) ise ilgili grup içerisinde üçüncü clusterı oluşturduğu dikkati çekmiş ve bu haplotipler günümüze kadar moleküler DNA barkodlaması yapılmış olan *C. circumscriptus* nesillerinden daha farklı bulunmuşlardır. Yine elde edilen bu sonuçlar ilgili tür içerisinde farklı haplotiplerin Türkiye’de yaygın gösterdiğini ortaya koymuş olup bu tür üzerine geniş kapsamlı moleküler araştırmalara ihtiyaç olduğunu da göstermiştir.

C. punctatus içerisinde karakterize edilen üç haplotipin birbirlerine yüksek derecede identik oldukları ve aynı zamanda Sultan Sazlığı, Batı Karadeniz, İngiltere ve Danimarka’dan bildirilmiş nesillerle de genetik olarak yüksek benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Benzer olarak *C. obsoletus* içinde karakterize edilen iki haplotipin İspanya ve Slovakya’dan bildirilmiş nesillerle yüksek benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Çalışmada *C. imicola* içinde karakterize edilen haplotiplerin Yunanistan’dan izole edilen nesillerle en yüksek identikliğı gösterdiği görülmüş, Türkiye’de Konya yöresinden izole edilmiş bir izolatla ise daha düşük identiklik göstermiştir. Bu sonuçlar muhtemelen coğrafik yakınlık ile ilişkilendirilebilir ancak ilgili türün mavi dil virusuna önemli bir vektör olması da göz önüne alındığında bu tür üzerine Türkiye’de geniş çaplı ve kapsamlı moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunduğu görülmektedir.

Çalışmada araştırma yöresinde belirlenen *Culicoides* türlerine ait nesillerin haemosporidian parazitler açısından potansiyel vektörlüklerinin belirlenebilmesi amacıyla moleküler analizler yürütülmüştür. Enfektif ve enfekte *Culicoides* örneklerinin belirlenebilmesi amacıyla tür teşhisi yapılan her bir sineğin baş-toraks (enfektif) ile

abdomeni (enfekte) diseke edilerek havuzlar oluşturulmuş ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir (295, 350). Bilindiği gibi enfektif dönem sporozoitler dışı sineğin beslenmeleri esnasında tükrük bezleri vasıtasıyla nakledilmektedir. Tükrük bezleri toraksta yan kısımlarda özofagusa doğru uzanır (351). Fertilizasyon ve ookist gelişimi (non enfektif dönem) ise sineğin orta bağırsak kısmında (abdomen) şekillenmektedir. Bu açıdan BTH pozitiflikleri muhtemel vektör potansiyelinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (295, 350, 352). Nitekim BTH havuzlarından elde edilen pozitif izolatların sekans analizleri *Culicoides* türlerinin vektörlüğünü yaptığı *Haemoproteus* parazitlerini teyit ederken abdomen havuzlarından elde edilen sekanslar muhtemelen enfekte kan alınmasına bağlı olarak vektör olmadıkları *Plasmodium* parazitlerine ait sekansları göstermiştir. Bu açıdan çalışmada insekt türlerinde minimum enfeksiyon oranlarının (MIRs) hesaplanmasında BTH pozitiflikleri temel alınmıştır. *Culicoides* türlerine ait baş/toraks (BTH) ve abdomen havuzlarının (AH) haemosporidian parazitler yönünden moleküler incelemelerinde AH için *C. circumscriptus*, *C. imicola*, *C. obsoletus* ve *C. gejjelensis* (%10,22), BTH için ise yalnızca *C. circumscriptus* örneklerinin (%7,95) pozitif olduğu görülmüştür. *Culicoides* türlerinde haemosporidianların araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bobeva vd. (343), Bulgaristan'ın bazı bölgelerinde *Culicoides* türlerine ait örneklerde %2,17 oranında *Haemoproteus* pozitifliği bildirmişler ve *C. pictipennis* ve *C. circumscriptus* türlerini potansiyel vektör olarak kaydetmişlerdir. Ferraguti vd. (344), İspanya'da çeşitli bölgelerden örnekledikleri 97 *Culicoides* örneğinin 13'ünde Haemosporidian pozitifliği bildirmişler ve *C. circumscriptus*'un önemli bir vektör olduğunun altını çizmişlerdir. Santiago-Alarcon vd. (353), Almanya'da örnekledikleri 22 *Culicoides* türünden *C. kibunensis*, *C. pictipennis* ve *C. scoticus* türlerine ait örneklerde *Haemoproteus* pozitiflikleri bildirmişler ve bunların sekans analizleri ile karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yine Bernotiene ve Valkiunas (322), Rusya'dan örneklenip moleküler olarak analiz ettikleri 300 *Culicoides* örneğinin beşinde (%1,67) pozitiflik belirlemişler ve *C. impunctatus*, *C. punctatus* ve *C. pictipennis* türlerine ait pozitif örneklerde *Haemoproteus* nesillerinin karakterizasyonunu sağlamışlardır. Bobeva vd. (342), Bulgaristan'da topladıkları toplam 735 (640'ı nesil vermiş, 90'ı kan emmiş örnek) *Culicoides* örneğinden 17'sinde haemosporidian pozitifliği saptamışlar ve sekans analizleri ile *Haemoproteus* nesillerini *C. alazanicus*, *C. circumscriptus* ve *C. festivipennis* türlerinde belirlemişlerdir. Yıldırım ve ark. (333) Sultan Sazlığı yöresinde örnekledikleri *Culicoides* türlerinde BTH

pozitifliğini %80'nin üzerinde bulmuşlar ve bu yüksek oranı Sultan Sazlığı yöresinin çok çeşitli göçmen veya lokal kuş türlerinin yanısıra potansiyel vektör *Culicoides* türleri için de ideal bir ekosistem oluşturmasında bağlamışlardır. Araştırmacılar (333) Sultan Sazlığı yöresinde en yüksek MIRs'ı *C. nubeculosus* komp.'de belirlemiş bunu sırasıyla *C. gejjelensis*, *C. submaritimus*, *C. circumscriptus*, *C. longipennis*, *C. festivipennis* ve *C. newsteadi* türlerinin izlediğini kaydetmişlerdir. Araştırmamızda BTH pozitifliği yalnızca *C. circumscriptus* nesillerinde belirlenmiş olup bu tür için MIRs %22,2 olarak tespit edilmiştir. Saptanan bu oranın yurt dışı çalışmalarında yukarıdaki araştırmacıların (322, 341-343, 352) belirlemiş olduğu pozitiflik oranlarından yüksek olduğu, buna karşın Sultan Sazlığı'ndan rapor edilen orandan ise düşük olduğu dikkati çekmiştir. Yine çalışma sonuçları yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile paralel olarak *C. circumscriptus*'un *Haemoproteus* nesillerinin naklinde uygun potansiyel bir vektör olduğuna dair destekleyici kanıtlar sağlamıştır.

Araştırmada *C. circumscriptus*'un BTH'de belirlenen *Haemoproteus* ve *C. circumscriptus*, *C. imicola*, *C. obsoletus* ve *C. gejjelensis*'in AH'de tanımlanmış *Plasmodium* nesillerinin filogenetik yapıları analiz edilmiştir. *C. circumscriptus* BTH'de bulunan *Haemoproteus* sp. GAGLA05 ve *H. minutus* TURDUS2 nesillerinin birbirlerine genetik olarak uzak (%7,2 genetik farklılık) nesiller olduğu görülmüştür. *Haemoproteus* sp. GAGLA05 neslinin MalAvi veri tabanındaki kayıtlara göre şimdiye kadar Passeriformes takımında yer alan Bayağı Alakargada (*Garrulus glandarius*) (354) ve yine çalışma sonuçlarımızla paralel olarak Sultan Sazlığı yöresinde *C. circumscriptus*'tan (333) izole edildiği görülmüştür. *H. minutus* TURDUS2 neslinin ise kanatlı komünitelerinde yaygın bir nesil olduğu dikkat çekmiştir. Nitekim ilgili nesil günümüze kadar Passeriformes takımında sekiz aileye bağlı 17 kuş türü ve Psittaciformes takımında bir kuş türünden rapor edildiği dikkati çekmiştir (MalAvi: <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>). Ayrıca TURDUS 2 nesli sivrisinek türlerinden kan beslenmesi yapmış *Cx. pipiens* (355) ve *Culicoides* türlerinden *C. festivipennis*, *C. kibunensis* (356) ve *C. pictipennis* (343) türlerinden de bildirilmiştir. Çalışma sonucu *C. circumscriptus*'ta belirlenen *H. minutus* TURDUS2 nesli ilgili türün muhtemel potansiyel vektörlüğü açısından ilk kaydı oluşturmuştur. Çalışmada yine *C. circumscriptus* abdomen havuzlarından izole edilip karakterize edilen *Plasmodium* sp. CXPIP10 ile *Cx. obsoletus*'tan izole ettiğimiz *Plasmodium* sp. CXPIP23 nesillerinin

birbirlerine yakın olduğu (%99,6 identiklik) görülmüştür. MalAvi kayıtlarında CXPIP10 neslinin potansiyel vektör olarak çeşitli *Culex* türlerinden (357, 358), CXPIP23 neslinin ise Sultan Sazlığı yöresinde Ciconiiformes takımında yer alan Küçük Balaban (*Ixobrychus minutus*) ile potansiyel vektörler *Cx. pipiens* (333, 352) ve *O. caspius*'tan (357) bildirildiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar İzmir yöresinde kanatlı topluluklarında ilgili *Plasmodium* nesillerinin varlığını ve *Culicoides* türlerinin bu parazitlerle enfekte konaklardan kan beslenmesi yaptığını ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde *C. gejgelensis*, *C. imicola* ve *C. obsoletus*'a ait AH'da *P. relictum* SGS1, *C. imicola* ve *C. gejgelensis* AH'dan izole edilen *Plasmodium* sp. YWT4 ve *C. obsoletus* AH'dan izole edilen *Plasmodium* sp. SYCON02 nesillerinin birbirlerine genetik olarak yakın nesiller olduğu (ort. %99,3 identiklik) ve filogenetik gruplanma gösterdikleri dikkati çekmiştir. MalAvi kayıtlarında *P. relictum* SGS1 neslinin kanatlılarda oldukça yaygın bir nesil olduğu ve 11 takımda çok sayıda kuş türünden izole edildiği görülmüştür. Araştırmamızda farklı *Culicoides* türlerinden de izole edilen SGS1 neslinin benzer olarak İzmir yöresinde araştırma odaklarındaki kuşlarda da yaygın olduğu düşünülmüştür. MalAvi kayıtlarında *P. relictum* SGS1 nesline göre çok daha sınırlı yayılış gösterdiği dikkati çeken *Plasmodium* sp. SYCON02 ve YWT4 nesilleri günümüze kadar Passeriformes takımındaki sınırlı sayıda kuş türünden rapor edildiği görülmüş olup bu nesillerin de İzmir yöresinde kanatlı topluluklarında yayılış gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile İzmir yöresinde yaygınlık gösteren *Culicoides* türleri morfolojik ve moleküler olarak karakterize edilmiş ve ilgili türlere ait nesillerin kanatlı haemosporidian parazitlerine potansiyel vektörlükleri açısından moleküler ekoloji temelinde özgün epidemiyolojik veriler sağlanmıştır. Yine bu tez çalışması ile başta Mavi Dil virüsü olmak üzere birçok patojenin bulaşma dinamiklerinde önem arz eden çeşitli *Culicoides* türlerinin genetik karakterleri ortaya konmuştur. Mt-COI DNA barkodları sağlanan *Culicoides* ve *Haemoproteus* nesillerinin Türkiye için özgün biyolojik veriler olarak genetik veri tabanlarında kayıtları sağlanmıştır. Ayrıca araştırma yöresinde *C. imicola* başta olmak üzere Mavi Dil virusunun aktif vektörü olarak bilinen türlerin yaygın olarak belirlenmesi bu hastalığa karşı konak-patojen-vektör bütününde kontrol ve mücadele stratejilerinin oluşturulması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, ayrıca Türkiye'de *Culicoides* türleri üzerine yapılan

epidemiyolojik araştırmalarda moleküler tabanlı tekniklerin morfometrik analizlerle birlikte yürütülmesi ile farklı coğrafyalarda yaygınlık gösteren türlerin daha özgün olarak belirlenebileceğini ve ayrıca kriptik veya sibling türlerin de ortaya çıkarılabileceğini göstermiştir. Diğer taraftan bu çalışma, Türkiye'deki farklı biyocoğrafik karakterler göz önüne alındığında *Culicoides* türleri ve naklettikleri hastalıklar üzerine benzeri moleküler ekolojik ve epidemiyolojik detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunduğunu da ortaya koymuştur.



6. KAYNAKLAR

1. Borkent A. World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) 2012. Available from: <http://www.inhs.illinois.edu/research/FLYTREE/Borkent.html>.
2. Carpenter S, Wilson A, Mellor PS. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. Trends Microbiol. 2009; 17 (4): 172-178.
3. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, et al. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pullicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. Vet Microbiol. 2007; 124 (1-2): 82-94.
4. Pages N, Munoz-Munoz F, Talavera S, et al. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. Vet Parasitol. 2009; 165 (3-4): 298-310.
5. Garros C, Balenghien T, Carpenter S, et al. Towards the PCR-based identification of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus Avaritia. Parasites & Vectors. 2014; 7: 223.
6. Borkent A. Biting midges (Ceratopogonidae:Diptera) from Lower Cretaceous Lebanese amber with a discussion of the diversity and patterns found in other ambers. In: Grimaldi D, editor. Studies on fossils in amber, with particular reference to the Cretaceous of New Jersey: Leiden: Backhuys; 2000. p. 355-452.
7. Borkent A, Grogan WL. Catalog of the New World Biting Midges North of Mexico (Diptera, Ceratopogonidae). Zootaxa. 2009; 2273: 1-48.

8. Bellis GA. Studies on the taxonomy of Australasian species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). PhD thesis, University of Queensland, Australia; 2013.
9. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Ann Rev Entomol.* 2000; 45: 307-340.
10. Laird M. A ceratopogine midge (*Culicoides anophelis* Edwards, 1922) sucking engorged blood from a mosquito (*Armigeres lacuum* Edwards, 1922) at Palmamal, New Britain. *Trans R Soc N Zeal.* 1946; 76: 158-161.
11. Wirth WW, Hubert AA. *Trithecoides*, a new subgenus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Pacific Insects.* 1959; 1: 1-38.
12. Sen P, Das Gupta SK. Feeding habits of *Culicoides anophelis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull Cal Sc Trop Med.* 1959; 7: 108-109.
13. Das Gupta SK. *Culicoides (Trithecoides) anophelis* Edwards (Insecta: Diptera: Ceratopogonidae) as an ectoparasite of insect vectors. *Proc Zool Soc Cal.* 1964; 17: 1-20.
14. Campbell JA, Pelham-Clinton EC. A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera, Ceratopogonidae). *Proc R Soc Edinb* 1960; 67: 181-302.
15. Borkent A. Biting midges from Upper Cretaceous New Jersey amber (Diptera: Ceratopogonidae). *Am Mus Nov.* 1996; 3159: 1-29.
16. Jamnback H. Structure of the antennae and mouthparts as related to feeding habits of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the 12th International Congress of Entomology; London 1965.* p. 817.
17. Wirth WW, Navai S. Terminology of some antennal sensory organs of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol.* 1978; 15 (1): 43-49.
18. Rowley WA, Cornford M. Scanning electron microscopy of the pit of the maxillary palp of selected species of *Culicoides*. *Can J Zool.* 1972; 50: 1207-1210.

19. Braverman YH, P.E., . The relationship between the numbers of some antennal and palpal sense organs and host preference in some *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from southern Africa. *J Med Entomol.* 1979; 15: 419-424.
20. Braverman Y, Rubina M, Frish K. Pathogens of veterinary importance isolated from mosquitoes and biting midges in Israel. *Insect Sci App.* 1981; 2: 157-161.
21. Meiswinkel R, Linton YM. Afrotropical *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae): morphological and molecular description of a novel fruitinhabiting member of the Imicola Complex, with a re-description of its sister species *C. (Avaritia) pseudopallidipennis* Clastrier. *Cimbebasia.* 2003; 19: 37-79.
22. Wirth WW, Hubert AA. *Culicoides* of Southeast Asia. *Memoirs of the American Entomological Institute.* 1989; 44.
23. Borkent A. Biting midges (Ceratopogonidae: Diptera) feeding on a leatherback turtle in Costa Rica. *Brenesia.* 1995; 43-44: 25-30.
24. Lewis DJ. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Trans. R Entomol Soc London.* 1975; 126: 497-532.
25. Muller MJ, Murray MD, Edwards JA. Blood-sucking midges and mosquitoes feeding on mammals at Beatrice Hill. *Aust J Zool.* 1981; 29: 573-588.
26. Bellis GA, Melville LF, Hunt NT, et al. Temporal activity of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle near Darwin, Northern Territory, Australia. *Vet Ital.* 2004; 40 (3): 324-328.
27. Barnard BJ. Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort J Vet Res.* 1997; 64 (3): 227-233.
28. Buckley JJC. On *Culicoides* as a vector of *Onchocerca gibsoni* (Cleland & Johnston, 1910). *J Helminthol.* 1938; 16: 121-158.
29. Cheah TS, Rajamanickam C. Occurrence of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in sheep sheds and their relevance to bluetongue in Peninsular Malaysia. *Trop Anim Heal Prod.* 1991; 23 (1): 63-65.

30. Doherty WM, Bishop AL, Melville LF, et al. Protection of cattle from *Culicoides* spp. in Australia by shelter and chemical treatments. *Vet Ital.* 2004; 40 (3): 320-323.
31. Hoshino C. Note on biting midges collected by light traps at a cowshed in Ishigaki-jima, Ryukyu Islands. *Japanese J San Zool.* 1985 36: 55-58.
32. Meiswinkel R, Baylis M, Labuschagne K. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bull Entomol Res.* 2000; 90 (6): 509-515.
33. Melville L, Hunt N, Bellis G, et al. Protection of cattle from NT vectors of bluetongue and BEF viruses by covered pens and chemicals. *Arbovirus Research in Australia.* 2005; 9: 224-229.
34. Standfast HA, Dyce AL. Arthropods biting cattle during an epizootic of ephemeral fever in 1968. *Aust. Vet J.* 1972; 48 (3): 77-80.
35. Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Med Vet Entomol.* 2008; 22 (3): 175-187.
36. Linley JR. Biting midges of mangrove swamps and saltmarshes (Diptera: Ceratopogonidae). In: Cheng L, editor. *Marine Insects.* Amsterdam: North-Holland Pub. Co.; 1976.
37. Becker P. Observations on the life cycle and immature stages of *Culicoides circumscriptus* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc R Soc Edinb.* 1961; 67: 363-386.
38. Glukhova VM. Lichinki mokretsov posemeistv Palpomyiinae i Ceratopogoninae fauny SSSR (Diptera: Ceratopogonidae = Heleidae) [Larvae of the biting midge subfamilies Palpomyiinae and Ceratopogoninae of the fauna of the USSR]. *Opredelitchi po Faune SSSR, izdavaemye Zoologicheskim Institutom AN SSSR.* 1979; 121: 1-231
39. Jobling B. On the bloodsucking midge *Culicoides vexans* Staeger, including the description of its eggs, and the first-stage larva. *Parasitology.* 1953; 43: 148-159.

40. Megahed MM. A culture method for *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory, with notes on the biology. Bull Entomol Res. 1956; 47: 107-114.
41. Parker AH. Studies on the eggs of certain biting midges (*Culicoides* Latreille) occurring in Scotland. Proc R Entomol Soc London (A). 1950 25: 43-52.
42. Campbell MM, Kettle DS. Number of adult *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) emerging from bovine dung exposed under different conditions in the field. Aust J Zool. 1976; 24: 75-85.
43. Downes JA. What is an arctic insect? . Can Entomol. 1962; 94: 143-162.
44. Cannon LRG, Reye EJ. A larval habitat of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Keiffer (Diptera: Ceratopogonidae). J Entomol Soc Queensland. 1966; 5: 7-9.
45. Nevill EM. Biological studies on some South African *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) and the morphology of their immature stages [M.Sc. (Agric.) Thesis]: University of Pretoria; 1967.
46. Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM. Vectors: *Culicoides* spp. . In: Coetzer JAW, Tustin RC, editors. Infectious Diseases of Livestock. Cape Town: Oxford University Press; 2004. p. 93-136.
47. Kettle DS, Lawson JWH. The early stages of British biting midges *Culicoides* Latreille and allied genera. Bull Entomol Res. 1952; 43: 421-467.
48. Downes JA, Kettle DS. Descriptions of three species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) new to science, together with notes on, and a revised key to the British species of the pulicaris and obsoletus groups. Proc R Entomol Soc London (B). 1952; 21: 61-78.
49. Dyce AL. Distribution of *Culicoides* (*Avaritia*) species. (Diptera: Ceratopogonidae) west of the Pacific ocean. In: St George TD, Kay BH, editors. Arbovirus Research in Australia: CSIRO and QIMR, Brisbane; 1982. p. 35-43.
50. Dyce AL, Marshall BD. An early record of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) developing in the dung of game animals in southern Africa Onderstepoort J Vet Res. 1989; 56: 85-86.

51. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) kanagai* Khamala & Kettle 1971, reared from elephant dung in the Kruger National Park, South Africa. Onderstepoort J Vet Res. 1987; 54: 585-590.
52. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African Buffalo, Blue Wildebeest and cattle in South Africa. Onderstepoort J Vet Res. 1989; 56: 23-39.
53. Nevill EM. (A significant new breeding site of *Culicoides pallidipennis* Carter, Ingram and Macfie (Diptera: Ceratopogonidae). J South Afri Vet Med Assoc. 1968; 39: 61.
54. Bishop AL, McKenzie HJ. Overwintering of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in the Hunter Valley, N.S.W. J Aust Entomol Soc. 1994; 33: 159-163.
55. Watson JAL, Dyce AL. The larval habitat of *Podopteryx selysi* (Odonata: Megapodagrionidae). J Aust Entomol Soc. 1978; 17: 361-362.
56. Dyce AL, Murray MD. Notes on the pupal behaviour and collection of larvae and pupae of some Australian *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). J Ent Soc Qd. 1966; 5: 37-39.
57. Downes JA. Assembly and mating in biting Nematocera. Proceedings of the 10th International Congress of Entomology. 1958; 2: 425-434.
58. Downes JA. Notes on the organs and processes of sperm-transfer in the lower Diptera. Can Entomol. 1968; 100: 608-617.
59. Downes JA. The swarming and mating flight of Diptera. Ann Rev Entomol. 1969; 14: 271-298.
60. Blackwell A, Mordue AJ, Mordue W. Morphology of the antennae of two species of biting midge: *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) and *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera, Ceratopogonidae). J Morphol. 1992; 213 (1): 85-103.

61. Dyce AL. *Culicoides paragarcai*, a new ornatus group species from Papua New Guinea and the Solomon Islands (Diptera: Ceratopogonidae). *Aust J Entomol.* 1996; 35 (4): 313-318.
62. Muller MJ, Standfast HA, T.D. SG, et al. *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of arboviruses in Australia. In: St. George TD, B.H. K, editors. *Arbovirus Research in Australia* 1982. p. 43-49.
63. Meiswinkel R. The 1996 outbreak of African horse sickness in South Africa- the entomological perspective. In: Mellor PS, Baylis M, Hamblin C, et al., editors. *African Horse Sickness: Wein:Springer-Verlag.* 342; 1998. p. 69-83.
64. Reye EJ. The common pest species. *Bull Mosquito Cont Assoc Aust.* 1992; 4 (3): 6-14.
65. Hendry G. *Midges in Scotland.* 4th edition ed. Edinburgh: Mercat Press,; 2004
66. Linley JR, Davies JB. Sandflies and tourism in Florida and the Bahamas and Caribbean area. *J Econ Entomol.* 1971; 64: 264-278.
67. Ratnayake J, Dale PE, Sipe NG, et al. Impact of biting midges on residential property values in Hervey Bay, Queensland, Australia. *J Am Mosq Cont Assoc.* 2006; 22 (1): 131-134.
68. Tokunaga M, Murachi EK. Insects of Micronesia. Diptera: Ceratopogonidae. *Insects of Micronesia.* 1959; 12 (3): 103-434.
69. Wirth WW, Arnaud PH. Polynesian biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Pacific Insects.* 1969; 11: 507-520.
70. Wirth WW, Blanton FS. Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera:Heleidae). *Proc US Nat Muse.* 1959; 109: 237-482.
71. Wongsathuaythong S, Fuangtong R, Ketavan C. Insect and arachnid allergy in Thailand. *J Med Assoc Thailand.* 1977; 60: 274-278.
72. Braverman Y. Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Vet J.* 1988; 20: 426.

73. McCaig J. A survey to establish the incidence of sweet itch in ponies in the United Kingdom. *Vet Rec.* 1973; 93: 444-446.
74. Mellor PS, McCaig J. The probable cause of 'sweet itch' in England. *Vet Rec.* 1974; 95: 411-415.
75. Nakamura R, Matsushashi A, Yamashita N, et al. Studies on "Kasen" of horses in Hokkaido. III. Research on the actual state of the disease *Japanese Journal of Vet Res.* 1956; 4: 81-88.
76. Riek RF. Studies on Allergic Dermatitis (Queensland Itch) of the Horse: The aetiology of the disease. *Aust J Agri Res.* 1954; 5: 109-129.
77. Cybinski DH, Muller MJ. Isolation of arboviruses from cattle and insects at two sentinel sites in Queensland, Australia, 1979–1985. *Aust J Zool.* 1990; 38: 25-32.
78. Doherty RL, Carley JG, Standfast HA, et al. Virus strains isolated from arthropods during an epizootic of bovine ephemeral fever in Queensland. *Aust Vet J.* 1972; 48: 81-86.
79. Dyce AL. Bluetongue vectors in Australia - present and future. . In: Uren MF, Blok J, Manderson LH, editors. *Arbovirus research in Australia - Proceedings of the fifth symposium.* Brisbane: CSIRO and QIMR; 1989. p. 315-319
80. St George TD, Standfast HA, Cybinski DH. Isolations of Akabane virus from sentinel cattle and *Culicoides brevitarsis*. *Aust Vet J.* 1978; 54: 558-561.
81. Standfast HA, A.L. D, T.D. SG, et al. Isolation of arboviruses from insects collected at Beatrice Hill, Northern Territory of Australia, 1974-1976. *Aust J Biol Sci.* 1984; 37: 351-366.
82. Anderson RC. The life cycle and seasonal transmission of *Ornithofilaria fallisensis* Anderson, a parasite of domestic and wild ducks. *Can J Zool.* 1956; 34: 485-525.
83. Bartlett CM, Anderson RC. Development of *Chandlerella chitwoodae* (Filarioidea:Onchocercidae) in *Culicoides stilbezioides* and *Culicoides travisi* (Diptera: Ceratopogonidae). *Can J Zool.* 1980; 58: 1002-1006.

84. Davies JB, Trees AI, McCall PJ, et al. On the possibility of bovine *Onchocerca* species infecting *Simulium damnosum* sensu lato in the forest zone of Sierra Leone, II, Biting densities and filarial infections in *Simulium* spp. and *Culicoides* spp. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989; 83: 603-614.
85. Mellor PS. Studies of *Onchocerca cervicalis* Raillet et Henry 1910. V. The development of *Onchocerca cervicalis* larvae in the vectors. *J Helminthol.* 1975; 49: 33-42.
86. Nathan MB. Transmission of the human filarial parasite *Mansollea ozzardi* by *Culicoides phlebotomus* (Diptera: Ceratopogonidae) in coastal north Trinidad. *Bull Entomol Res.* 1981; 71: 97-106.
87. Robinson EJ. *Culicoides crepuscularis* (Malloch) (Diptera: Ceratopogonidae) as a host for *Chandlerella quiscali* (con Linstow, 1904) comb. N. (Filarioidea:Onchocercidae). *J Parasitol.* 1971; 57: 772-776.
88. Spratt DM, Dyce AL, Standfast HA. *Onchocerca sweetae* (Nematoda:Filarioidea): notes on the intermediate host. *J Helminthol.* 1978; 52: 74-81.
89. Akiba K. Studies on the Leucocytozoon found in the chicken in Japan. II. On the transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. *Japanese J Vet Sci.* 1960; 22: 309-317.
90. Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. Experimental vectors of *Haemoproteus meleagridis* Levine from wild turkeys in Florida. *J Wild Dis.* 1983; 19: 306-368.
91. Fallis AM, Bennet GP. Ceratopogonidae as intermediate hosts for *Haemoproteus* and other parasites. *Mosq News.* 1961; 21: 21-28.
92. Garnham PCC, Heisch RB, Minter DM, et al. *Culicoides adersi* Ingram and Macfie, 1923, a presumed vector of *Hepaticocystis* (= *Plasmodium*) *kochi* (Laveran, 1899). *Nature.* 1961 (190): 739-741.
93. Khan RA, Fallis AM. A note on the sporogony of *Parahaemoproteus velans* (= *Haemoproteus velans* Coatney and Roudabush) (Haemosporidia: Haemoproteidae) in species of *Culicoides*. *Can J Zool.* 1971; 49: 420-421.

94. Blackburn NK, Searle L, Phelps RJ. Viruses isolated from *Culicoides* (Dipt.: Cerat.) caught at the Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. *J Entomol Soc South Africa*. 1985; 48: 331-336.
95. Elbel RP, Crane GT, Callisher CH. Arbovirus isolation from southwestern Utah and northwestern Arizona insects 1972-1975. *Mosq News*. 1977; 37: 497-505.
96. Gibbs EPJ, Calisher CH, Tesh RB, et al. Bivens Arm virus: A new rhabdovirus isolated from *Culicoides insignis* in Florida and related to Tibrogargan virus of Australia. *Vet Microbiol*. 1989; 19: 141-150.
97. Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, et al. Isolations of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet Microbiol*. 1987; 15: 243-248.
98. Paweska JT, Prinsloo S, Venter GJ. Oral susceptibility of South African *Culicoides* species to live-attenuated serotype-specific vaccine strains of African horse sickness virus (AHSV). *Med Vet Entomol*. 2003; 17 (4): 436-447.
99. Standfast HA, Dyce AL, Muller MJ. Vectors of bluetongue virus in Australia. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn B, editors. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. Monterey, California: January 1984. Alan R. Liss. N.Y. *Prog Clin Biol Res*. 1985. 178: 177-186.
100. Venter GJ, Wright IM, Van Der Linde TC, et al. The oral susceptibility of South African field populations of *Culicoides* to African horse sickness virus. *Med Vet Entomol*. 2009; 23 (4): 367-378.
101. Wirth WW. A review of the pathogens and parasites of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *J Washington Acad Sci*. 1977; 67: 60-75.
102. Mullens BA, Sarto i Monteys V, Przhiboro AA. Mermithid parasitism in Ceratopogonidae: A literature review and critical assessment of host impact and potential for biological control of *Culicoides*. *Russian Entomol J*. 2008; 17 (1): 87-113.
103. Debenham M. Australasian species of the blood-feeding *Forcipomyia* subgenera, *Lasiohelea* and *Dacnoforcipomyia* (Diptera: Ceratopogonidae). *Aust J Zool*. 1983; 95: 1-61.

104. Poinar G, Jr., Sarto i Monteys V. Mermithids (Nematoda: Mermithidae) of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): *Heleidomermis cataloniensis* n. sp. from *Culicoides circumscriptus* Kieffer in Spain and a species of *Cretacimermis* Poinar, 2001 from a ceratopogonid in Burmese amber. Syst Parasitol. 2008; 69 (1): 13-21.
105. Reynolds DR, Chapman JW, Harrington R. The migration of insect vectors of plant and animal viruses. Adv Virus Res. 2006; 67: 453-517.
106. Whelan PI, Hayes GA, Montgomery B. Biting midge surveillance in Darwin Harbour, *Culicoides ornatus* (Diptera: Ceratopogonidae) abundance and dispersal. Arbovirus Research in Australia. 1997; 7: 326-336.
107. Kay BH, Lennon T. Seasonal prevalence and bionomics of biting midges (Ceratopogonidae) at Ocean Shores, New South Wales. J Aust Entomol Soc. 1982; 21: 207-216.
108. Murray MD. Local dispersal of the biting-midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. Aust J Zool. 1987; 35: 559-573.
109. Johansen CA, Farrow RA, Morrisen A, et al. Collection of wind-borne haematophagous insects in the Torres Strait, Australia. Med Vet Entomol. 2003; 17 (1): 102-109.
110. Quinn MA, Halbert SE, Williams LI. Spatial and temporal changes in aphid (Homoptera: Aphididae) species assemblages collected with suction traps in Idaho. J Econ Entomol. 1991; 84: 1710-1716.
111. Dyce AL, Standfast HA, Kay BH. Collection and preparation of biting midges (fam. Ceratopogonidae) and other small diptera for virus isolation. J Aust Entomol Soc. 1972; 11: 91-96.
112. Hardy AC, Cheng L. Studies in the distribution of insects by aerial currents. III. Insect drift over the sea. Ecol Entomol. 1986; 11: 283-290.
113. Farrow RA, Dowse JE. Method of using kites to carry tow nets in the upper air for sampling migrating insects and its application to radar entomology. Bull Entomol Res. 1984; 74: 87-95.

114. Hollinger SE, Sivier KR, Irwin ME, et al. A helicopter-mounted isokinetic aerial insect sampler. *J Econ Entomol.* 1991; 84: 476-483.
115. Sellers RF. Weather, host and vector - their interplay in the spread of insectborne animal virus diseases. *J Hyg (Cambridge).* 1980; 85: 65-102.
116. Sellers RF, Pedgley DE, Tucker MR. Rift Valley fever, Egypt 1977: disease spread by windborne insect vectors?. *Vet Rec.* 1982; 110: 73-77.
117. Johansen CA, van den Hurk AF, Pyke AT, et al. Entomological investigations of an outbreak of Japanese encephalitis virus in the Torres Strait, Australia, in 1998. *J Med Entomol.* 2001; 38 (4): 581-588.
118. Johansen CA, van den Hurk AF, Ritchie SA, et al. Isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Western Province of Papua New Guinea, 1997-1998. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62 (5): 631-638.
119. Bishop AL, Kirkland PD, McKenzie HJ, et al. Distribution and seasonal movements of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) at the southern limits of its distribution in New South Wales and their correlation with arboviruses affecting livestock. *J Aust Entomol Soc.* 1995; 34: 289-298.
120. Braverman YC, F. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Rev Sci Tech.* 1996; 15: 1037-1052.
121. Sellers RF, Maarouf AR. Possible introduction of epizootic hemorrhagic disease of deer virus (serotype 2) and bluetongue virus (serotype 11) into British Columbia in 1987 and 1988 by infected *Culicoides* carried on the wind. *Can J Vet Res.* 1991; 55: 367-370.
122. Chapman HF, Hughes JM, Ritchie SA, et al. Population structure and dispersal of the freshwater mosquitoes *Culex annulirostris* and *Culex palpalis* (Diptera: Culicidae) in Papua New Guinea and northern Australia. *J Med Entomol.* 2003; 40 (2): 165-169.

123. Nolan DV, Dallas JF, Piertney SB, et al. Incursion and range expansion in the bluetongue vector *Culicoides imicola* in the Mediterranean basin: a phylogeographic analysis. *Med Vet Entomol.* 2008; 22 (4): 340-351.
124. Wirth WW. The Heleidae of California. University of California Publications in Entomology 1952; 9: 95-266.
125. Arnaud PH. The heleid genus *Culicoides* in Japan, Korea and Ryukyu Islands (Insecta: Diptera). *Microentomology.* 1956; 21: 84-207.
126. Tokunaga M. Biting midges of the genus *Culicoides* from New Guinea (Diptera: Ceratopogonidae). *Pacific Insects.* 1962; 4: 457-516.
127. Delfinado MD. Philippine Zoological Expedition 1946–1947. The Philippine biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Fieldiana Zoology.* 1961; 33: 627-675.
128. Khamala CPM, Kettle DS. The *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) of East Africa. *Trans R Entomol Soc London.* 1971; 123: 1-95.
129. Howarth FG. Biosystematics of the *Culicoides* of Laos (Diptera: Ceratopogonidae). *Int J Entomol.* 1985; 27: 1-96.
130. Glukhova VM. Krovosoushchie mokretsy rodov *Culicoides* i *Forcipomyia* (Ceratopogonidae) [Bloodsucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (Ceratopogoniae)]. *Fauna SSSR. Novaya seriya No 139. Nasekomye dvukrylye.* 1989; 3: 1-408.
131. Yu YX, Liu JH, Liu GP, et al. Ceratopogonidae of China, Insecta, Diptera. Beijing: Military Medical Science Press; 2005. 1699 p.
132. Arnaud PH, Wirth WW. A name list of World *Culicoides*, 1956-1962. *Proc Entomol Soc Washington.* 1964; 66: 19-32.
133. Wirth WW, A.L. D. The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses. In: Barber TL, Jochim MM, Osburn BI, editors. *Bluetongue and Related Orbiviruses.* 178. Monterey, California: January 1984. Alan R. Liss, N.Y. *Prog Clin Biol Res.* 1985; p. 151-164.

134. Boorman JPT, Hagen DV. A name list of world *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae). Int J Dipterological Res. 1996; 7 (3): 161-192.
135. Borkent A, Wirth WW. World species of biting midges (Diptera:Ceratopogonidae). Bull Am Muse Nat His. 1997; 233-257.
136. Dyce AL. Biogeographic origins of species of the genus *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae) of the Australasian Region. Arbovirus Res Aust. 2001; 8: 133-140.
137. Ilango K. Bluetongue virus outbreak in Tamil Nadu, southern India: Need to study the Indian biting midge vectors, *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). Curr Sci. 2006; 90 (2): 163-167.
138. Carpenter S, McArthur C, Selby R, et al. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. Vet Rec. 2008; 163: 589-592.
139. Root FM, Hoffman WA. The North American species of *Culicoides*. Am J Hyg. 1937; 25: 150-176.
140. Edwards FW, Oldroyd H, J. S. British blood-sucking flies. London. British Museum 1939
141. Fox I. Hoffmania, a new subgenus in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Proc Biol Soc Wash. 1948; 61: 21-28.
142. Vargas L. Beltranmyia n. subgen. of *Culicoides* (Insecta:Heleidae). Rev Ins Salub Enfer Trop Mexico. 1953; 13: 33-36.
143. Vargas L. Wirthomyia, a new subgenus of *Culicoides* (Diptera:Ceratopogonidae). Mosq News. 1973; 33: 112-113.
144. Wada Y. The Segnis group of *Culicoides* Latreille from Japan, with description of a new species. Trop Med. 1979; 21 (4): 197-210.
145. Remm H. New Synonyms and new names of Palaearctic Ceratopogonidae (Diptera). Eesti NSV Teaduste Akadeemia Toimetised. 30. Koide Biologia Number. 1981; 1:27-32.

146. Delécolle JC, Kremer M. Revision of *C. segnis*, *C. reconditus* and *C. riouxi* (Diptera, Ceratopogonidae) with a check list of species of the subgenus *Wirthomyia*. Mosq News. 1982; 42: 523.
147. Wirth WW, Dyce AL, Peterson BV. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the Nearctic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Cont Am Entomol Ins. 1985; 22 (4): 1-46.
148. Phillips RA, Grogan WLJ, Mullens BA. A new synonym of the biting midge, *Culicoides bottimeri* Wirth, with a redescription, new distribution records and seasonal activity data (Diptera: Ceratopogonidae). Zootaxa. 2006; 1122: 47-55.
149. Curran J. Molecular taxonomy. Nematologica (0028-2596). 1990; 36(4): 342.
150. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc London B, Biol Sci. 2003; 270 (1512): 313-321.
151. Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol Evol. 2003; 18: 70-74.
152. Meier R. DNA sequences in taxonomy: Opportunity and challenges. In: Wheeler Q, editor. The new taxonomy. New York: CRC Press; 2009. p. 95-127.
153. Dayrat B. Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc. 2005; 85: 407-415.
154. Teletchea F. After 7 years and 1000 citations: comparative assessment of the DNA barcoding and the DNA taxonomy proposals for taxonomists and non-taxonomists. Mitochondrial DNA. 2010; 21 (6): 206-226.
155. Hurst GDD, Jiggins F. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. Proc R Soc (Series B). 2005; 272: 1525-1534.
156. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol. 2007; 22 (3): 148-155.
157. Tabachnick WJ. Genetic differentiation among North American populations of *Culicoides variipennis*. Ann Entomol Soc Am. 1992; 85: 140-147.

158. Holbrook FR, Tabachnick WJ, Schmidtman ET, et al. Sympatry in the *Culicoides variipennis* complex (Diptera: Ceratopogonidae): a taxonomic reassessment. *J Med Entomol.* 2000; 37 (1): 65-76.
159. Raich TJ, Archer JL, Robertson MA, et al. Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *J Med Entomol.* 1993; 30 (1): 228-232.
160. Dallas JF, Cruickshank RH, Linton YM, et al. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Med Vet Entomol.* 2003; 17 (4): 379-387.
161. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, et al. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol.* 2006; 20 (2): 229-238.
162. Linton YM, Mordue (Luntz) AJ, Cruickshank RH, et al. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Med Vet Entomol.* 2002; 16: 139-146.
163. Mathieu B, Perrin A, Baldet T, et al. Molecular identification of Western European species of *obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *J Med Entomol.* 2007; 44 (6): 1019-1025.
164. Sebastiani F, Meiswinkel R, Gomulski LM, et al. Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Diptera, Ceratopogonidae), inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Mol Ecol.* 2001; 10 (7): 1773-1786.
165. Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, et al. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol.* 2006; 20 (2): 219-228.
166. Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, et al. Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med Vet Entomol.* 2009; 23 (1): 47-55.

167. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delécolle JC, et al. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Sys Entomol.* 2005; 30: 619- 631.
168. Beckenbach AT, Borkent A. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol Phyl Evol.* 2003; 27: 21-35.
169. Almeida EA, Danforth BN. Phylogeny of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae) inferred from four nuclear genes. *Mol Phyl Evol.* 2009; 50 (2): 290-309.
170. Moulton JK, Wiegmann BM. Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Mol Phyl Evol.* 2004; 31 (1): 363-378.
171. Wild AL, Maddison DR. Evaluating nuclear protein-coding genes for phylogenetic utility in beetles. *Mol Phyl Evol.* 2008; 48 (3): 877-891.
172. Valkiunas G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2005.
173. Ahmed FE, Mohammed AH. Schizogony in *Haemoproteus columbae* Kruse. *J Protozool.* 1977;24(3):389-393.
174. Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. Pre-erythrocytic development and associated host responses to *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *J Protozool.* 1986; 33 (3): 375-381.
175. Valkiunas G, Iezhova T. Peculiarities of the gametogenesis, zygote and ookinete formation of *Haemoproteus lanii* and *H. minutus* (Haemosporidia: Haemoproteidae) in vitro. *Ibidem.* 1995; 29: 380–389.
176. Atkinson CT. Vectors, epizootiology, and pathogenicity of avian species of *Haemoproteus* (Haemosporina: Haemoproteidae). *Bull Soc Vector Ecol.* 1991b; 16: 109-126.

177. Bukauskaite D, Ziegyte R, Palinauskas V, et al. Biting midges (*Culicoides*, Diptera) transmit *Haemoproteus* parasites of owls: evidence from sporogony and molecular phylogeny. *Parasites & Vectors*. 2015; 8: 303.
178. Peirce MA. A checklist of the valid avian species of *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *J Nat Hist*. 2005; 39 (42): 3621-3632.
179. Bennett GF. Phylogenetic distribution and possible evolution of the avian species of the Haemoproteidae. *Sys Parasitol*. 1993; 26 (1): 39-44.
180. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. 2009.
181. Mendes L, Piersma T, Lecoq M, et al. Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats. *Oikos*. 2005; 109 (2): 396-404.
182. Ricklefs RE. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89 (10): 4722-4725.
183. Sol D, Jovani R, Torres J. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia*. 2003; 135 (4): 542-547.
184. Bukauskaitė D, Žiegytė R, Palinauskas V, et al. Biting midges (*Culicoides*, Diptera) transmit *Haemoproteus* parasites of owls: evidence from sporogony and molecular phylogeny. *Parasit & Vectors*. 2015; 8: 303
185. Valkiunas G, Liutkevičius G, Iezhova TA. Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology*. 2002;88(5):864-868.
186. Mullens BA, Cardona CJ, McClellan L, et al. *Culicoides bottimeri* as a vector of *Haemoproteus lophortyx* to quail in California, USA. *Vet Parasitol*. 2006; 140 (1): 35-43.

187. O'Roke EC. The morphology, transmission, and life-history of *Haemoproteus lophortyx* O'Roke, a blood parasite of the California Valley Quail. Berkeley, Calif.: Univ. of California Press; 1930.
188. Tarshis IB. Transmission of *Haemoproteus lophortyx* O'Roke of the California valley quail by hippoboscids of the species *Stilbometopa impressa* (Bigot) and *Lynchia hirsuta* Ferris. *Exp Parasit.* 1955;4:464-492.
189. Bennett GF, Peirce MA. The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (family Columbidae). *J Nat Hist.* 1990; 24 (2): 311-325.
190. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phyl Evol.* 2008; 47 (1): 261-273.
191. Bennett GF, Fallis AM. Blood parasites of birds in Algonquin Park, Canada, and a discussion of their transmission. *Can J Zool.* 1960; 38 (2): 261-273.
192. Atkinson CT, Forrester DJ, Greiner EC. Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: seasonal transmission and vector abundance. *J Med Entomol.* 1988; 25 (1): 45-51.
193. Klei TR, DeGiusti DL. Seasonal occurrence of *Haemoproteus columbae* Kruse and its vector *Pseudolynchia canariensis* Bequaert. *J Wild Dis.* 1975; 11 (1): 130-135.
194. Ayala SC, Ramakka JM, Ramakka VF, et al. *Haemoproteus*, *Plasmodium* and hippoboscids ectoparasites of Colombian wild doves. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1977; 19 (6): 411-416.
195. Sol D, Jovani R, Torres J. Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography.* 2000; 23 (3): 307-314.
196. Hasselquist D, Ostman R, Waldenstroem J, et al. Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *J Ornithol.* 2007; 148 (4): 401-409.
197. Laird M. Migratory birds and the dispersal of avian malaria parasites in the South Pacific. *Can J Zool.* 1960; 38 (1): 153-155.

198. Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, et al. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol Ecol.* 2002; 11 (8): 1545-1554.
199. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new pcr assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol.* 2004; 90 (4): 797-802.
200. Valkiunas G, Iezhova TA. A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*. *J Parasitol.* 2001; 87 (4): 930-934.
201. Valkiunas G, Bairlein F, Iezhova TA, et al. Factors affecting the relapse of *Haemoproteus belopolskyi* infections and the parasitaemia of *Trypanosoma* spp. in a naturally infected European songbird, the blackcap, *Sylvia atricapilla*. *Parasitol Res.* 2004; 93 (3): 218-222.
202. Applegate JE, Beaudoin RL. Mechanism of spring relapse in avian malaria: effect of gonadotropin and corticosterone. *J Wild Dis.* 1970; 6 (4): 443-447.
203. Shikamaeki P, Raetti O, Hovi M, et al. Association between haematozoan infections and reproduction in the Pied Flycatcher. *Func Ecol.* 1997; 11 (2): 176-183.
204. Appleby BM, Anwar MA, Petty SJ. Short-term and long-term effects of food supply on parasite burdens in Tawny Owls, *Strix aluco*. *Funct Ecology.* 1999; 13 (3): 315-321.
205. Cox FE. Interactions in protozoan infections. *Int J Parasitol.* 1987; 17 (2): 569-575.
206. Navarro C. Predation risk, host immune response, and parasitism. *Behavioral Ecology.* 2004; 15 (4): 629-635.
207. Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW. Avian haemoatozoa: Mortality and pathogenicity. *J Nat His.* 1993; 27: 993–1001.
208. Bonneaud C, Pérez-Tris J, Federici P, et al. Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evol.* 2006; 60 (2).
209. Davidar P, Morton ES. Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *AUK.* 1993;110(1):109.

210. McCurdy DG, Shutler D, Mullie A, et al. Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *OIKOS*. 1998; 82 (2): 303-312.
211. Powers LV, Pokras M, Rio K, et al. Hematology and occurrence of hemoparasites in migrating Sharp-Shinned Hawks (*Accipiter striatus*) during fall migration. *J Raptor Res*. 1994; 28: 178–185.
212. Tella JL, Blanco G, Forero MG, et al. Habitat, world geographic range, and embryonic development of hosts explain the prevalence of avian hematozoa at small spatial and phylogenetic scales. *Proc N Acad Sci USA*. 1999; 96 (4): 1785-1789.
213. Figuerola J, Green AJ. Haematozoan Parasites and Migratory Behaviour in Waterfowl. *Evol Ecol*. 2000; 14 (2): 143-153.
214. Peirce MA, Mead CJ. Haematozoa of British birds. *J Nat His*. 1978; 12 (3): 337-340.
215. Smith RB, Greiner EC, Wolf BO. Migratory Movements of Sharp-Shinned Hawks (*Accipiter striatus*) Captured in New Mexico in Relation to Prevalence, Intensity, and Biogeography of Avian Hematozoa. *AUK*. 2004; 121 (3): 837-846.
216. Yezerinac SM, Weatherhead PJ. Plumage Coloration, Differential Attraction of Vectors and Haematozoa Infections in Birds. *J Anim Ecol*. 1995; 64 (4): 528-537.
217. Garvin MC, Remsen JV. An Alternative Hypothesis for Heavier Parasite Loads of Brightly Colored Birds: Exposure At the Nest. *AUK*. 1997; 114 (2): 179-191.
218. Greiner EC, Bennett GF, White EM, et al. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can J Zool*. 1975; 53 (12): 1762-1787.
219. Weatherhead PJ, Bennett GF. Ecology of Red-winged Blackbird parasitism by haematozoa. *Can J Zool*. 1991; 69 (9): 2352-2359.
220. Atkinson CT, Forrester DJ, Greiner EC. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *J Parasitol*. 1988; 74 (2): 228-239.
221. Cardona CJ, Ihejirika A, McClellan L. *Haemoproteus lophortyx* infection in bobwhite quail. *Avian Dis*. 2002; 46 (1): 249-255.

222. Acton HW, Knowles R. Studies on the Halteridium Parasite of the Pigeon, *Haemoproteus columbae*, Celli and San Felice. Indian J Med Res. 1914; 1 (4): 663-690.
223. Coatney GR. Relapse and associated phenomena in the *Haemoproteus* infection of the pigeon. Am J Epidemiol. 1933; 18 (1): 133-160.
224. Garvin MC, Greiner EC. Ecology of *Haemoproteus danilewskyi* Kruse. J Wild Dis. 2003; 39 (1): 170-178.
225. Ots I, Horak P. Health impact of blood parasites in breeding great tits. Oecologia. 1998; 116 (4): 441-448.
226. Garvin MC, Homer BL, Greiner EC. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). J Wild Dis. 2003; 39 (1): 161-169.
227. Evans M, Otter A. Fatal combined infection with *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*). Vet Rec. 1998; 143 (3): 72-76.
228. Mutlow A, Forbes N. *Haemoproteus* in Raptors: Pathogenicity, Treatment and Control. Wallbridge, England: Landsdown. Vet Surg; 1999.
229. Baker JR. *Haemoproteus palumbis* sp. nov. (Sporozoa, Haemosporina) of the English Wood-Pigeon *Columba p. palumbus*. Ibidem. 1966b; 13: 515-519.
230. Garnham PCC. Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell; 1966.
231. Miltgen F, Landau I, Ratanaworabhan N, et al. *Parahaemoproteus desseri* n. sp.; Gamétogonie et schizogonie chez l'hôte naturel: *Psittacula roseata* de Thaïlande, et sporogonie expérimentale chez *Culicoides nubeculosus*. Ann Parasitol Hum Comp. 1981; 56: 123-130.
232. Atkinson CT, Forrester DJ. Myopathy associated with megaloschizonts of *Haemoproteus meleagridis* in a wild turkey from Florida. J Wild Dis. 1987; 23 (3): 495-498.

233. Earle RA, Bastianello SS, Bennett GF, et al. Histopathology and morphology of the tissue stages of *Haemoproteus columbae* causing mortality in Columbiformes. *Avian Pathol.* 1993;22(1):67-80.
234. Ferrell ST, Snowden K, Marlar AB, et al. Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. *J Zoo Wild Med.* 2007; 38 (2): 309-316.
235. Pennycott T, Wood A, MacIntyre C, et al. Deaths in aviary birds associated with protozoal megaloschizonts. *Vet Rec.* 2006; 159 (15): 499.
236. Simpson VR. *Leucocytozoon*-like infection in parakeets, budgerigars and a common buzzard. *Vet Rec.* 1991; 129 (2): 30.
237. Hellgren O, Pérez-Tris J, Bensch S. A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. *Ecology.* 2009; 90 (10): 2840-2849.
238. Ventim R, Morais J, Pardal S, et al. Host-parasite associations and host-specificity in haemoparasites of reed bed passerines. *Parasitology.* 2012; 139 (3): 310-316.
239. Waldenström J, Bensch S, Hasselquist D, et al. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and *Haemoproteus* Infections From Avian Blood. *J Parasitol.* 2004; 90 (1): 191-194.
240. Bensch S, Hellgren O, PÉRez-Tris J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Res.* 2009; 9 (5): 1353-1358.
241. Beadell JS, Ishtiaq F, Covas R, et al. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proc R Soc B: Biol Sci.* 2006; 273 (1604): 2935-2944.
242. Ishtiaq F, Beadell JS, Baker AJ, et al. Prevalence and evolutionary relationships of haematozoan parasites in native versus introduced populations of common myna "*Acridotheres tristis*". *Proc R Soc B: Biol Sci.* 2006; 273 (1586): 587-594.
243. Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, et al. Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird. *PLOS ONE.* 2011; 6 (7): e21905.
244. Alfonso M. *Recent Advances in Studies on Avian Malaria Parasites: INTECH Open Access Publisher; 2012.*

245. Braga ÉM, Silveira P, Belo NO, et al. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. Mem Inst Osw Cr. 2011; 106: 3-11.
246. Martinez J, Martinez-De La Puente J, Herrero J, et al. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. Parasitology. 2009; 136 (7): 713-722.
247. Valkiunas G, Bensch S, Iezhova TA, et al. Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Underestimate Mixed Infections of Avian Blood Haemosporidian Parasites: Microscopy is Still Essential. J Parasitol. 2006; 92 (2): 418-422.
248. Clark NJ, Clegg SM, Lima MR. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. PARA Int J Parasitol. 2014; 44 (5): 329-338.
249. Sherratt TN, Wilkinson DM. Big questions in ecology and evolution. 2009.
250. Beier JC. Malaria Parasite Development in Mosquitoes. Ann Rev Entomol. 1998; 43 (1): 519-543.
251. Santiago-Alarcon D, Palinauskas V, Schaefer HM. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. Biol Rev. 2012; 87 (4): 928-964.
252. Foley DH, Rueda LM, Wilkerson RC. Insight into Global Mosquito Biogeography from Country Species Records. J Med Entomol. 2007; 44 (4): 554-567.
253. Grenyer R, Orme CDL, Jackson SF, et al. Global distribution and conservation of rare and threatened vertebrates. Nature. 2006; 444 (7115): 93-96.
254. Ejiri H, Sato Y, Kim KS, et al. Blood meal identification and prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at Kushiro Wetland, a subarctic zone of Japan. J Med Entomol. 2011; 48 (4): 904-908.

255. Santiago-Alarcon D, Havelka P, Schaefer HM, et al. Bloodmeal Analysis Reveals Avian *Plasmodium* Infections and Broad Host Preferences of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors. PLOS ONE. 2012 ;7 (2): e31098.
256. Poulin R. Evolutionary Ecology of Parasites (Second Edition). Princeton: Princeton University Press; 2011.
257. Krizanauskiene A, Hellgren O, Kosarev V, et al. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome B gene sequences. J Parasitol. 2006; 92 (6): 1319-1324.
258. Ricklefs RE, Fallon SM, Bermingham E. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. Sys Biol. 2004; 53 (1): 111-119.
259. Hayakawa T, Culleton R, Otani H, et al. Big Bang in the Evolution of Extant Malaria Parasites. Mol Biol Evol. 2008; 25 (10): 2233-2239.
260. Mittelbach GG, Schemske DW, Cornell HV, et al. Evolution and the latitudinal diversity gradient: speciation, extinction and biogeography. Ecol Lett. 2007; 10 (4): 315-331.
261. Bordes F, Morand S, Krasnov BR, et al. Parasite diversity and latitudinal gradients in terrestrial mammals. In: Morand Serge KBR, editor. The biogeography of host-parasite interactions. Oxford Biology. Oxford, Royaume-Uni: Oxford University Press; 2010. p. 89-98.
262. Currie DJ, Mittelbach GG, Cornell HV, et al. Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. Ecol Lett. 2004; 7 (12): 1121-1134.
263. Ricklefs RE, Outlaw DC. A Molecular Clock for Malaria Parasites. Science. 2010; 329 (5988): 226-229.
264. Bensch S, Hellgren O, Križanauskiene A, et al. How can we determine the molecular clock of malaria parasites? Trends Parasitol. 2013; 29 (8): 363-369.
265. Lewinsohn TM, Roslin T. Four ways towards tropical herbivore megadiversity. Ecol Lett. 2008; 11 (4): 398-416.

266. Beadell JS, Covas R, Gebhard C, et al. Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. *Int J Parasitol.* 2009; 39 (2): 257-266.
267. Dimitrov D, Zehtindjiev P, Bensch S. Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. *Acta Parasitol.* 2010; 55 (3): 201-209.
268. Ishtiaq F, Gering E, Rappole JH, et al. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: A regional survey. *J Wild Dis.* 2007; 43 (3): 382-398.
269. Norton DA, De Lange PJ. Host specificity in parasitic mistletoes (Loranthaceae) in New Zealand. *Funct Ecol.* 1999; 13 (4): 552-559.
270. Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, et al. Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasites – A molecular survey from Southeast Brazil. *PLOS ONE.* 2013; 8 (3): e57770.
271. Svensson-Coelho M, Blake JG, Loiselle BA, et al. Diversity, Prevalence, and Host specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. *Ornithological Monographs No. 76: American Ornithologists' Union;* 2013. p. 1-47.
272. Rueda LM. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. In: Balian EV, Lévêque C, Segers H, et al., editors. *Freshwater Animal Diversity Assessment.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2008. p. 477-487.
273. Fallon Sylvia M, Bermingham E, Ricklefs Robert E, et al. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: A regional analysis in the Lesser Antilles. *Am Nat.* 2005; 165 (4): 466-480.
274. Pérez-Rodríguez A, Ramírez Á, Richardson DS, et al. Evolution of parasite island syndromes without long-term host population isolation: parasite dynamics in Macaronesian blackcaps *Sylvia atricapilla*. *Glob Ecol Biogeo.* 2013; 22 (12): 1272-1281.

275. Huijben S, Schaftenaar W, Wijzman A, et al. Avian malaria in Europe: An emerging infectious disease? In: Takken W, Knols BGJ, editors. *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2007. p. 59-74.
276. Bennett GF, Earlé RA, Du Toit H, et al. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-Saharan birds. *Onderstepoort J Vet Res*. 1992; 59 (1): 1-73.
277. Peirce MA. Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. *Journal of Natural History*. 1981;15(3):419-458.
278. White EM, Greiner EC, Bennett GF, et al. Distribution of the hematozoa of Neotropical birds. *Rev Biol Trop*. 1978; 26: 43-102.
279. Bensch S, Waldenström J, Jonzén N, et al. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J Anim Ecol*. 2007; 76 (1): 112-122.
280. Shurulinkov P, Ilieva M. Spatial and temporal differences in the blood parasite fauna of passerine birds during the spring migration in Bulgaria. *Parasitol Res*. 2009; 104 (6): 1453.
281. Balasubramaniam S, Mulder RA, Sunnucks P, et al. Prevalence and diversity of avian haematozoa in three species of Australian passerine. *Emu*. 2013; 113 (4): 353-358.
282. Beadell JS, Gering E, Austin J, et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Mol Ecol*. 2004; 13 (12): 3829-3844.
283. Zamora-Vilchis I, Williams SE, Johnson CN. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: Implications for disease in a warming climate. *PLOS ONE*. 2012; 7 (6): e39208.
284. Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, et al. A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*. 2008; 320 (5884): 1763-1768.

285. Santiago-Alarcon D, Outlaw DC, Ricklefs RE, et al. Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. *Int J Parasitol.* 2010; 40 (4): 463-470.
286. Sehgal RNM, Hull AC, Anderson NL, et al. Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. *J Parasitol.* 2006; 92 (2): 375-379.
287. Valkiunas G, Santiago-Alarcon D, Levin II, et al. A New Haemoproteus Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the Endemic Galapagos Dove *Zenaida galapagoensis*, with Remarks on the Parasite Distribution, Vectors, and Molecular Diagnostics. *J Parasitol.* 2010; 96 (4): 783-792.
288. Yildirim A, Inci A, Duzlu O, ve ark. Türkiye'de bir alaca baykus'ta (*Strix aluco*) *Haemoproteus* türünün saptanması ve moleküler karakterizasyonu. *Ank Univ Vet Fak Derg.* 2013; 60 (3): 179-183.
289. Bensch S, Pérez-Tris J, Waldenström J, et al. Linkage between nuclear and mitochondrial dna sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evol.* 2004; 58 (7): 1617-1621.
290. Valkiunas G, Iezhova TA, Loiseau C, et al. Nested Cytochrome B Polymerase Chain Reaction Diagnostics Detect Sporozoites of Hemosporidian Parasites in Peripheral Blood of Naturally Infected Birds. *J Parasitol.* 2009; 95 (6): 1512-1515.
291. Martinsen ES, Paperna I, Schall JJ. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitology.* 2006; 133: 279-288.
292. Palinauskas V, Kosarev V, Shapoval A, et al. Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Zootaxa.* 2007: 39-50.
293. Valkiunas G, Iezhova TA, Križanauskienė A, et al. A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites. *J Parasitol.* 2008; 94 (6): 1395-1401.

294. Ishtiaq F, Clegg SM, Phillimore AB, et al. Biogeographical patterns of blood parasite lineage diversity in avian hosts from southern Melanesian islands. *J Biogeog.* 2010; 37 (1): 120-132.
295. Ishtiaq F, Guillaumot L, Clegg SM, et al. Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Mol Ecol.* 2008; 17 (20): 4545-4555.
296. Gager AB, Del Rosario Loaiza J, Dearborn DC, et al. Do mosquitoes filter the access of *Plasmodium* cytochrome b lineages to an avian host? *Mol Ecol.* 2008; 17 (10): 2552-2561.
297. Medeiros MCI, Hamer GL, Ricklefs RE. Host compatibility rather than vector-host-encounter rate determines the host range of avian *Plasmodium* parasites. *Proc R Soc London B.* 2013; 280 (1760): 20122947.
298. Ejiri H, Sato Y, Sasaki E, et al. Detection of Avian *Plasmodium* spp. DNA Sequences from Mosquitoes Captured in Minami Daito Island of Japan. *J Vet Med Sci.* 2008; 70 (11): 1205-1210.
299. Hellgren O, Bensch S, Malmqvist B. Bird hosts, blood parasites and their vectors — associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Mol Ecol.* 2008; 17 (6): 1605-1613.
300. Svensson LME, Ricklefs RE. Low diversity and high intra-island variation in prevalence of avian *Haemoproteus* parasites on Barbados, Lesser Antilles. *Parasitology.* 2009; 136 (10): 1121-1131.
301. Yohannes E, Križanauskienė A, Valcu M, et al. Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebird species with different winter habitat distribution. *J Ornithol.* 2009; 150 (1): 287-291.
302. Hellgren O, Kutzer M, Bensch S, et al. Identification and characterization of the merozoite surface protein 1 (*m*sp1) gene in a host-generalist avian malaria parasite, *Plasmodium relictum* (lineages SGS1 and GRW4) with the use of blood transcriptome. *Malaria J.* 2013; 12 (1): 381.

303. Silva NS, Silveira LA, Machado RLD, et al. Temporal and spatial distribution of the variants of merozoite surface protein-1 (MSP-1) in *Plasmodium falciparum* populations in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000; 94 (7): 675-688.
304. Pick C, Ebersberger I, Spielmann T, et al. Phylogenomic analyses of malaria parasites and evolution of their exported proteins. *BMC Evol Biol*. 2011; 11 (1): 167.
305. Tachibana S-I, Sullivan SA, Kawai S, et al. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nat Genet*. 2012; 44 (9): 1051-1055.
306. Mathieu B, Cetre-Sossah C, Garros C, et al. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 137.
307. Rawlings P. A key, based on wing patterns of biting midges (Genus *Culicoides* Latreille Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*. 1996; 52: 57-71.
308. Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am*. 1994; 87 (6): 651-701.
309. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc Biol Sci*. 2000; 267 (1452): 1583-1589.
310. Outlaw DC, Ricklefs RE. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. *Parasitology*. 2014; 141: 1223-1232.
311. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28 (12): 1647-1649.
312. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009; 25 (11): 1451-1452.

313. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980; 16 (2): 111-120.
314. Nei M, Kumar S, Oxford University P. *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford [etc.]: Oxford University Press; 2005.
315. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30 (12): 2725-2729.
316. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008; 25 (7): 1253-1256.
317. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001; 17 (8): 754-755.
318. Ramilo DW, Nunes T, Madeira S, et al. Geographical distribution of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in mainland Portugal: Presence/absence modelling of vector and potential vector species. *PLoS One.* 2017; 12 (7): e0180606.
319. Carpenter S, Groschup MH, Garros C, et al. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. *Antiviral Res.* 2013; 100 (1):102-113.
320. Linley JR. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *J Med Entomol.* 1985; 22 (6): 589-599.
321. Elbers AR, Meiswinkel R, van Weezep E, et al. Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg Inf Dis.* 2013; 19 (1): 106-109.
322. Bernotiene R, Valkiunas G. PCR detection of malaria parasites and related haemosporidians: the sensitive methodology in determining bird-biting insects. *Malar J.* 2016; 15 (1): 283.
323. Anon. İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Kayıtları. 2016.
324. Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, et al. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: current challenges and future directions. *Inf Gen Evol.* 2015; 30: 249-266.

325. Jones RH, Akey DH, Loomis EC, et al. WHO/FAO Working Team Report: entomology. Prog Clin Biol Res. 1985; 178: 661-664.
326. Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol Evol. 2003; 18 (2): 70-74.
327. Nielsen SA, Kristensen M. Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia. Parasit Vectors. 2015; 8: 151.
328. Augot D, Sauvage F, Jouet D, et al. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. Inf Gen Evol. 2010; 10 (5): 629-637.
329. Cetre-Sossah C, Baldet T, Delecolle JC, et al. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. Vet Res. 2004; 35 (3): 325-337.
330. Dik B, Kuçlu Ö, Öztürk R. *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Western Black Sea Region of Turkey, new records for the Turkish fauna. Turk J Vet Anim Sci. 2017; 41 (2): 228-237.
331. Dik B, Yaman M, Uslu U. *Culicoides* species (Latreille, 1809) (Diptera: Ceratopogonidae) in Hatay province. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2010; 16 (Supplement B): S255-S258.
332. Uslu U, Dik B. Seasonal distribution of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Konya Province. Vet Bil Derg. 2004; 20 (4): 5-10.
333. Yıldırım A, Dik B, Düzlü Ö, et al. Sultan Sazlığı Ekosisteminde Kanatlı Haemosporidialarının Moleküler Ekolojisi. 1001 Araştırma Projesi Sonuç Raporu. TÜBİTAK 2017 114 O 646.
334. Dik B. Determination of *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) species in Adana, İçel and Antalya arounds. Türk Vet Hek Derg. 1993; 5: 48-55.
335. Tilki N, Dik B. The effects of different light-sources on the capture of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae). Türkiye Parazitol Derg 2003; 27 (144-147).

336. Dik B, Muz D, Muz MN, ve ark. The geographical distribution and first molecular analysis of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) species in the Southern and Southeastern Turkey during the 2012 outbreak of bovine ephemeral fever. *Parasitol Res.* 2014; 113 (11): 4225-4232.
337. Dik B. Determination of *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) species from Aegean Region. *Türkiye Parazitoloj Derg* 1996; 20: 131-137.
338. Foxi C, Delrio G. Larval habitats and seasonal abundance of *Culicoides* biting midges found in association with sheep in northern Sardinia, Italy. *Med Vet Entomol.* 2010; 24 (2): 199-209.
339. Foxi C, Delrio G, Falchi G, et al. Role of different *Culicoides* vectors (Diptera: Ceratopogonidae) in bluetongue virus transmission and overwintering in Sardinia (Italy). *Parasites & Vectors.* 2016; 9(1): 440.
340. Martinez DELAPJ, Navarro J, Ferraguti M, et al. First molecular identification of the vertebrate hosts of *Culicoides imicola* in Europe and a review of its blood-feeding patterns worldwide: implications for the transmission of bluetongue disease and African horse sickness. *Med Vet Entomol.* 2017.
341. Meiswinkel R, Goffredo M, Leijns P, et al. The *Culicoides* 'snapshot': a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in The Netherlands. *Prev Vet Med.* 2008; 87 (1-2): 98-118.
342. Bobeva A, Ilieva M, Dimitrov D, et al. Degree of associations among vectors of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) and host bird species with respect to haemosporidian parasites in NE Bulgaria. *Parasitol Res.* 2014; 113 (12): 4505-4511.
343. Bobeva A, Zehtindjiev P, Bensch S, et al. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitol.* 2013; 58 (4): 585-591.
344. Ferraguti M, Martinez-de la Puente J, Ruiz S, et al. On the study of the transmission networks of blood parasites from SW Spain: diversity of avian

- haemosporidians in the biting midge *Culicoides circumscriptus* and wild birds. *Parasites & Vectors*. 2013; 6: 208.
345. Dik B, Yavru S, Uslu U, et al. Determination of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) as suspect vectors of Epizootic Haemorrhagic Disease and Blue-tongue viruses in southern and western Anatolia by RT-PCR. *Rev Méd Vét*. 2012; 163 (11): 505-510.
346. Yıldırım A, Dik B, İnci A, et al. *Culicoides pulicaris* kompleks türlerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi. Araştırma Projesi. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2016.
347. Lassen SB, Nielsen SA, Skovgard H, et al. Molecular differentiation of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the subgenus *Culicoides* Latreille in Denmark. *Parasitol Res*. 2012; 110 (5): 1765-1771.
348. Dik B, Dinçer □. Studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) species around Konya, Turkey. *Doğa, Türk Vet Hay Derg*. 1992; 16 (2): 199-215.
349. Eren H, Yağcı □, Dinçer □. *Culicoides* species in Ankara. *Anakara Üniv Vet Fak Der*. 1995; 42 (2):179-182.
350. Njabo KY, Cornel AJ, Bonneaud C, et al. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Mol Ecol*. 2011; 20 (5): 1049-1061.
351. James AA, Rossignol PA. Mosquito salivary glands: Parasitological and molecular aspects. *Parasitol Today (Personal ed)*. 1991; 7 (10): 267-271.
352. İnci A, Yıldırım A, Njabo KY, et al. Detection and molecular characterization of avian *Plasmodium* from mosquitoes in central Turkey. *Vet Parasitol*. 2012; 188 (1/2): 179-184.
353. Santiago-Alarcon D, Havelka P, Pineda E, et al. Urban forests as hubs for novel zoonosis: blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians. *Parasitology*. 2013; 140 (14): 1799-1810.

354. Mata VA, da Silva LP, Lopes RJ, et al. The Strait of Gibraltar poses an effective barrier to host-specialised but not to host-generalised lineages of avian Haemosporidia. *Int J Parasitol.* 2015; 45 (11): 711-719.
355. Martinez-de la Puente J, Munoz J, Capelli G, et al. Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy. *Malaria J.* 2015; 14: 32.
356. Synek P, Munclinger P, Albrecht T, et al. Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitol Res.* 2013; 112 (2): 839-845.
357. Ferraguti M, Martinez-de la Puente J, Munoz J, et al. Avian *Plasmodium* in *Culex* and *Ochlerotatus* mosquitoes from Southern Spain: Effects of season and host-feeding source on parasite dynamics. *PloS One.* 2013; 8 (6): e66237.
358. Kim KS, Tsuda Y. Avian *Plasmodium* lineages found in spot surveys of mosquitoes from 2007 to 2010 at Sakata wetland, Japan: do dominant lineages persist for multiple years? *Mol Ecol.* 2012; 21 (21): 5374-5385.

İZMİR YÖRESİNDE CULICOIDES TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE HAEMOSPORIDIA ENFEKSİYONLARI YÖNÜNDEN VEKTÖRLÜK POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 3	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tarim.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	www.turkiyeparazitolderg.org İnternet Kaynağı	% 1
3	ercivet.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	shareok.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	ŞAKALAR, Çağrı, UYAR, Yunus, GÜRBÜZ, Esra, KUK, Salih, YAZAR, Süleyman, YÜRÜRDURMAZ, Mehmet Ali, TOKAR, Sadık	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hakan YEŞİLÖZ

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Ekim 1973, Nevşehir

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 532 350 49 77

email: hakanyesiloz@gmail.com

Yazışma Adresi: İzmir/Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Erzene mah.
Ankara cad. No:172/155 35010 - Bornova – İzmir

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Nevşehir Lisesi	1989
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2000
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi	
	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji	2012
Doktora	Erciyes Üniversitesi	
	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji	

YABANCI DİL

İngilizce