

**TÜRKİYE'DE DAĞILIM GÖSTEREN *Hyalomma marginatum*
KOCH, 1844'ÜN POPULASYON YAPISINA YÖNELİK
ARAŞTIRMALAR**

**AN INVESTIGATION OF THE POPULATION STRUCTURE
OF *Hyalomma marginatum* KOCH, 1844 DISTRIBUTED IN
TURKEY**

OLCAY HEKİMOĞLU

PROF. DR. AYŞE NURDAN ÖZER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

OLCAY HEKİMOĞLU'nun hazırladığı "Türkiye'de Dağılım Gösteren *Hyalommarginatum* Koch, 1844'ün Populasyon Yapısına Yönelik Araştırmalar" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan KANDEMİR
Başkan



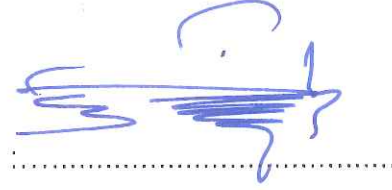
Prof. Dr. Ayşe Nurdan ÖZER
Danışman



Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR
Üye



Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK
Üye



Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Sergili aileme ve canım Duru'ma...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

02.09.2016



OLCAY HEKİMOĞLU

ÖZET

TÜRKİYE'DE DAĞILIM GÖSTEREN *Hyalomma marginatum* KOCH, 1844'ÜN POPULASYON YAPISINA YÖNELİK ARAŞTIRMALAR

Olca HEKİMOĞLU

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Nurdan ÖZER

Eylül 2016, X+93 Sayfa

Keneler eklembacaklılar içerisinde en fazla hastalık etkeni taşıyan vektör organizmalardır. *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, Güney Avrupa, Anadolu, Arabistan, Orta, Batı ve Güneydoğu Asya ve Afrika'da yayılım gösteren bir kene türü olup, Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalığının bilinen vektörüdür. Bu hastalık ülkemizde de halk sağlığını ciddi derecede tehdit etmesine rağmen, vektörü *H. marginatum*'un populasyon genetiğine yönelik bir çalışma şimdiye kadar yapılmamıştır. Türkiye'deki *H. marginatum*'un populasyonları arasında genetik farklılıkların olup olmadığının araştırıldığı bu çalışmada, Türkiye ve Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde toplam 70 lokalitede örnekleme yapılmıştır. Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve KKTC lokalitelerinde *H. marginatum* bulunamamıştır. Populasyon farklılıklarını karşılaştırmak üzere, *H. marginatum* türü için ilk defa 7 mikrosatellit primer dizayn edilmiş ve bu primerler 2015 yılında örneklenen 10 populasyona ait bireylerde test edilmiştir. FSTAT programı kullanılarak yapılan analizler, lokus başına alel sayısının 2 ile 16 arasında değişmekte olduğunu göstermektedir. Yedi lokusun altısında H_0 değerleri (ortalama 0.76), H_e değerlerinden daha yüksektir. Kendileşme katsayısının (F_{IS}), -0.143 ile -0.65 arasındaki değerleri populasyonda heterozigot fazlalığına işaret etmektedir. Bu da populasyonlardaki çeşitliliğin artışıyla kuşlarla Afrika'dan taşınan *H. marginatum* bireylerinin etkili bir faktör olduğunu

düşündürmektedir. Populasyonları karşılaştırmakta kullanılan F_{ST} (Fiksasyon indeksi) değeri, Çorum populasyonunun en farklı populasyon olduğunu göstermektedir. STRUCTURE programı kullanılarak yapılan populasyon yapı analizleri de, Türkiye’de *H. marginatum*’un iki farklı grubu olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler, Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalığının ülkemizdeki dağılımı ile *H. marginatum* populasyonlarının genetik yapısı arasında bir ilişkiye işaret etmemektedir.

Anahtar Kelimeler: Kene, *Hyalomma marginatum*, populasyon genetiği, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, mikrosatellit



ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF THE POPULATION STRUCTURE OF *Hyalomma marginatum* KOCH, 1844 DISTRIBUTED IN TURKEY

OLCAY HEKİMOĞLU

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Nurdan ÖZER

September 2016, X+93 Pages

Ticks are known to be the most disease causing vector organisms amongst Arthropoda. *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, is distributed throughout South Europe, Anatolia, Arabia, Middle-Western- Southeastern Asia and Africa and it is the known cause of Crimean-Congo haemorrhagic fever. Although this disease is a serious public health concern in Turkey, there is still limited information about population structure of *H. marginatum* and the distribution of this species in our country. In this thesis study, the genetic differences between *H. marginatum* populations were evaluated. Field studies were conducted both in Turkey and Turkish Republic of Northern Cyprus at 70 different localities. *H. marginatum* wasn't recorded at Mediterranean region, Southeastern Anatolia and Turkish Republic of Northern Cyprus localities.

In this study, 7 microsatellite primers were designed for the first time to evaluate the genetic differences of *H. marginatum* populations. The primers were tested on the samples of 10 different tick populations which were collected in 2015. FSTAT results showed that allele per loci differs between 2 and 16. In the 6 loci, out of seven, observed heterozygosity

(H_o) value (mean= 0.76) is found to be higher than expected heterozygosity (H_e) value. Inbreeding coefficient (F_{IS}) differs between -0.143 and -0.65, which indicates heterozygote excess in the population. *Hyalomma marginatum* specimens, which were transported via migratory birds from Africa and might contribute to the observed diversity of *H. marginatum* populations in Turkey. Fixation index (F_{ST}) values showed that Çorum population is the most distinct population from the other populations in Turkey. STRUCTURE analyses showed that *H. marginatum* has two different genetic groups in Turkey. The data evaluated from this thesis demonstrated that the distribution of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey and genetic structures of *H. marginatum* populations are not correlated.

Key Words: Ticks, *Hyalomma marginatum*, population genetics, Crimean-Congo haemorrhagic fever, microsatellite

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında emeğini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, insanlığı ve manevi varlığıyla bana her zaman güç veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Nurdan ÖZER'e;

Doktora çalışmalarımın başından sonuna kadar özveriyle takibini yapan, tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr.ERCÜMENT ÇOLAK ve Prof. Dr. SELİM SUALP ÇAĞLAR'a,

Doktora çalışmasının moleküler aşamasının gerçekleştirilmesi için laboratuvarının tüm imkanlarını sağlamasının yanında, Amerika Ulusal Kene Müzesi'nin kapılarını bulduğum süre boyunca bana sonuna kadar açan, bilgi ve deneyimleri ile çalışmanın sonuçlanmasında büyük katkıları olan Georgia Southern Üniversitesi'nden Prof. Dr. LORENZA BEATI'ye;

Kenelerle ilgili bilgi birikiminin zenginleşmesini sağlayan, morfolojik teşhis çalışmalarımda büyük katkısı olan, paylaşımcı ve mütevazı kişiliği ile her zaman örnek aldığım Zaragoza Üniversitesi'nden Prof. Dr. AGUSTIN ESTRADA-PENA'ya,

Arazi çalışmalarındaki yardımı ve manevi desteğiyle Teknisyen SALİM ÇALIŞ'a;

Tez boyunca bilgi birikimleri ile bana yol gösteren Dr. İSMAIL KUDRET SAĞLAM ve Dr. KAHRAMAN İPEKDAL'a,

Arazi çalışmalarımın çeşitli dönemlerinde bana yardımcı olan Dr. ARDA CEM KUYUCU, Arş. Gör. MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN, Prof. Dr. FATİH MEHMET ŞİMŞEK, Doç. Dr. ÇAĞATAY TAVŞANOĞLU, GÖKHAN ERGAN, Dr. BURAK ALI ÇİÇEK, çalıştığı lokalitelerden kene örnekleri temin eden Doç. Dr. MAHMET KABALAK ve Prof. Dr. OĞUZ TÜRKÖZAN'a,

Kuş göç yolları hakkında verdiği değerli bilgiler için Doç. Dr. UTKU PERKTAŞ'a,

Yolun her adımında yanımda ve bana destek olan, uzakları yakın eden arkadaşlarım MELTEM TOP ve MARIANO MASTRAPAULO'ya,

Sonsuz maddi ve manevi destekleri ve fedakarlıkları için sevgili aileme,

Doktora eğitimim boyunca verdiği burslarla lisansüstü eğitimimde büyük katkısı olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FDK-2016-11293, FUA-2015-5895 ve FHD-2015-5343 nolu projeler ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Keneler.....	4
2.1.1 Kenelerin Sınıflandırılması.....	4
2.1.2 Kenelerin Yaşam Döngüsü	4
2.1.3 Kenelerde Vektörlük.....	5
2.1.4 Kenelerin Ekolojisi	6
2.2 <i>Hyalomma marginatum</i> Koch, 1844.....	8
2.2.1 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Sistematiği	8
2.2.2 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Morfolojisi.....	8
2.2.3 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Coğrafi Dağılımı.....	10
2.2.4 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Konakları ve Yaşam Döngüsü.....	11
2.2.5 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Ekolojisi.....	11
2.2.6 <i>Hyalomma marginatum</i> 'un Vektörlüğünü Yaptığı Hastalıklar	12
2.2.7 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi	12
2.3 Populasyon Genetiği Çalışmaları.....	15
2.4 Mikrosatellit Genetik Belirteçler	17

2.5	Kenelerde Populasyon Genetiğine Yönelik Araştırmalar.....	23
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1	Arazi Çalışmaları.....	27
3.2	Tür Teşhisi Çalışmaları.....	30
3.3	DNA İzolasyonu.....	33
3.4	Mitokondrial 12S rDNA Analizi.....	33
3.5	Mikrosatellit Belirteçlerin Tanımlanması ve Primer Sekansların Dizayn Edilmesi	34
3.6	PCR Aşaması.....	37
3.7	Genotiplendirme ve Mikrosatellit Belirteçlerin Karakterizasyonu.....	37
3.8	Populasyonlar Arası Genetik Farklılıkların Araştırılması.....	37
3.9	Populasyon Yapısı Analizleri (STRUCTURE).....	38
4	BULGULAR.....	41
4.1	Arazi ve Tür Teşhisi Çalışmaları.....	41
4.2	Mitokondrial 12SrDNA Sonuçları.....	41
4.3	Mikrosatellit Belirteçlerin Dizayn Edilmesi ve Karakterizasyonu.....	42
4.4	Populasyonlar Arası Genetik Farklılık Analizleri.....	48
4.5	Populasyon Yapısı Analizleri.....	48
5	TARTIŞMA.....	52
5.1	<i>Hyalomma marginatum</i> 'un Türkiye'deki Dağılımının Değerlendirilmesi.....	52
5.2	<i>Hyalomma marginatum</i> Türkiye Populasyonunda Genetik Çeşitliliğin Değerlendirilmesi.....	53
5.3	<i>Hyalomma marginatum</i> Türkiye Populasyon Yapısı.....	56
5.4	Epidemiyolojik Değerlendirmeler.....	60
5.5	Sonuç ve Öneriler.....	62
	KAYNAKLAR.....	64
	ÖZGEÇMİŞ.....	92

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Hyalomma marginatum</i> dişi ve erkek bireylerinin dorsal ve ventral görüntüsü .	10
Şekil 2.2: <i>Hyalomma marginatum</i> 'un iki konaklı yaşam döngüsü	11
Şekil 2.3:Dünyada Kırım Kongo Kanamalı Ateşi salgını görülen alanların yıllık vaka bildirimlerine göre dağılımları.....	13
Şekil 2.4:Türkiye'de 2002-2015 yılları arasında Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının vaka ve ölüm sayıları.....	14
Şekil 3.1:İllere göre Kırım Kongo Kanamalı Ateşi 2014 yılı insidans verileri.....	27
Şekil 3.2: Tez dönemi boyunca kene örnekleme yapılan tüm lokaliteler	28
Şekil 3.3: Kene örneklemesinde kullanılan bayraklama yöntemi	29
Şekil 3.4: CO ₂ gömülü tuzak yöntemi ile örneklenen <i>Hyalomma marginatum</i>	29
Şekil 3.5: Konak üzerinden yapılan <i>Hyalomma</i> örnekleme.....	30
Şekil 4.1: STRUCTURE analizine K ve Delta K değerleri arasındaki ilişki	51
Şekil 4.2: STRUCTURE analizine göre tüm popülasyonlarının bireylerinin K=2'ye göre farklı kümelerine ait olma olasılıkları	51

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1: Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan mikrosatellit çeşitleri	17
Çizelge 3.1: Moleküler çalışmalarda kullanılan kene örneklerinin birey ve eşey sayısı, örnekleme yöntemi, örnekleme lokaitelerinin koordinat ve yükseklik bilgileri.....	31
Çizelge 3.2: Mitokondrial 12S rDNA primerleri, ileri ve geri sekansları	33
Çizelge 3.3: Mikrosatellit pozitif lokus tespiti için analize gönderilen <i>Hyalomma marginatum</i> örneklerinin eşey, lokasyon, toplama tarihi ve örnekleme yöntemi bilgileri..	34
Çizelge 3.4: <i>Hyalomma marginatum</i> örneklerinde test edilen tüm primerlerin uzunluğu, ileri ve geri primerleri ve mikrosatellit motifleri.....	35
Çizelge 3.5: Mikrosatellit ve 12S rDNA PCR karışımı ve reaksiyon koşulları	39
Çizelge 3.6: Genotipleme aşamasında kullanılan <i>Hyalomma marginatum</i> populasyonlarının birey sayısı, koordinat, yükseklik, örnekleme yöntemi ve 2014 yılı Kırım Kongo Kanamalı Ateşi insidans verileri	40
Çizelge 4.1: Mitokondriyal 12S rDNA analizi sonucu elde edilen <i>Hyalomma</i> cinsine ait sekansların Genbank <i>Hyalomma</i> verileri ile birlikte oluşturulan NJ ağacı	42
Çizelge 4.2: Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri	43
Çizelge 4.3: Mikrosatellit analizlerinde kullanılan yedi polimorfik lokusun karakteristik özellikleri.....	49
Çizelge 4.4: <i>Hyalomma marginatum</i> populasyonlarının F_{ST} değerlerine göre karşılaştırılması.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	derece santigrad
%	yüzde
µl	mikrolitre

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
F _{IS}	Kendileşme Katsayısı
F _{ST}	Fiksasyon İndeksi
H _o	Gözlenen Heterozigotluk
H _e	Beklenen Heterozigotluk
KKKA	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
KKKAV	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
Mt 12S rDNA	Mitokondriyal 12S ribozomal DNA
NJ	Neighbor-joining
YND	Yeni Nesil Dizileme

1. GİRİŞ

Vektör organizmaların dolayısıyla taşıdıkları hastalıkların dağılımları, insan hareketleri, habitat kullanım alışkanlıklarının değişimi, iklimsel değişiklikler gibi nedenlerle farklılık göstermektedir. Bir hastalığın epidemiyolojisini anlamak için öncelikle hastalığı bulaştırmada etkili olan anahtar faktörleri, yani biyolojik çeşitliliğin bir parçası olan vektörleri ve bu vektörlerin populasyon dinamiklerini iyi analiz etmek gerekir. Eklembacaklı vektörlerle ilgili ilk görüşler, sadece bir taşıyıcı oldukları ve patojen üzerinde herhangi bir etkileri olmadığı yönündeydi. Ancak daha sonra yapılan araştırmalar, tam aksine, patojenlerin vektör biyolojisini değiştirebildiğini ve vektör yeterliliği (patojeni bulundurma ve onları uygun konaklara aktarabilme yeteneği) üzerinde etkili olduğunu göstermiştir [1]. Eklembacaklılar içerisinde en fazla hastalık etkeni taşıyan vektörler ise kene türleridir.

Vektörlerin populasyon genetiği çalışmaları; geçmişteki ve güncel gen akışı, türlerin dağılımı, konak adaptasyonu gibi patojen spesifikliğine ve kimyasal akaraisidlere direnci belirleyen evrimsel faktörlerin iç yüzünün anlaşılmasını sağlar. Ayrıca, vektör ve patojen populasyonlarında görülebilen lokal adaptasyonlar da, epidemiyoloji üzerine etkili olan bir faktördür. Zorunlu parazit ve vektör olarak keneler, konakları üzerinde ve taşıdıkları patojenler üzerinde doğrudan etkiye sahiptir [2]-[7].

Populasyon genetiği çalışmaları, sadece ekolojik metotlar kullanılarak açıklanamayan pek çok soruya cevap bulmada yardımcı olmuştur. Kenelerde genetik çeşitliliğin düzeyi hem zamansal [8]-[10], hem de mekansal boyutta [11]-[14] araştırılmıştır. Genetik çeşitliliğin eşey biaslı dağılımı [10],[15] ve bir kene türü içerisindeki konak spesifik soyların formasyonu da gösterilmiştir [16]-[18]. Genetik olarak farklı olan populasyonların, farklı vektöriyel kapasiteye sahip olmaları her zaman tartışma konusu olmuştur. Çeşitli çalışmalarla bir kene populasyonu içerisindeki coğrafi varyasyonun; patojeni edinme, sürdürme ve transfer etme yeteneği üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [19]-[23].

Populasyonlarda gerçekleşen gen akışı, genetik akrabalık ve genetik sürüklenme oranı gibi süreçlerin araştırılmasında mikrosatellitler oldukça başarılı sonuçlar vermektedir [24]. Mikrosatellitler eş-baskın kalıtım özelliği göstermeleri [25], lokusa özgü olmaları [26], genom içinde düzenli ve geniş yayılım göstermeleri [27], yüksek mutasyon oranı [28] ve genom hakkında diğer moleküler belirteçlere göre daha fazla bilgi vermeleri [25], yanında, polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bir teknik olmasından dolayı çok tercih edilen ve birçok türde kullanılan bir DNA belirteçidir. Mikrosatellitlerin belirli bir tür içerisinde polimorfik olmaları ve temelde benzer olmalarına rağmen, bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri, moleküler genetik alanında belirteç olarak kullanılmalarını uygun hale getirmektedir. Ayrıca küçük populasyonlarda ve nesli tükenen türlerde bile, yüksek derecede polimorfik olmaları, mikrosatellitlerin başlıca üstünlüklerinden biridir. Güvenilir olmaları ve kısa zamanda sonuç alınabilmesi de bu belirteçlerin moleküler genetik çalışmalarda tercih edilme nedenleri arasında gösterilebilir. Mikrosatellitler kenelerin populasyon genetiği çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır [29]-[35].

Arthropoda şubesinin Metastigmata (=Ixodida) takımında yer alan *Hyalomma* Koch, 1844 cinsi 20 tür içermektedir [36]. Bu cinsin önemli gruplarından *Hyalomma marginatum* kompleks, Güney Avrupa, Arabistan, Anadolu, Orta, Güney ve Güneydoğu Asya ve Afrika'da yayılım göstermektedir. Morfoloji, biyoloji ve davranış özellikleri göz önüne alınarak, bu taksonun 5 türden oluştuğu bildirilmiştir [36, 37]. Bu kompleksin üyelerinden *H. marginatum*, pek çok hastalık etkeninin, özellikle de Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsünün (KKKAV) taşınmasında rol oynamaktadır

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü Bunyaviridae ailesi *Nairovirus* cinsine aittir ve mortalite oranı %3-30 arasında seyreder [38]. Bu hastalık en yaygın coğrafi yayılıma sahip kene kökenli hastalıktır ve palearktikte Rusya'dan Yunanistan'a, Afrika'dan Sahara'nın güneyine kadar uzanır [39]. Türkiye'de *Hyalomma* cinsine ait kenelerin vektöriyel önemi 2002 yılı itibariyle KKKA vakalarının görülmeye başlamasıyla anlaşılmıştır [40]-[43]. Bu hastalık ülkemizin iç ve kuzeydoğu bölgelerinde halk sağlığını tehdit eden ve can kayıplarına neden olan en önemli hastalıklardan birisidir. T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2002-2015 yılları arasında 9787 hastaya KKKA teşhisi konmuş, bu vakaların 469'u ölüm ile sonuçlanmıştır. Vakalar özellikle Tokat, Sivas, Çorum, Yozgat ve Erzurum

illerinde görülmektedir [43]- [45]. Hastalık Türkiye’de son yıllarda bu denli etkili olmasına rağmen, *H. marginatum* populasyonlarının yapısı, ülkemizdeki dağılımı ve bu dağılımı etkileyen faktörlerin analizine yönelik çalışmalar oldukça az sayıdadır. *Hyalomma marginatum* populasyonları arası ilişkileri ve etkileşimleri ortaya koyan moleküler bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasının amaçları aşağıda belirtilmiştir:

- 1) *Hyalomma marginatum*’un tüm dağılım alanlarından örnekleme yaparak, türün Türkiye’deki dağılımına yönelik bir veri seti oluşturmak,
- 2) *Hyalomma marginatum*’un genetik yapısını araştırmak için mikrosatellit belirteç geliştirmek (primer dizayn etmek),
- 3) Bu mikrosatellit belirteçleri kullanarak *H. marginatum* populasyonlarını karşılaştırmak

Çalışmada aşağıdaki soruların cevapları araştırılmıştır :

- 1) *Hyalomma marginatum*’un Türkiye’deki dağılım alanlarında, populasyonları arasında genetik çeşitlilik var mıdır?
- 2) Kırım Kongo Kanamalı ateşi vakalarının yüksek olduğu alanlardaki *H. marginatum* populasyonları ile düşük olduğu alanlardaki *H. marginatum* populasyonlarının genetik yapıları birbirinden farklı mıdır?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Keneler

2.1.1. Kenelerin Sınıflandırılması

Hayvanlar aleminin Artropoda şubesi Arachnida sınıfı, Acarina takımında yer alan keneler, biyolojik, morfolojik ve davranış farklılıkları göz önüne alınarak üç aile içinde incelenmektedir: Ixodidae (713 tür), Argasidae (185 tür), Nuttalliellidae (1 tür) [46]. Bu eklembacaklılar tropik iklim bölgesinden subarktik bölgeye kadar yayılım göstermekle birlikte, tür çeşitliliği tropikal ve subtropikal bölgelerde daha fazladır [2]. Memeli, kuş, sürüngen ve amfibilerden kan emebilir [47]. Argasidae keneleri *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* ve *Otobius* olarak 4 cinsi kapsar. Ixodidae kenelerin en önemli cinsleri *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* ve *Boophilus*'tur [48]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *Boophilus* ve *Rhipicephalus*'un filogenetik olarak yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuş ve *Boophilus*'un 5 türü *Rhipicephalus*'un alt cinsi olarak ifade edilmiştir [48-50].

2.1.2. Kenelerin Yaşam Döngüsü

Kenelerin yaşamında 3 temel evre vardır. Evrelerin yaşam süreleri, konak tercihleri, konak sayıları, kan emme süreleri türe özgü farklılıklar göstermektedir. Yumurtadan çıkan üç bacaklı larvalar kan emip gömlek değiştirdikten sonra dört bacaklı nimflere, nimfler de tekrar kan emip gömlek değiştirdikten sonra dört bacaklı ergin dişi ve erkek bireylere dönüşür. Dişiler kan emip çiftleştikten sonra toprağa düşer ve yumurta bırakır. Yumurta sayısı türe ve emilen kan miktarına göre 200-15.000 arasında değişir. Ixodidlerde yumurtlamadan sonra dişiler ölür. Argasidlerde ise, yumurtladıktan sonra dişiler ölmez ve her kan emmeden sonra dişiler 5-10 gün içinde türlere göre değişen sayıda, ortalama 12-70 yumurta bırakır. Yumurta içinde larvanın gelişme süresi ve daha sonraki yaşam evrelerinin gelişme süreleri, türe göre ve nem, sıcaklık gibi dış faktörlere göre şekillenir. Yumurtadan çıkan üç çift bacaklı larvaların 7-22 gün içerisinde aktif hale gelip konak aramaya başladıkları görülür. Argasidae türlerinde larva, nimf ve erginlerinde konaklarından kan emme, her gelişme dönemi için birkaç defa olduğu halde, Ixodidae türlerinde her gelişme dönemi için bir defadır [2], [51, 52].

Yaşam döngüsünün toplam süresi ve zamanlaması türler arasında değişkenlik gösterir. Bazı türler 3 yaşam evresini de bir yıl içerisinde tamamlarlar. Özellikle soğuk iklimlerde yaşayan türler ise tüm yaşam evrelerini 3 ya da 4 yılda tamamlarlar. Sıcaklık, konak ile birlikte yaşam evresinin gelişimini düzenleyen en önemli faktördür. Larva ve nimfler genellikle 3-6 gün kan emerken, erginler 2 hafta süreyle kan emebilirler [53].

Kan emdikleri konak sayısına göre keneler 3 gruba ayrılır. Tek konaklı keneler tüm gelişim evrelerini tek bir konakta tamamlar. *Boophilus* cinsinin türleri bu gruptadır. *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* türlerinin büyük bir kısmı iki konaklı gelişim gösterir. Larva ve nimfler kuşlar ya da kemirgenleri konak olarak kullanırken, erginler beslenmek için büyük memelileri tercih eder. *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma* türleri 3 konaklı gelişme özelliği gösterir. Bu türler larva, nimf ve ergin dönemlerinin her birinde ayrı bir konak kullanır. Sert keneler konaklarını bulduktan sonra 10 güne kadar kan emebilirler. Bu periyot larvalar için 2-3 günken bazı ergin türlerde bir hafta sürer [47].

Kenelerde eşeyli üreme görülür, ancak bazı Ixodidae türlerinde aynı zamanda partenogenezle çoğalma da görülür. Çiftleşme, Ixodidae türlerinde kan emme esnasında gerçekleşir, Argasidae türlerinde ise kan emdikten sonra gerçekleşir.

2.1.3. Kenelerde Vektörlük

Bir patojenin vektörü olabilmesi için kene türü; 1) İnfekte omurgalılarından kan emmek zorundadır 2) Kan emme süresince patojeni alır 3) Bir ya da daha çok deri değiştirme periyodu boyunca patojeni muhafaza eder 4) İnfekte olmamış konaklara patojeni transfer eder [54]. Bir kenenin “vektör” olması için sadece nükleik asitin varlığının tespit edilmesi ya da konağa “rezervuar” denilebilmesi için sadece serolojik çalışma sonuçları yeterli değildir. Kenede ya da bir konakta nükleik asitin tespiti onun sadece taşıyıcı olduğunu gösterir. Konak serumunda antikorların bulunması da hayvanın patojene maruz kaldığını gösterir. Patojen transmisyonunun keneden konağa ya da konaktan keneye geçişinin gerçekleşip gerçekleşmediği ancak laboratuvar çalışmalarıyla ortaya konabilir. Bu ifadeler sayısal olarak da hesaplanabilir. Vektör kapasitesi, kenenin patojen taşıma potansiyelinin sayısal olarak ifade edilmesidir. Vektör yeterliliği ise sadece kenenin bir patojenin vektörü olma yetisini tanımlar. Bu da kene vektörler ve rezervuar konaklar arasındaki zamansal ve mekansal ölçekte karşılaşma olsa bile, bu ilişkinin sonuçlarının büyük bir çeşitlilik gösterebileceğine işaret eder.

Keneler tarafından taşınan etkenler arasında bakteriyel (Tularemi, Lyme), riketsiyal (Benekli humma, Q humması, Ehrlichiosis), parazitik (Babesiosis) ve viral (Kene Kökenli Ensefalit, kanamalı ateşler) infeksiyon etkenleri vardır [55]-[58].

Kene yaşam döngüsündeki iki olay, patojenlerin transferinde epidemiyolojik öneme sahiptir. Keneler, her yaşam evresinde sadece bir kez beslendiklerinden, bir konaktan aldıkları patojeni, diğer bir gelişme döneminde kan emdiği başka bir konağa aktarabilme yetisine sahip olmalıdır [59]. Bu durum transstadiyal (yatay) nakil olarak adlandırılır. Diğer bir transfer şekli ise transovariyal (vertikal) nakildir. İnfekte dişiler hastalık etkenini yumurtalarına aktararak, hastalıkların kene popülasyonu içinde yayılmasını sağlamaktadır[56]. Ayrıca aynı kene türünün birden fazla hastalık etkenini (viral, parazitik, bakteriyel) de birlikte taşıyabildiği gösterilmiştir [59]. Aynı konaktan ken emme esnasında, aynı ya da farklı kene türleri sahip oldukları hastalık etkenini birbirlerine transfer edebilirler [2].

Keneler tarafından taşınan hastalıkların en yaygın vektörleri *Ixodes*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* ve *Rhipicephalus* cinslerinin türleridir [59], [56], [60]. *Amblyomma* cinsi hariç, diğer cinslerin türlerinin Türkiye'deki varlığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [41], [61]-[68].

2.1.4. Kenelerin Ekolojisi

Fiziksel çevre ve konaklar, kenelerin adapte oldukları iki önemli habitatı tanımlar. Deri değiştirdiklerinde ve çevrede konak aramaya başladıklarında, kuruma, açlık ve donma, önemli mortalite faktörleridir. Aynı zamanda küçük memeli predatörlere ya da fungi gibi patojenlere de maruz kalabilirler. Bu elverişsiz faktörler bir kene türünün yaşayabileceği habitat tipini sınırlar. Kenelerin büyük bir çoğunluğu konağının immun yanıtını baskılayacak adaptasyonlara sahiptir. Konakların tercih ettikleri habitatlar, yayılımlarını, dolayısıyla onlara bağımlı olan kenelerin yayılımını etkileyecektir [69].

Ekolojik olarak keneler, yuvaya bağımlı (nidicolous) ya da yuvadan bağımsız (non-nidicolous) davranış gösterecek şekilde evrimleşmişlerdir. Mesken keneleri olarak da adlandırılan yuvaya bağımlı keneler, fare delikleri, kuş yuvaları, kümes veya ahır duvarlarındaki çatlaklara yerleşirler. Çevresel değişikliklere karşı oldukça hassas olup buldukları konak yuvalarının mikrohabitatına sıkı sıkıya bağlıdırlar. Mera keneleri olarak da adlandırılan ve konak yuvalarından bağımsız hareket eden diğer grup keneler ise

orman, çalılık, ayır, step ve çöl gibi çok geniş ve değişik ekolojik alanlarda yaşar ve konaklarını buralarda bulurlar. Ixodidae ailesindeki kenelerin büyük bir çoğunluğu bu gruptadır [53].

Hem mikroklimatik özellikler hem de konağın uygunluğu ve bolluğu, kenelerin bolluğu ve mevsimsel aktivitesini şekillendiren faktörlerdir [70], [71]. Zemin ve kenelerin konak aktivitesini gerçekleştirdiği yükseklik arasındaki sıcaklık ve su içeriği son derece önemlidir. Ilıman bölgelerdeki yaz aylarında, yüksek sıcaklıkların uzun sürmesi, gömlek değiştirme ve konak arama döneminde ölüm oranının artmasına neden olur. Kış aylarında görülen ortalama değerlerin altındaki düşük sıcaklıklar da mortalitenin artmasına neden olur. Ancak, zeminde uzun süre kar örtüsünün olması kenelerin kışı geçirme süresince, düşük sıcaklıkların negatif etkisinden korunduğunu ortaya koymuştur [53].

Konağı bulma ve kan emme sürecinde, keneler vejetasyonda bulunmak zorundadır. Bu aktivite, kenenin vejetasyonda konağı beklediği bir seyretme noktası bulması ile başlar [72]. Ortamda çok sayıda konak ve kene varsa birbirlerini bulmaları daha az zaman alacaktır. Böylece kenenin mortalite oranı da düşer [73]. Bu konuda yapılan pek çok deneysel çalışma kenenin konak arama aktivitesinin iklime göre şekillendiğini göstermiştir [74]-[82]. Fotoperiyot da konak bulma döneminde etkili bir ekolojik faktördür. Fotoperiyot aynı zamanda kan emme ve deri değiştirme döneminde girme gibi pek çok aktiviteyi düzenler [83]. Bir kenenin belirli bir alanda, konak arama aktivitesini düzenlemede ve canlılığını srdrebilmede, enerji deposu ve suyu koruyabilme yeteneği önemli rol oynar.

Kene ile konak arasındaki 400 milyon yıllık birlikteliğin sonucunda, konağa adaptasyon gerçekleşebilmiştir. Bazı kene türleri konak seçici olsa da, büyük çoğunluğu konak tercihinde seçici değildir. [84]. Konak seçiciliği, ergin dönemde larva ve nimf döneminde göre daha fazladır. Mesken keneleri konaklarının yuvaları çevresinde bulunur. Ancak mera keneleri, yaşamlarını devam ettirebilmek için konaklarını aramak zorundadır. Bunu *Ixodes*, *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* türlerinde olduğu gibi pasif olarak (pusucu) yapabildikleri gibi, *Hyalomma*'daki gibi aktif olarak da arayabilirler (avcı). Pusucu stratejiye sahip keneler buldukları yeri terk etmeden, uygun konakların gelmesini çoğunlukla vejetasyon üzerinde bekler. Larva ve nimfler, kemirgenler gibi daha küçük hayvanları, erişkinler ise daha büyük konakları tercih ederler. Avcı keneler ise konakları gelene kadar genelde toprak altında saklanır, konağı bulduğunda ise takip edebilme yetisine sahiptir [2].

Habitat fragmentasyonu, kenelerin ve konaklarının bolluğu ve patojenlerin transmisyon oranını düzenleme etkisine sahiptir [85]. Bu parçalanma fiziksel çevrede değişime yol açan yavaş doğal süreçlerden ya da insan eliyle gerçekleşen hızlı arazi dönüşümü süreçlerinden kaynaklanabilir [86].

2.2 *Hyalomma marginatum* Koch, 1844

2.2.1. *Hyalomma marginatum*'un Sistematığı

Hyalomma Koch, 1844 cinsi türlerinin sistematığı oldukça karmaşıktır. Cinsin sistematığı ile ilgili sıkıntıların büyük bir çoğunluğu *Euhyalomma* Filippova, 1844 alt cinsine ait türlerin teşhislerinin yapılmasındaki zorluklardan kaynaklanmaktadır. Bu alt cins yaklaşık olarak 20 tür içerir. Bu türler birbirleriyle olan yakın ilişkilerine göre gruplandırılabilir. Taksomik olarak bakıldığında bu gruplar içerisinde en problemli olan *Hyalomma* (*Euhyalomma*) *marginatum* kompleks, Koch' tur. *Hyalomma marginatum* kompleksin geniş çapta kabul gören 5 alt türü, *H.(E.) marginatum* Koch, 1844; *H.(E.) rufipes* Koch, 1844; *H.(E.) isaaci* Sharif, 1928, *H.(E.) turanicum* Pomerantzev, 1946 ve *H.(E.) glabrum* Delpy, 1949 olarak tam tür statüsüne yükseltilmiştir[36]. Bu kompleks içerisinde oldukça yüksek oranda polimorfizm gösteren tek tür *H. marginatum*' dur. Türün yayılımı hemen hemen tüm cinsin yayılımını kapsamaktadır. Güney Avrupa, Anadolu, Arabistan, orta, batı ve güneydoğu Asya ve Afrika'da dağılım göstermektedir [36].

Hyalomma marginatum'un orijinal tanımlaması İtalya'dan örneklenen bir erkek birey üzerinden yapılmıştır [87]. Tip türden 1901 yılına kadar tekrar bahsedilmemiştir [88, 89]. Schulze ve Schlottke (1930) şu an sinonim olarak nitelendirdiğimiz çok sayıda alt türü tanımlamışlardır [89]. Ancak bu türlerden *H. transcausicum*, *H. steineri codinai* ve *H. marginatum balconicum*'un, *H. marginatum*'un junior sinonimleri (daha sonra verilen isimleri) olduğu daha sonra yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [90].

2.2.2. *Hyalomma marginatum*'un Morfolojisi

H. marginatum' in temel karakteristiği bacak segmentlerindeki fildişi rengi şeritlerdir. *H. marginatum* teşhisinde ayırt edici diğer özellikler aşağıda verilmiştir [90].

Erkek (Şekil 2.1)

- Konskutum rengi koyu, kırmızımsı kahverengiden siyaha doğru,

- Büyük noktalamalar nadir, küçük ve orta büyüklükteki noktalamalar merkezin yan ve arka bölümünü kaplıyor, kaudal bölgede oldukça yoğun,
- Konskutumun merkezi genellikle düz, belirgin noktalamalar yok,
- Solunum deliklerinin bulunduğu bölgedeki dorsal uzantının gözenekli parçası geniş,
- Bacakta her segmentte dorsalde gözlenen boylamasına şerit yapısı.

Dişi (Şekil 2.1)

- Skutum rengi koyu, kırmızımsı kahve ile tamamen siyah arası
- Geniş noktalamalar nadir, ince noktalamalar tüm skutumu kaplıyor,
- Solunum deliklerinin bulunduğu bölgedeki dorsal uzantısının gözenekli bölgesi geniş,
- Solunum deliklerinin çevresindeki kıllar az sayıda,
- Bacaklardaki renklenme erkeklerinkiyle aynı

Nimf

- Skutumun alt kısmı genişçe yuvarlak,
- Arka-uç girintiler oldukça derin,
- Setalar oldukça kısa ve uçları küt,
- Solunum deliklerinin plakları oval,
- Birinci koksanın çıkıntısı geniş.

Larva

- Birinci koksanın çıkıntısı küçük,
- İkinci ve üçüncü koksanın çıkıntıları oldukça az gelişmiş,
- Solunum deliklerinin dorsal uzantısı çok az değişmiştir.



Dişi birey, a. Dorsal

b. Ventral



Erkek birey, a. Dorsal,

b. Ventral

Şekil 2.1. *Hyalomma marginatum* dişi ve erkek bireyelerinin dorsal ve ventral görüntüsü

Farklı lokalitelere ait bireyler arasında morfolojik farklılıklar gözlenebilir. Örneğin; bazı bireyler skutumlarında diğerlerinden daha az ya da daha çok noktalama gösterebilirler. Solunum deliklerinin bulunduğu bölgedeki dorsal uzantının genişliği çeşitlilik gösterebilir. Bacak segmentlerindeki dorsal fildişi rengi şeritler çok nadir de olsa bazı bireylerde daha az belirgin olabilir ya da olmayabilir [90].

2.2.3. *Hyalomma marginatum*'un Coğrafi Dağılımı

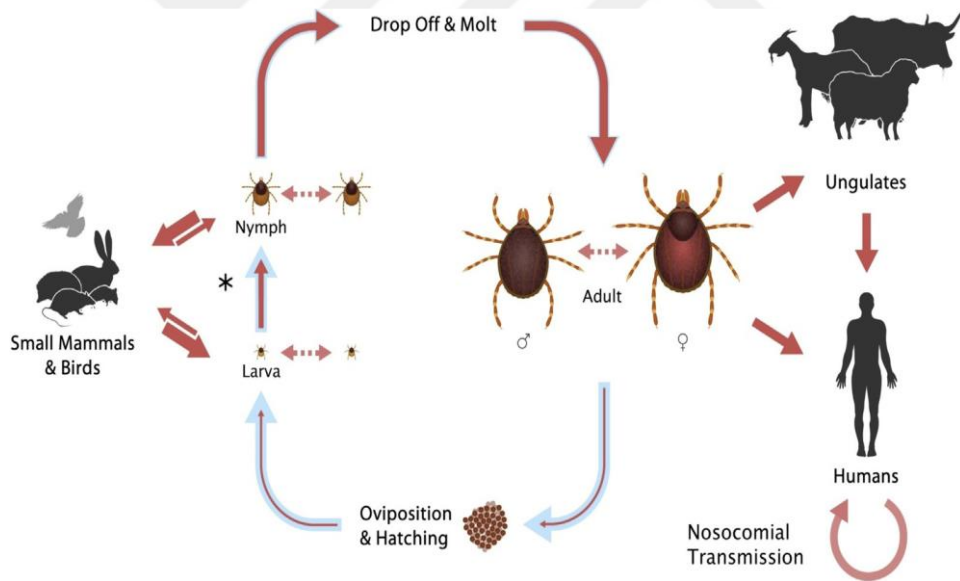
Avrupa: Arnavutluk, Bosna Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Kıbrıs, Fransa, Yunanistan, İtalya, Makedonya, Moldova, Montenegro, Portekiz, Romanya, Rusya, Sırbistan, İspanya, Ukrayna **Asya:** Ermenistan, Azerbaycan, Gürcistan, İran, Irak, İsrail, Suriye, Türkiye ve Türkmenistan **Afrika:** Cezayir, Mısır, Libya, Fas ve Tunus [90]-[92].

2.2.4. *Hyalomma marginatum*'un Konakları ve Yaşam Döngüsü

Hyalomma marginatum iki konaklıdır [91, 93]. Erginlerin tercih ettikleri ilk konaklar çeşitli yabanıl ve evcil toynaklılardır. Memelilerin diğer grupları ve kuşlar da ikincil ya da rastlantısal konaklar olabilmektedir. Larva ve nimfler kuşlar ve tavşangillerin çeşitli taksonomik gruplarına spesifiktirler [93]-[96] (Şekil 2.2).

Hyalomma kenelerinin bir başka özelliği de konaklarını bulmada pusucu stratejiyi tercih etmeleridir. Kenelerin pek çok türü konağı vejetasyonda pasif olarak ararken, *Hyalomma* cinsinin türleri birkaç yüz metre yürüyerek konaklarını takip edebilirler [97]. Bu stratejinin konağı pasif olarak bulmanın zor olduğu, kuru ya da çöl habitatındaki kenelerde evrimleştiği düşünülmektedir [91]. Bu şekilde aktif yürüme ile, kan emmemiş kenelerin konağı bulma olasılıkları daha yüksektir

Türün Afrika'nın güneyindeki (Nijerya) ve Avrupa'nın kuzeyindeki (Finlandiya) kayıtları göçmen kuşlarla taşınan ergin öncesi formlarla ilişkilendirilmektedir [36].



Şekil 2.2. *Hyalomma marginatum*'un iki konaklı yaşam döngüsü [53].

2.2.5. *Hyalomma marginatum*'un Ekolojisi

Kuzey yarımkürede, *H. marginatum*, genellikle bahar aylarında, nisan ve mayısta sıcaklığın artmasıyla aktive olur ve mayıs ve eylül ayları arasında doğada ergin öncesi hali aktif olarak bulunur. *H. marginatum* kışı aç ergin olarak geçirir. Erginler sıcaklık 12°C'yi aştığında, larva ve nimfler 14-16°C arasında aktifleşir [98], [99]. Optimum gelişim aralığı, sıcaklığın 22-27°C ve nemin %75-100 olduğu dönemlerdir. Konak arayan aç erginler,

sıcaklığın 27°C'yi aşmadığı durumlarda toprak yüzeyinde hareket eder. Hava sıcaklığının 30°C, toprak sıcaklığının ise 45°C'yi aştığı saatlerde gölgede saklanır ya da toprak içine gömülür. Kan emip doyduktan sonra yere düşen dişiler, ortalama günlük sıcaklığın 16 °C'nin altına düşmesi durumunda yumurtlayamaz. Gömlek değiştiren nimflerin 7-42° C sıcaklık ve %0-100 nispi nem gibi daha ekstrem şartlarda bile gelişimlerini tamamlayabildikleri bildirilmiştir [100], [101]. *Hyalomma* türleri susuzluğa en dayanıklı türlerdir ve bu nedenle de bozkır ve çöllerde yayılım gösterir [2], [102].

2.2.6. *Hyalomma marginatum*'un Vektörlüğünü Yaptığı Hastalıklar

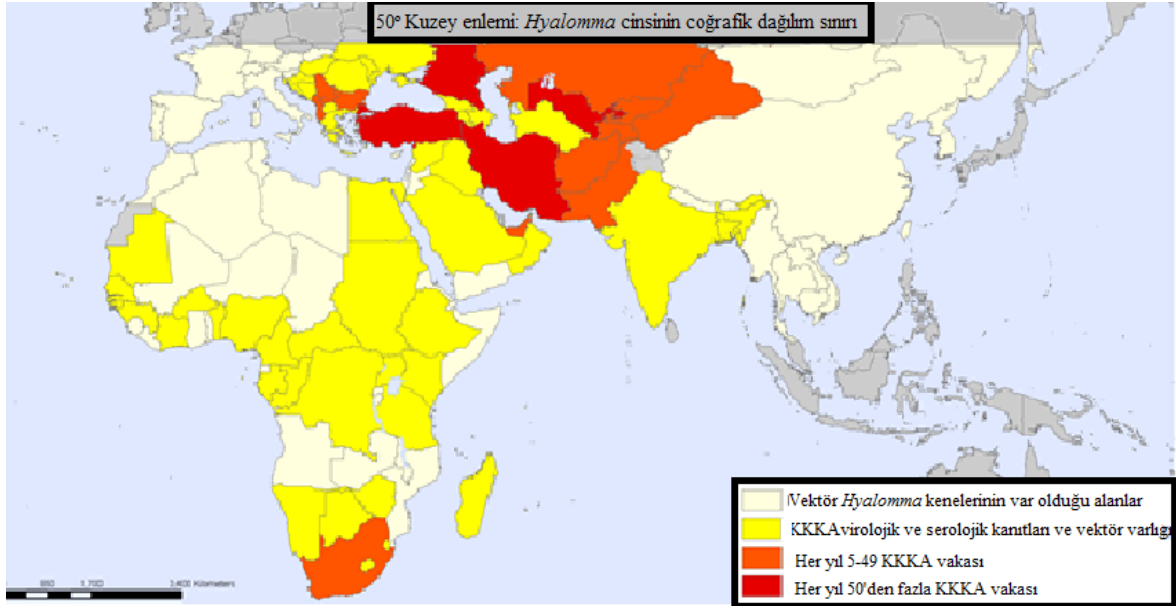
Hyalomma marginatum Balkanlardan Avrupa'ya, Pakistan ve Afganistan'dan Orta Asya'ya kadar Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV)'nün bilinen vektörüdür [36], [103]. Ayrıca butanöz ateşi, Q ateşi, theiliosis ve piroplasmosis gibi hastalık etkenlerini de taşır [91], [95], [104].

2.2.7. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) en geniş coğrafik dağılıma sahip kene kökenli hastalıktır [103], [105]. İlk vakanın 1945 yılında Kırım Yarımadası'nda kaydedilmesinden bu yana, Afrika, Asya ve Avrupa'da çok sayıda vaka rapor edilmiştir. Bunyaviridae ailesi *Nairovirus* cinsine ait olan KKKAV'nin Akdeniz, Asya ve Afrika'yı da kapsayacak şekilde 50° kuzey enlemine kadar yayıldığı bilinmektedir (Şekil 2.3). 2002 yılında Türkiye, İran, Hindistan, Yunanistan ve Gürcistan'dan doğrulanmış vakalarla beraber, hastalığın coğrafik aralığı ve insidansı daha da genişlemiştir. Hastalığa olan ilgi özellikle son yıllarda Türkiye'deki vaka sayısındaki ciddi artışla ve Balkanlar, Rusya ve güneybatı İspanya'da yeni virüs izolatlarının tespit edilmesiyle daha da büyümüştür [103], [106].

Virüs, şimdiye kadar 31 kadar kene türü ve bir *Culicoides spp.*'den izole edilmiştir [39]. Avrupa ve Asya'da KKKAV'nin transferindeki temel vektörler *H. marginatum*, *H. turanicum*, *H. anatolicum* ve *H. scupense*'dir [107]. Virüsün transmisyonuna yönelik laboratuvar çalışmaları, patojenin 4. seviye biyogüvenlik gerektirmesinden ötürü oldukça zordur [108]. *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* ve *Haemaphysalis* cinsinin bazı türlerinde de virüs tespit edilmiş ve laboratuvarında yapay olarak infekte edilmişlerdir ama virüsün doğadaki döngüsüne katılıp katılmadıkları ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır [107]. *Hyalomma*'nın virüsle infekte memeli konaklarının oldukça düşük seviyede, kısa

sürekli viremia gösterdikleri görülmüştür. Ergin öncesi dönemlerin yaygın konağı kuşların ise enfeksiyona dayanıklı olduğu görülmüştür.

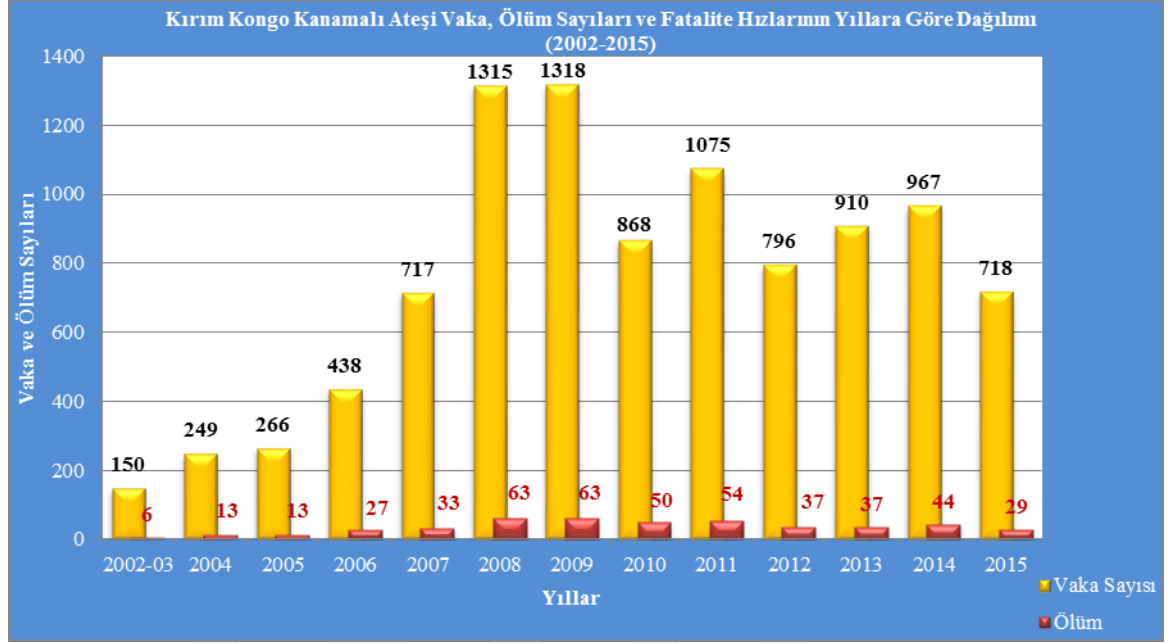


Şekil 2.3. Dünyada Kırım Kongo Kanamalı Ateşi salgını görülen alanların yıllık vaka bildirimlerine göre dağılımları (Kaynak: Dünya Sağlık Örgütü, 2008)

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü insana kenenin ısırmasıyla ya da KKKA hastası kişilerin ya da viremik hayvanların doku ve kanlarına temas ile bulaşır [39], [38]. Türkiye’de ilk KKKA vaka bildirimini 2002 yılında Kelkit Vadisi’nde kaydedilmiştir [38]. T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2015 sonuna kadar, ağırlıklı olarak Tokat, Sivas, Çorum, Yozgat, Çankırı, Kastamonu, Karabük, Gümüşhane ve Erzurum’dan olmak üzere, 200’den fazla ilçeye bağlı 1500 kadar kırsal yerleşim biriminden 9787 vaka kaydedilmiş olup, bunların 469’u ölümlle sonuçlanmıştır (Şekil 2.4). Vakalar, tarım ve hayvancılıkla uğraşanlar arasında yoğunlaşmaktadır. Ülkemizdeki salgında olguların % 90’ı çiftçilerde görülürken sağlık çalışanları en çok etkilenen ikinci grubu oluşturmaktadır. Türkiye’de enfeksiyonun kadın ve erkekte görülme oranı arasında belirgin bir fark yoktur [38].

Türkiye’de kene dağılımı ile ilgili abiyotik etkenlerin analizi, KKKA riskinin vektör kenenin varlığı ve parçalı arazi yapısı ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [80] [109]. Geçmiş 20 yıllık iklimsel dönemin incelenmesi, bazı bölgelerde sıcaklık artışları ve bitki örtüsünde artış olduğunu göstermiştir. KKKA’nın görüldüğü bölgelerde ekolojik değişimlerin yanında, yaban hayvanı sayısında da belirgin artışlar olduğu bilinmektedir. Özellikle yaban domuzu artışı dikkat çekse de, yaz döneminde bu hayvanlardaki ergin kene enfestasyonlarının, sığırlardakine oranla çok düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

Bu da sığırların kenelerin çoğalmasındaki başlıca konaklardan biri olduğunu göstermektedir [109].



Şekil 2.4. Türkiye’de 2002-2015 yılları arasında Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının vaka ve ölüm sayıları (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2016)

Hyalomma marginatum'un immatur formları kuşları ve orta büyüklükte memelileri infeste ederler ve bu konaklar virüsü kan emen diğer larva ve nimflere bulaştırırlar [110, 111]. Büyük toynaklılar erginlerde virüsü kan emen dişilere transfer eden konaklar olarak hizmet ederler [111]-[113]. Dişi keneler virüsü dikey geçiş ile yumurtalara iletirler. İnfekte konaklardan kan emme ya da aynı anda kan emme ile de virüs keneleri infekte edebilir [114]. Filogenetik analizler tek bir konaktan ortak infeksiyon süresince genomda, tekrar sıralama ve rekombinasyonunun olduğunu ortaya koymuştur, bu da yeni variantların gelecekte ortaya çıkması ile ilgili potansiyeli göstermektedir [115], [116]. Evcil ve yabani hayvanlar virüsü ancak 7-10 gün kadar barındırabilir. Buna karşın virüs kenelerde ömür boyu (1-1,5 yıl), hatta nesiller boyu (transovariyal + transstadial geçiş) kalmakta ve çoğalabilmektedir [91], [117].

2.3. Populasyon Genetiği Çalışmaları

Populasyon genetiği bireyler arasındaki genetik farklılıkların çalışılmasıdır. Bu çeşitlilik, alel frekansları, genotip frekansları ve fenotip frekanslarındaki değişiklikleri içerir. Populasyon genetiği, seçim, mutasyon oranı, rekombinasyon, genetik sürüklenme ve efektif populasyon büyüklüğü gibi faktörler tarafından belirlenen genetik çeşitlilik hakkında bilgi verir [118].

Populasyon genetiği yaklaşımına göre, bir alt populasyon, populasyon yapısının en küçük seviyesi olarak dikkate alınır ve deme olarak da adlandırılır. Pek çok tür için doğada demeler arasındaki sınırları bilmek ve dolayısıyla alt populasyonları açık bir biçimde tespit etmek zor olduğundan, araştırmacı tarafından belirlenen örnekler alt populasyon olarak adlandırılıp çalışılabilir [119].

Populasyon genetik yapısı ile ilgili değerlendirmelerde bireylerin aynı kuşağa ait olması veya çakışan kuşakların söz konusu olduğu populasyonlarda bireylerin aynı kohorta ait olması tercih edilir. Bunun nedeni alel sıklıklarının sadece mekana bağlı değil, sınırlı büyüklüğe sahip populasyonlarda zamana bağlı da değişiklik göstermesindedir [120]. Bu durum, darboğaz ve kurucu etkisinin görüldüğü populasyonlarda özellikle önemlidir [121].

Herhangi bir genetik çalışmada en önemli basamak, çalışılan evrimsel ölçeğe uygun mutasyon oranına sahip belirtecin seçilmesidir. Genetik belirteçler iki gruba ayrılabilir:

- a) Biyokimyasal belirteçler: Protein ve aminoasitlerdeki değişimi kullanan belirteçler
- b) Moleküler belirteçler: Nükleotit değişimini temel alarak delesyon, duplikasyon, inversiyon ve insersiyon gibi DNA seviyesindeki farklılıkları kullanan belirteçler

Populasyon seviyesinde moleküler çeşitliliğin ölçülmesinde dikkat edilen parametreler; polimorfizm, beklenen (H_e) ve gözlenen (H_o) heterozigotluk ve alel sayısıdır. Populasyon yapısını tanımlamada en yaygın kullanılan parametreler Wright'ın F istatistiğidir [122]. Bu parametreler sıklıkla Weir ve Cockerham'ın yansız indisleri kullanılarak değerlendirilir [123], [124]. Üç seviyeli populasyon yapısı yaklaşımında (birey, alt populasyon, toplam), F_{IS} (kendileşme katsayısı), bireyin kendileşmesinin alt populasyondaki kendileşmeye, F_{ST} (Fiksasyon indeksi), alt populasyondaki kendileşmenin tüm populasyondaki kendileşmeye oranıdır. F_{IS} , -1 (alt populasyondaki tüm bireylerin heterozigot olması) ve +1

(tüm bireylerin homozigot olması) arasında değer alır ve 0 değeri alt populasyonların HWE'ye uyduğuna işaret eder. Dolayısıyla F_{IS} rasgele çiftleşmeden sapmayı gösteren bir ölçümdür. F_{ST} , toplam populasyonun, üremenin meydana geldiği sınırlı büyüklükteki alt populasyonlara bölünüp bölünmediğini tanımlar. F_{ST} , 0 ile +1 arasında değer alır. $F_{ST}=0$ değeri alt populasyonlar boyunca alellerin rasgele dağıldığını gösterirken, +1 tüm alt populasyonların farklı bir alel için sabitlendiğini göstermektedir. Dolayısıyla F_{ST} alt populasyonlar arasında genetik farklılığın önemli bir ölçütüdür [125].

Bir organizmanın populasyon genetiği çalışmalarında iki temel amaç vardır: Genetik çeşitliliğin seviyesini değerlendirmek ve bunun zamanda ve mekanda nasıl dağılım gösterdiğini nedenleri ile ortaya koymak. Bu sorulara cevap vermek için çalışılan vektör populasyonları uygun coğrafi alanda ve bölgesel ölçekte toplamak gerekir [126]. Yeterli örneklem boyutunu belirlemek, sağlam istatistiksel çıkarımlarda bulunmaya yardımcı olur. Uygun örneklem büyüklüğü sorulan soruya, lokus sayısına ve bu lokusların alelik çeşitliliğine, alel frekanslarının homojenliğine ve populasyonlar arasında genetik farklılaşmanın büyüklüğüne de bağlıdır. [127]. Farklılaşma seviyesi azaldığında daha fazla bireyin toplanması gerekir [128].

Populasyon yapısı analizlerinde en sık tercih edilen yöntemlerden biri alt populasyonlar arasındaki atasal akrabalık derecelerinin betimlenmesidir. Bu yöntem çoklu lokus genotip verisini temel alarak, her bir populasyondaki bireylerin diğer populasyondaki bireylerle genotip paylaşım oranlarını ortaya koyar [129], [130]. Bu yöntem, populasyon yapısının olup olmadığının gösterilmesinde, farklı genetik populasyonların varlığının belirlenmesinde, bireylerin populasyonlara atanmasında, göçmen bireyler ve karışık ataya sahip bireylerin belirlenmesinde kullanılır [130]-[133]. Bu yöntem, her lokus için belirli alel frekansları ile karakterize edilen K sayıda populasyonun olduğunu varsayar. Örnekteki bireyler alel frekanslarına (veya genotip frekanslarına) bağlı olarak en yakın kümelenedikleri bireylerle beraber ortak bir populasyona atanır. Eğer bireylere ait genotip değerleri bireyin karışık ataya sahip olduklarını işaret ediyorsa, bu birey iki veya daha fazla populasyona da katılabilir. Bu model, HWE eşitliği ve bağlantı eşitliğinin olduğunu varsayar [129], [130].

2.4. Mikrosatellit Genetik Belirteçler

Populasyonlarda polimorfizmi saptama yöntemlerinden biri olan mikrosatellitler, ardarda tekrar eden 1-6 baz çiftinden oluşan kısa DNA fragmentleridir [134], [135]. Mikrosatellit lokusları, basit sekans tekrarları (simple sequence repeats, SSR), kısa ardışık tekrarlar (short tandem repeats, STR), basit sekans ardışık tekrarları (simple sequence tandem repeats, SSTR), çeşitli sayıda ardışık tekrarlar (variable number tandem repeats, VNTR), basit sekans uzunluk polimorfizmi (simple sequence length polymorphisms, SSLP) olarak da isimlendirilmiştir. Şimdiye kadar analiz edilen tüm prokaryotik ve ökaryotik canlılarda bulunmuştur [134]-[140]. Bir mikrosatellit lokus genellikle 5 ile 40 tekrar uzunluğundadır. İki nükleotitli, üç nükleotitli ve dört nükleotitli tekrarlar, moleküler genetik çalışmalarındaki en yaygın tercihlerdir. İki nükleotitli tekrarlar, pek çok türde mikrosatellitlerin büyük bir bölümünü oluşturur [141]. Üç nükleotitli ve altı nükleotitli tekrarlar, protein kodlanan bölgelerde en sık gözlenen tekrarlardır çünkü çerçeve kayması mutasyonuna neden olmazlar [142]. Tek nükleotit tekrarlar amplifikasyonla ilgili problemlerden ötürü daha az güvenilirdir. Daha uzun tekrar tipleri daha az yaygındır ve onların evrimini araştırmak için çok az veri vardır. Mikrosatellitler çeşitlerine dair örnekler Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan mikrosatellit çeşitleri

a) Tekrar üniteleri		
AAAAAAAAAAAAA= (A) ₁₂		tek nükleotit, 12 baz çifti
ACACACACACAC= (AC) ₆		iki nükleotitli, 12 baz çifti
ATGATGATGATG= (ATG) ₄		üç nükleotitli, 12 baz çifti
GTCTGTCTGTCT= (GTCT) ₃		dört nükleotitli, 12 baz çifti
b) Homozigot mikrosatellitler		
...CGTAGCCTTGCATCCTT	<u>CTCTCTCTCTCTCT</u>	ATCGCTACGG...(41 bp)
...CGTAGCCTTGCATCCTT	<u>CTCTCTCTCTCTCT</u>	ATCGCTACGG...(41 bp)
5' komşu bölge	mikrosatellit lokus	3' komşu bölge
c) Heterozigot mikrosatellitler:		
.....CTATCGGCATAGGATC	<u>CTCTCTCTCTCTCT</u>	ATCGGTAC... (38 bp)
.....CTATCGGCATAGGATC	<u>CTCTCTCTCTCTCT</u>	ATCGGTAC... (42bp)
5' komşu bölge	mikrosatellit lokus	3' komşu bölge
d) Mikrosatellit tipleri:		
Mükemmel:	CACACACACACACACA	
Bileşik:	CACACACAGAGAGAGA	
Kesikli:	CACATTCACACATTCACA	

Mikrosatellitler, hem protein kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerde bulunmaktadır [143]-[145]. İlk keşfedildiği tarihten itibaren [146]-[148] mikrosatellitleri güçlü bir belirteç yapan, yüksek çeşitlilik göstermeleri, genomda bol miktarda bulunmaları, çok sayıda alele sahip olmaları ve çeşitli yöntemlerle mikrosatellit alelik çeşitliliğinin hızlı bir şekilde keşfedilebilmesidir [149]-[152]. Bu nedenden dolayı mikrosatellitler bir çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu alanlar şöyle özetlenebilir [24], [153]:

- Genom haritalarının çıkarılması
- Çeşitli hastalıkların anlaşılması: Bazı mikrosatellit aleller DNA'nın kodlanan bölgesindeki çeşitli mutasyonlarla ilişkilidir, bu da çeşitli rahatsızlıklara neden olur.
- Adli süreçlerde DNA test edilmesi için kullanılır.
- Evrimsel/ biyolojik içerik olarak baktığımızda gruplar ya da bireyler arasındaki ilişkinin derecesini açığa çıkarmada kullanılmaktadır. Tutsak ya da nesli tükenmekte olan türlerde, mikrosatellitler kendileşme seviyesini tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır (F_{IS}).
- Populasyonların ve alt populasyonların genetik yapısını ortaya çıkarmada kullanılmaktadır (F istatistiği ya da genetik mesafe)
- Demografik tarihin değerlendirilmesi (darboğaz etkisi), efektif populasyon büyüklüğünün (N_e) ve populasyonlar arasındaki gen akış miktarının ve yönünün belirlenmesinde kullanılır.
- Filocoğrafi çalışmalar için veri sağlar, geniş ölçekte flora ve faunaların genetik tarihi ve biyocoğrafyası bu belirteçlerle araştırılabilir. Daha ince ölçekte birbiriyle oldukça yakından ilişkili türler hakkında bilgi sağlar.

Mikrosatellitlerin avantajları aşağıda sıralanmıştır [25]-[28], [153], [154]:

1. Az miktarda DNA yeterlidir (10-100 ng). Çok zarar görmüş ya da çok eski örneklerde bile sonuç verir.
2. Genomda bol miktarda bulunur.
3. Genomda rasgele dağılım gösterir.
4. Aleller yüksek doğrulukla yorumlanabilir.
5. Eş-baskındır, heterozigotlar homozigotlardan ayrılır.
6. Yüksek polimorfizm gösterirler.

7. Yüksek çoğaltılabilirlik özelliğine sahiptirler.
8. Geniş uygulama alanına sahiptir.
9. Lokus-spesifiktir.
10. PCR'a dayalı bir tekniktir.

Pek çok avantajı olmasına rağmen, mikrosatellitlerin bazı sorunlu tarafları da vardır. Bu problemler aşağıda listelenmiştir:

- 1) Zaman gerektirir ve yüksek masraflıdır.
- 2) Türe özgü belirteç izolasyonu gerektirir: PCR'a dayalı belirteç analizi, amplifikasyon için tekrar bölgelerini hedefleyen primer sekanslarını gerektirir. Aynı primer sekansını pek çok bireydeki aynı hedefte amplifiye edebilmek için, primerin bağlandığı bölgenin aynı olması gereklidir. Bir çift mikrosatellit primer nadiren tüm taksonomik gruplar için çalışır ve bu primerler sıklıkla her tür için yeniden oluşturulur [155]. Mikrosatellit lokusu sara DNA, "komşu bölge" olarak adlandırılır [156]-[158]. (Çizelge 2.1). Bu bölgedeki sekanslar aynı türün bireyleri arasında ve bazen farklı türlerin bireyleri arasında genellikle özdeş olduğundan, bir mikrosatellit lokus komşu bölgesine göre belirlenebilir. Primerler, komşu bölgeye bağlanacak şekilde dizayn edilebilirler ve mikrosatellit lokusun PCR ile amplifiye edilmesine rehberlik ederler.

Yeni mikrosatellit belirtecin izolasyon prosedürü son yıllarda daha hızlı ve daha ucuz olmaya başlamıştır. Bu da başarısızlık oranını ve yeni belirteç izolasyon masrafını düşürmüştür [155].

- 3) Mutasyonel sürecin kompleksliği [135], [137], [159]:

Komşu bölgelerin aksine, mikrosatellit tekrar bölgeleri sıklıkla mutasyona uğrarlar. Bu durum tekrarların sayısını değiştirir ve böylece tekrar dizisinin uzunluğu da değişir [160]. Pek çok mikrosatellit yüksek mutasyon oranına sahiptir (kuşak/lokus başına 10^{-2} ve 10^{-6} mutasyon ve ortalama 5×10^{-4}). Böylece genetik çalışmalar için yüksek seviyede alelik çeşitlilik oluşur [137], [153], [161]. Ancak, mutasyon oranları, sadece tekrar tiplerine bağlı olarak değişiklik göstermez (iki, üç ya da dört nükleotit); tekrarın baz kompozisyonu, mikrosatellit tipi (mükemmel, bileşik ya da kesikli) ve hatta taksonomik gruplara göre de değişiklik gösterir [162].

Populasyon genetikçileri tarafından iki mutasyon modeli geliştirilmiştir: Sonsuz alel modeli (SAM) [163] ve dereceli mutasyon modeli (DMM) [164]. Sonsuz alel modeline göre, her mutasyon özgün bir alel yaratır. Özdeş aleller aynı atayı paylaşırlar. Dereceli mutasyon modelinde ise her mutasyon, mikrosatellite bir tekrar ünitesi ekleyerek ya da çıkararak yeni bir alel üretir. Sonuç olarak, farklı büyüklükteki aleller, benzer büyüklükteki alellere göre daha uzak akraba olabilirler. Bu nedenle, DMM alel büyüklüğüne bağlı olarak ifade edilir [135]. Wright'in populasyon çeşitliliği ile ilgili F istatistik tahminleri SAM'e dayanır. Slatkin'in R istatistik tahminleri ise DMM'e dayanır.

4) Gizli Alelik Çeşitlilik: Mikrosatellit genotipinde alellerin uzunluklarına göre tanımlanması (jel elektroforezi), her bireyin her bir alelinin sekanslanmasına göre zamanı ve masrafı ciddi şekilde azaltır. Ancak, bu kestirme yol, tüm farklı alellerin farklı uzunlukta olduğu varsayımına dayanır. Aslında, aynı boyutta ama farklı kökene sahip aleller kısmen yaygın olabilir. Mesela, nokta mutasyonları alelin büyüklüğünü değiştirmeden bırakır ya da komşu bölgedeki insersiyon ve delesyonlar var olan alelin büyüklüğü ile aynı büyüklükte yeni alellerin oluşmasına neden olur [165]-[167]. Bu terim homoplasi olarak ifade edilir. Homoplasi popülasyondaki alelik çeşitliliğin tespit edilmesini engeller [165]-[171]. Homoplasinin bileşik ve kesikli tekraralarda fazla olduğu gösterilmiştir [166], [172], [173]. Homoplasi sekanslanan alellerle tespit edilebilir.

5) Amplifikasyonla ilgili problemler: Primer bölgesinde mutasyon olursa, bazı bireyler sadece bir amplifiye olmuş alele sahip olurlar veya hepsini amplifiye etmede başarısız olurlar [174], [175].

Mikrosatellit çalışmalarında ilk basamak, daha önce yayınlanan literatürlerin taranması ve mikrosatellit belirteçlerin çalışmak istenilen türlerde ya da yakın ilişkili türlerde bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Mikrosatellitler lepidopterler, kuşlar, yarasalar ve prokaryotlarda oldukça az olma eğilimindedir, ancak balıklar ve memelilerde oldukça fazla sayıdadırlar [176]. Ayrıca yüksek melezlenme oranına sahip olan organizmalarda, düşük populasyon boyutuna sahip, sık ya da şiddetli darboğaz etkisinin görüldüğü, düşük polimorfizm ve heterozigotluğa sahip türlerde ortalama olarak daha kısa mikrosatellitler görülmektedir [176],[177].

Mikrosatellitlerin kullanılabilirliği ve kalitesi, daha önce genomik bilgiye sahip olunmayan türlerde en baştan dizayn etmeyi gerektirir. Günümüze kadar, *H. marginatum* ile ilgili yapılan genetik çalışmalar oldukça az sayıdadır. Mikrosatellitlerle çalışma yapılmadığı gibi Güçlendirilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi (GPUP), Rasgele Arttırılmış Polimorfik DNA (RAPD) ya da Tek Nükleotit Polimorfizmi (TNP)' de izole edilmemiş ve tanımlanmamıştır. Mikrosatellit izolasyonunda en fazla kullanılan yöntem zenginleştirilmiş kütüphane yöntemidir. Bu yöntemde birkaç yüz klon mikrosatellit problemlerle hibridizasyon ile taranır [178]. Bu metot oldukça zor, zaman kaybettiren ve masraflı bir yöntemdir. Zenginleştirilmiş kütüphanede az sayıda spesifik tekrar motifi kullanılır. Bu motifler seçilirken genomdaki bollukları ile ilgili önceden bilgi sahibi olunmaz [179]. Bu da genomu temsil etme açısından sapmalara neden olabilir. Sekans teknolojisindeki gelişmelerle beraber, biyobilişim araçları kullanılarak tüm genomun incelenmesi ve mikrosatellitlerin tespiti, daha önce çalışılmayan organizmalarda bile başarıyla gerçekleştirilmektedir [180].

Yeni Nesil Dizileme (YND) yönteminin geliştirilmesiyle beraber, tek bir aşamada, herhangi bir canlının genomuna ilişkin keşfedilebilen, sekanslanabilen ve genotiplendirilebilen belirteç sayısı yüzlerden binlere ulaşmıştır [181]-[184]. SOLiD (ABI, Norwalk, CT), 454 GS FLX (Roche, Penzberg, Germany), Illumina (Illumina, San Diego, CA) gibi yeni nesil dizileme platformları genom içerisinde kodlanan ve kodlanmayan bölgelere ilişkin, çok kısa sürede oldukça fazla sayıda genomik veya transkriptomik dizileme üretebilir [180]. Bu şekilde daha önce çalışılmış ve oldukça iyi karakterize edilmiş türlerde, geniş ölçekli yeniden dizileme yapılabileceği gibi, daha önce bilgi sahibi olunmayan türlerde de bütün genom veya transkriptom dizileme yapılabilir [185]. Bu teknolojiler düşük masraflarla oldukça fazla sayıda okuma üretebilme kapasitesine sahiptir [186].

Son yıllarda, 454 pyro-dizileme Illumina dizilemesine göre daha uzun olan okuma üretme kapasitesinden dolayı daha fazla tercih edilmektedir [187]-[189]. Illumina sekansları kısa okumalarından ötürü daha önce referans dizi bilgisine sahip olunan türlerde yeniden dizileme uygulamalarında daha fazla tercih edilmiştir. Ancak günümüzde, Illumina teknolojisinin ilerlemesi ile üretilen DNA dizilerinin daha uzun olması ve yeni bilgisayar programlarının geliştirilmesiyle, kısa okumalar birleştirilebilmekte ve transkriptom ve genom analizleri için kullanılmaktadır. Illumina dizileme artık kısmen daha uzun okumalar üretmektedir (GAIIx de 150 baz çifti, HiSeq 2000 de 100 baz çifti). Ayrıca Illumina

dizilemeden elde edilen okuma sayısında da ciddi artış görülmektedir. Oldukça pahalı olan 454 okumaları ile karşılaştırıldığında Illumina dizileme verilerinin masrafı oldukça düşüktür [190]. Illumina dizileme teknolojisi kullanılarak daha önce referans bilgiye sahip olunmayan organizmalardan mikrosatellit elde edilebileceği pek çok çalışmada gösterilmiştir [189], [191]-[194].

Mikrosatellitleri tespit etmede iki yaklaşım söz konusudur: Az miktarda DNA üzerinde yoğun bir tespit ya da çok fazla veri üzerinden keşifsel çalışma. Günümüzdeki pek çok mikrosatellit tespit araçları keşifsel yaklaşımı kullanmaktadır. İyi bir mikrosatellit tespit aracı mikrosatellit veri setini araştırırken aynı veriyi farklı girişlerle tekrar vermeyecek şekilde olmalıdır (non-redundant data). Bunu sağlayacak bir analiz filtreleme sistemi, program içerisine yerleşmiş olmalıdır ve tüm mikrosatellit tekrarların eksiksiz olarak sayımı için tüm alıştırmalar çok önemlidir. Bu tip bir filtrenin olmayışı, mikrosatellit sıklığının genomda olduğundan daha fazla değerlendirilmesine yol açar. Hala mikrosatellit motifinin tanımlanmasında bileşik ve kesikli tekrar durumları ile ilgili hatalar ortaya çıkabilmektedir. Bu da çıktılarda fazlalık olarak ortaya çıkar. Bu tekrarların istatistiksel yorumlanmalarda da sorunlar yarattığı bilinen bir durumdur. Farklı programlar, tekrarları farklı şekilde yorumlayabilir [195] [196].

Son 15 yılda, mikrosatellitlerin ortaya çıkarılmasında ve tanımlanmasında farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Ancak, bu yaklaşımların hiçbirinin tam fonksiyonlu olduğu söylenemez. Veri dosyasının formatına ve DNA dizi bilgisine göre aracın seçimi de değişmektedir.

Primer dizayn edilirken dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda belirtilmiştir:

1. İki primerin uygunluğu: Çapraz bağlanmaya neden olmamaları için primerlerin zıt olmamasına dikkat edilmelidir, benzer uzunluklara ve erime derecelerine sahip olmaları gereklidir.
2. PCR'ı başarısız olmaya itecek dur kodonlarını ya da diğer sekansları içermemelidir.
3. İyi bağlanamayan primer başlatma bölgelerinden kaçınılmalı, palindromlardan (sağdan ve soldan okunduğunda aynı olan kelimeler) uzak durulmalıdır.
4. Toplam amplifiye olmuş ürün uzunluğu 100-250 baz çifti olmalıdır. Bu uzunluk jellerin sekanslanması ve görüntüleme için kullanılacak otomatik genotipleme aletleri için makul bir değerdir.
5. Sekans bölgesinin sonundaki tekrar bölgesinden kaçınılmalıdır.

Bir mikrosatellit çalışması kısaca şu basamaklardan oluşmaktadır:

1. DNA İzolasyonu
2. Zenginleştirilmiş kütüphane ya da yeni nesil sekanslama dizileme ile mikrosatellit belirteçlerin araştırılması
3. Primerlerin dizayn edilmesi
4. Yeni primerlerle lokusların amplifikasyonu. Dereceli PCR koşulları kullanılarak (sıcaklık, zaman, magnezyum primer konsantrasyonu değiştirilerek) optimal koşulların sağlanması
5. PCR ürünlerinin varlığını doğrulamak için jel elektroforezi kullanılması. Birkaç denemeden sonra başarısız olan primerlerin çıkarılması
6. Başarılı primer çiftlerinin 10-20 birey üzerinde denenerek polimorfizmin kontrol edilmesi. Değişiklik olmayan lokusların uzaklaştırılması.
7. Güvenilirliğin test edilmesi. Başarılı primer çiftlerinin aynı bireyler üzerinde iki veya daha fazla kez yeniden çalıştırılması (genotip skorun sürekli olarak kopya edilebilirliğini garantiye almak için). Güvenilmeyen lokusların uzaklaştırılması.
8. Kalan lokuslar için florasanla işaretlenmiş primerlerin sipariş edilmesi.
9. Tüm verisetinin kalan lokuslarla genotiplendirilmesi- Lokuslar için primerlerin (farklı boylarla etiketlenmiş) tek bir PCR reaksiyonu ile amplifiye edilmesi

2.5. Kenelerde populasyon genetiğine yönelik araştırmalar

Tabachnick ve Black, vektör populasyonlarında gen akışı ve dispersalin anlaşılabilmesi için moleküler genetik çalışmaların yapılması gerektiğini ifade etmişlerdir [197]. Artropod vektörlerdeki genetik çeşitliliğin önemi yine bu dönemde Gouding tarafından da vurgulanmıştır [1]. O tarihten önce, özellikle kene populasyon genetiğine odaklanan az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir [198]-[200]. Yine o dönemde gerçekleştirilen birkaç çalışma kene alt populasyonlarının dispersali ve patojen spesifikliğin hastalık kontrol çabalarındaki önemini göstermiştir [201], [202]. Daha güncel olarak gerçekleştirilen çalışmalarda, genetiğin kene evrimi ve konak özelleşmesi üzerine uygulamaları tartışılmıştır [16], [17]. Kene türünün genetik yapısı ve insan hastalık epidemiyolojisi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir [20]. Bu çalışmalarda, kriptik türlerin moleküler araçlar yardımı ile teşhis edilmesi, populasyon genetik çeşitliliğinin belirlenmesinin önemi,

epidemioloji üzerine vektör dispersalinin rolü ve vektör-kökenli patojenlerin genetik yapısı gibi vektör biyolojisindeki temel konular tartışılmıştır.

Kene genetiğinin araştırılması, taşıdıkları patojenler ve dolayısıyla insan ve hayvan sağlığı açısından önemleri göz önüne alındığında daha da önemlidir [3], [6], [7], [56]. Bu özelliklerinden ötürü, kontrol yöntemleri geliştirerek patojen transmisyonunu düşürmeye yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmaların büyük bir kısmı kene populasyon dinamiği ve dispersali dikkate alınmadan yapılmıştır. Populasyon genetiği çalışmaları geçmişteki ve güncel gen akışı, türlerin dağılımı, konak adaptasyonu gibi patojen spesifikliği ve kimyasal akaraisidlere direnci belirleyen evrimsel faktörlerin iç yüzünün anlaşılmasını sağlar. Ayrıca, vektör ve patojen populasyonlarında görülebilen lokal adaptasyon da, epidemioloji üzerine etkili olan bir faktördür. Zorunlu parazit ve vektör olarak keneler, konakları üzerinde ve taşıdıkları patojenler üzerinde doğrudan etkiye sahiptir [2]-[4], [6].

Konak-vektör-patojen etkileşiminin her bir üyesi, diğer üyelerden fazlasıyla etkilenir, dolayısıyla bu bileşik etki kenelerdeki genetik varyasyon üzerinde etkili olur [203].

Kene populasyon genetiği çalışmaları, temel vektör biyolojisi ve kene kökenli patojenlerin araştırılması için bir köprü görevi görür [20], [203]:

- 1) Kenelerde genetik yapı ve dispersalin değerlendirilmesi, kene kökenli patojenlerin dispersal örüntüsünün değerlendirilmesinde yol göstericidir.
- 2) Kenelerde gen akışının belirlenmesi (başarılı dispersalin sonucu) önemlidir çünkü bu parazitlerin genetik yapısı her zaman konaklarınınkiyle paralel değildir.
- 3) Bu çalışmalar, kenelerdeki melezleşme ve konak spesifik soyların gelişmesi gibi rasgele olmayan çiftleşme örüntüsünü ortaya çıkarabilir, bunlar da patojen transmisyonunda önemli etkilere sahiptir.
- 4) Konak, patojen ve vektörü birlikte ele alan çalışmalar, çeşitli trofik seviyelerdeki türlerin evrimsel süreçlerini anlamayı kolaylaştırır.

Moleküler çalışmalar için uygun belirteç seçilirken bu belirteçlerin DNA-temelli, PCR ile amplifiye olabilen, türler arası transfer edilebilen, yüksek çeşitlilik gösteren ve seçici nötral olması tercih edilir [126], [152], [204], [205]. Çalışmada seçilecek olan genetik belirteç, test edilecek hipoteze göre, DNA dizisinin var olup olmadığına, belirteç sisteminin çeşitlilik ve çözümüleme yeteneğine bağlıdır [126]. Keneye özel faktörler, her birey için gereken doku miktarı, korunmuş materyalin kalitesi (yeterince iyi korunmamış materyaller

tüm moleküler yöntemlerde özellikle de allozimlerde faydalı değildir), örneğin elde edilmiş şekli (konaktan mı yoksa sürüklenme yöntemi ile mi elde edilmiş, konak yuvalarına yakın yerlerden mi yoksa doğadan mı toplanmış) ve yaşam dönemidir (larva örneklemeleri yüksek sayıda sibling bireyler içerir). Tüm populasyon genetiği çalışmaları için tek ideal bir genetik belirteç yoktur ama bazıları diğerlerinden daha etkilidir.

Avrupa’da dağılım gösteren 6 sert kene türü ile 18S rDNA kullanılarak yapılan çalışmada oldukça yakından ilişkili türler arasında düşük genetik varyasyon ortaya çıkarılmıştır [206]. Bu bulgular, 18S rDNA’nın birbirileriyle oldukça yakından ilişkili türlerdeki farkları ortaya çıkarmada uygun bir belirteç olmadığı, ancak taksonları gruplama amacıyla kullanılabilmesini göstermiştir.

Mitokondriyal ribozomal genler moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu genlerin yüksek sayıdaki kopyaları tek kopya nükleer genlere göre daha kolay çalışılmasını sağlamaktadır. Bu genlerin anasal kalıtımı türü seviyedeki araştırmalarda oldukça yararlıdır. Mitokondriyal genler ribozomal genler ve protein kodlayan genler olarak iki kategoriye ayrılabilir. 12S ve 16S iki mitokondriyal ribozomal genlerdir. Norris ve ark., (1999), 52 kene türü için 12S sekansları elde etmiş ve sonuçlarını daha önce yayınlanan 16S sekansları Black ve Piesman, (1994) [207] ile karşılaştırmıştır, ancak 12S ve 16S yetersiz çözünürlükte ağaçlar oluşturmuştur [208]. Norris ve ark. (1999) bu durumu mitokondriyal genomdaki AT içeriğinin yüksek olmasına bağlamıştır, bu durum yüksek oranda homoplasiye neden olur. Dolayısıyla, bu genlerin türü seviyede ve oldukça yakın ilişkili taksonlar arasındaki ilişkileri çözümlemede daha uygun olduğu ifade edilmiştir. 12S rDNA sekansının bir bölümü *Rhipicephaline* cinsi içerisinde son zamanlardaki çeşitliliği çözümlemede kullanılmıştır [49], [208]. Bu çalışmalarda *Boophilus* cinsine ait türlerin *R.evertsi* ve *R. pravus* ile kümelendiği gösterilmiştir [49], [209].

Allozim ve izozimler pahalı değildir ve kodominantlardır. Ancak günümüz populasyon genetiği çalışmaları için çok tavsiye edilmez. Özellikle de kenelerde allozim kullanımı pek çok yaşam döneminin küçük vücut büyüklüğüne sahip olmasından dolayı kısıtlıdır. Yapılan çalışmalar çoğunlukla erkekler dişilerden daha küçük olduğundan, dişiler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu durum populasyon seviyesi ile ilgili çıkarımları eşeye bağlı olarak kısıtlamıştır.

Bugüne kadar 12 kene türü için mikrosatellit belirteç geliştirilmiştir: *Bothriocroton hydrosauri* [210] , *Dermacentor albipictus* [211], *D. variabilis* [212], *Ixodes arboricola* [213], *I. ricinus* [29], [32], *I. scapularis* [214], *I. texanus* [215], *I. uriae* [216], *R. annulatus* [217], *R. australis* [218], [219], [11], *R. microplus* [8] ve *O. coriaceus* [220]. Bunların çoğu yakından ilişkili türlerde çapraz amplifikasyonlara izin vermiştir ve populasyon genetiği çalışmalarında büyük faydalar sağlamıştır.

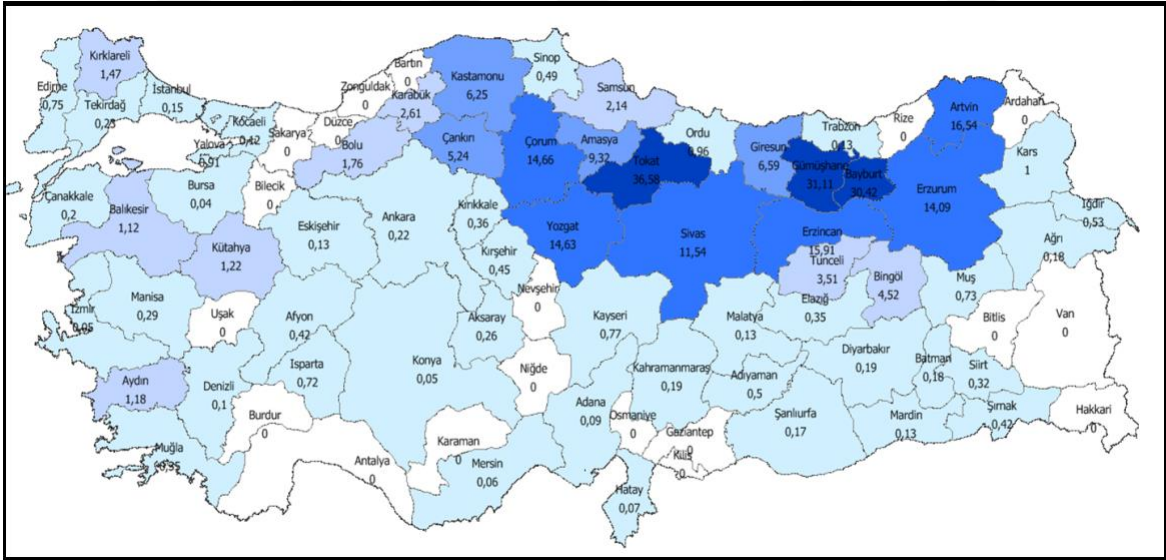


3. GEREÇ ve YÖNTEM

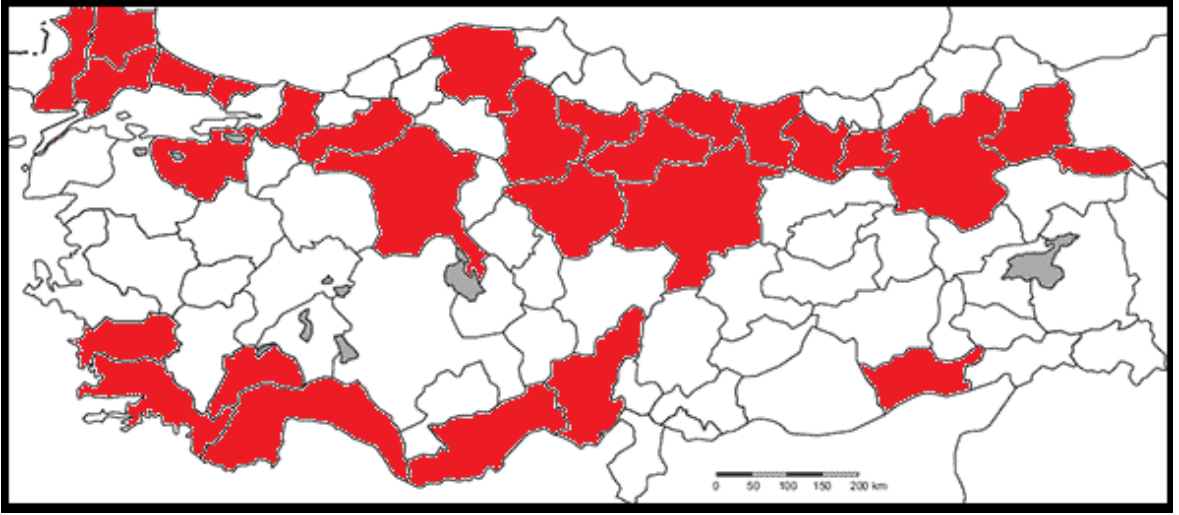
3.1. Arazi Çalışmaları

Kene örnekleme çalışmaları, Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerini kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekleme alanları belirlenirken; Sağlık Bakanlığı KKKA insidans verileri (Şekil 3.1), daha önce yapılan çalışmalar [61], [65] ve ekibimizin daha önceki yıllarda yapmış olduğu arazi çalışmalarından elde edilen veriler kullanılmıştır.

Arazi çalışmaları Türkiye'de 29 ilde ve KKTC'de toplam 70 lokalitede gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Çalışmalar, 2011-2015 yılları arasında, mart ve ekim ayları arasında gerçekleştirilmiştir. Ancak, mikrosatellit çalışmalarında kullanılmak üzere sadece 2015 yılına ait veriler kullanılmıştır. 2015 yılı arazi çalışmaları Marmara Bölgesi'nde Kırklareli, Tekirdağ, Edirne, İstanbul ve Çanakkale illerinde, Ege Bölgesi'nde Aydın ve Muğla'da, Akdeniz Bölgesi'nde Antalya, Burdur ve Mersin'de, İç Anadolu Bölgesi'nde Ankara, Çorum ve Çankırı'da, Karadeniz Bölgesi'nde Amasya, Tokat, Gümüşhane ve Bayburt'ta, Doğu Anadolu Bölgesi'nde Erzurum, Kars ve Iğdır'da, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Mardin'de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. İllere göre Kırım Kongo Kanamalı Ateşi 2014 yılı insidans verileri (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 1/100000)



Şekil 3.2. Tez dönemi boyunca kene örnekleme yapılan tüm lokaliteler

Keneleri örneklemede üç farklı yöntem kullanılmıştır:

- 1) Bayraklama/ Sürüklenme Yöntemi: Bu yöntemde, 1x1 metre boyutlarında beyaz amerikan bezi, 1,2 metre uzunluğunda plastik boruya sabitlenmiş ve 2 metre uzunluğunda ip borudan geçirilerek oluşturulan bayrak vejetasyonda sürüklenerek konak arayan keneler örneklenmiştir. Bayrağa tutunan keneler her 5 metrede kontrol edilmiş ve pens yardımıyla tüplere alınarak; istasyon adı, koordinat, sıcaklık ve nem değerleri kaydedilmiştir. Çalışma saatleri, kenelerin aktif olarak konak aradığı, sabah 08.00-10.00 ve akşam 16.00-18.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir [221], [222] (Şekil 3.3).
- 2) CO₂ gömülü tuzak yöntemi: Bu yöntemde tuzaklar, üzeri çift taraflı bant ile kaplanmış kontrplak zemin üzerine oturtulmuş soğutucudan oluşmaktadır. Soğutucuların yan taraflarında 0.5 cm çapında delikler açıldıktan sonra, içerilerine 1,5 kg ağırlığında, kuru buz eklenmektedir. Böylece kuru buzun süblimleşirken yaydığı CO₂ konak arayan keneleri cezbeder. Kuru buz gömülü tuzaklar, kene aktivitesinin yüksek olduğu sabah 08.00'da yerleştirilmiş ve aktivitenin minimal olduğu 20.00 civarında toplanmıştır. Banta tutunan keneler pens yardımıyla toplanmıştır [223] (Şekil 3.4).
- 3) Konak örnekleme *Hyalomma marginatum* çalışmalarında oldukça önemli bir yer tutmaktadır. *H. marginatum* avcı stratejiye sahip bir kene türü olmasından dolayı

vejetasyondan örnekleme yapmak oldukça zordur. Bu nedenle örnekleme, ağırlıklı olarak, koyun, keçi, sığır, inek gibi çiftlik hayvanlarından yapılmıştır (Şekil 3.5). Bu örnekleme yapılırken çiftlik hayvanlarının yakın zamanda o bölgeye satın alma vs. yolla taşınmadığı bilgisi hayvan sahiplerinden edinilmiştir.



Şekil 3.3. Kene örneklemesinde kullanılan bayraklama yöntemi



Şekil 3.4. CO₂ gömülü tuzak yöntemi ile örneklenen *Hyalomma marginatum*



Şekil 3.5. Konak üzerinden yapılan *Hyalomma* örneklemeleri

3.2. Tür Teşhisi Çalışmaları

Çalışmanın gerçekleştirildiği her lokaliteden bir popülasyonu temsil edecek şekilde 20-30 örnek toplanmıştır. Keneler, her örneklem alanından alındıktan sonra, tüp içerisine konularak, tüplerin üzerine kenelerin toplandığı yer, vejetasyon, yükseklik, koordinat bilgisi not edilmiştir. Örneklerin morfolojik tür tayini Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarında, stereomikroskop (Leica MZ-7,5 DC-300 dijital kamera sistemine sahip stereoskopik 200m diseksiyon mikroskobu) altında, teşhis anahtarları [52], [60], [84], [90], [224-226] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tür ve cinsiyetleri belirlenen örnekler popülasyonlar halinde ayrılarak 50 ml'lik tüplere konulmuş; -20°C'de ve %96 etil alkolde saklanmıştır. Mikrosatellit analizi için ayrılan örnekler -80 °C'de ve %96 etil alkolde muhafaza edilmiştir. Örnekleme yapılan lokaliteler, bazı ekolojik özellikleri ve örneklenen birey sayısı Çizelge 3.1'de detaylı bir şekilde verilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarında *H. marginatum* olarak olarak teşhis edilen örnekler, İspanya'da, Zaragoza Üniversitesi Parazitoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Prof. Agustín Estrada-Pena ile tekrar doğrulanmıştır. Yine Georgia Southern Üniversitesi'nde Prof. Dr. Lorenza Beati'nin sorumlusu olduğu Amerika Ulusal Kene Müzesi'ndeki örneklerle de karşılaştırıldıktan sonra popülasyon analizi çalışmalarına başlanmıştır.

Çizelge 3.1 Moleküler çalışmalarda kullanılan kene örneklerinin birey ve eşey sayısı, örnekleme yöntemi, örnekleme lokalitelerinin koordinat ve yükseklik bilgileri (Devamı)

Lokalite	Şehir	Tarih	<i>Hyalomma</i> sayısı	<i>H. marginatum</i> sayısı	dişi	erkek	Koordinat	Yükseklik	Metot
1	Kars	22-23.06.2015	5	3	3	0	40.464 °K; 43.335 °D	2303m	Konak/inek
2	Kars	22-23.06.2015	6	3	3	0	40.156°K; 43.659 °D	1001m	Konak/inek
3	Iğdır	22-23.06.2015	5	1	1	0	39.736°K; 44.153 °D	1738m	Konak/inek
4	Iğdır	22-23.06.2015	32	32	28	4	39.821 °K; 43.813 °D	1800m	Konak/inek
5	Mersin	14.06.2015	1	0	0	0	36.723°K; 33.869 °D	1410 m	Konak/koyun
6	Mersin	14.06.2015	1	0	0	0	36.515°K; 33.533 °D	106 m	Konak/keçi
7	Mersin	20.08.2015	1	0	0	0	36.648°K; 33.44 °D	314 m	Konak/keçi
8	Mersin	21.08.2015	11	0	0	0	36.625°K; 33.527 °D	660m	Konak/keçi
9	Mersin	21.08.2015	8	0	0	0	36.507°K; 33.549 °D	1270 m	Konak/keçi
10	Amasya	26.05.2015	12	9	5	4	40.789 °K; 35.677 °D	481 m	Konak/inek
11	Amasya	26.05.2015	23	23	11	12	40.956 °K; 35.883 °D	981 m	Konak/inek
12	Ordu	02.06.2015	1	1	0	1	40.977 °K; 37.982 °D	7m	Konak/inek
13	Gümüşhane	03.06.2015	5	5	1	4	40.377 °K; 39.809 °D	1627 m	Konak/koyun
14	Gümüşhane	04.06.2015	23	23	13	10	40.030°K; 39.514 °D	1554 m	Konak/dana
15	Bayburt	03.06.2015	101	101	73	28	40.355 °K; 39.909 °D	1752 m	Konak/inek
16	Bolu	12.05.2015	2	2	0	2	40.792 °K; 32.139°D	1285 m	Konak/inek
17	Mardin	20.05.2015	9	0	0	0	37.162 °K; 40.83 °D	589 m	Konak/inek
18	Mardin	20.05.2015	85	0	0	0	37.232 °K; 40.785 °D	579 m	Konak/koyun
19	Adapazarı	12.05.2015	16	16	8	8	40.777 °K; 30.622 °D	33 m	Konak/inek
20	Edirne	14.05.2015	5	5	2	3	41.617 °K; 26.849 °D	85 m	Konak/inek
21	İstanbul	12.05.2015	3	3	2	1	40.989 °K; 29.349 °D	105.2 m	Konak/dana
22	Çanakkale	15.05.2015	26	26	18	8	40.407 °K; 26.668 °D	216 m	Konak/inek

Çizelge 3.1 Moleküler çalışmalarda kullanılan kene örneklerinin birey ve eşey sayısı ve örnekleme yöntemi, örnekleme lokalitelerin koordinat ve yükseklik bilgileri (Devamı)

Lokalite	Şehir	Tarih	<i>Hyalomma</i> sayısı	<i>H. marginatum</i> sayısı	dişi	erkek	Koordinat	Yükseklik	Metot
23	Tekirdağ	30.07.2015	15	15	13	2	41.224 °K; 27.248 °D	130,8 m	Konak/inek
24	Kırklareli	30.07.2015	1	1	0	1	41.525 °K;27.124 °D	148 m	Konak/inek
25	Kırklareli	30.07.2015	14	14	5	9	41.743 °K; 27.417 °D	330 m	Konak/Sığır
26	Adana	15.06.2015	18	0	0	0	36.65 °K; 35.266°D	2 m	vegetasyon
27	Ankara	25.04.2015	25	23	10	13	40.357 °K; 32.681°D	1041 m	Konak/inek
28	Çankırı	09.05.2015	22	22	16	6	40.288°K; 33.949°D	649 m	Konak/inek
29	Çorum	26.05.2015	11	11	6	5	40.991 °K; 35.010 °D	568 m	Konak/inek
30	Çorum	26.05.2015	15	15	4	11	40.991 °K; 35.010 °D	568 m	Konak/koyun
31	Çorum	10.05.2015	11	11	6	5	40.274 °K; 34.008 °D	689 m	Konak/inek
32	Mugla	02.05.2015	36	36	23	13	37, 052 °K; 27,951 °D	349 m	Konak/inek
33	Mugla	02.05.2015	23	23	8	15	37, 065 °K; 27,959 °D	317 m	Konak/inek
34	Aydın	04.05.2015	13	13	11	2	37.845 °K; 27.874 °D	50 m	Konak/inek
35	Aydın	04.05.2015	11	11	5	6	37.791 °K; 27.940 °D	86 m	Konak/inek
36	Aydın	04.05.2015	7	7	2	5	37.788 °K; 27.944 °D	139 m	Konak/inek
37	Sivas	04.08.2014	13	13	11	2	39.145 °K; 37.389 °D	1584m	Konak/koyun
38	Sivas	04.08.2014	14	15	10	5	39.145 °K; 37.372 °D	1571m	Konak/inek
39	Sivas	03.08.2014	20	20	20	0	39.813 °K; 36.120 °D	1214m	Konak/inek
40	Yozgat	03.08.2014	15	15	10	5	39.754 °K; 35.971°D	1417m	Konak/inek
41	Dipkarpaz	09.08.2015	92	0	0	0	35.54 °K; 34.303°D	79 m	Konak/koyun
42	İskele	09.08.2015	82	0	0	0	35.424 °K; 33.907°D	68m	Konak/inek

3.3 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunu gerçekleştirmek için her lokaliteden 7-15 örnek seçilmiş ve toplam 164 bireyden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu tüm bireyi parçalamadan kenenin abdomeninin alt ucundan alınan küçük bir parça ile gerçekleştirilmiştir [209], [227]. Dolayısıyla morfoloji korunmuş olup, daha sonra teşhisleri tekrar kontrol etme imkanı vardır. DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Chatsworth, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.4. Mitokondriyal 12S rDNA Analizi

Mikrosatellit analizlerine başlamadan önce, Türkiye’deki *H. marginatum* örneklerin genel farklılık durumunu anlayabilmek için, populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan 12S rDNA gen bölgesi kullanılarak populasyonlar karşılaştırılmıştır. Bu amaçla her bölgeyi temsil edecek şekilde 2-3 örnek seçilmiş ve PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.2.’de ve PCR karışımı ve koşulları Çizelge 3.5’de verilmiştir. PCR aşamasının doğrulanması %1’lik agaroz jelin 0.5X’lik Tris Borat EDTA (TBE) tamponunda yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Pozitif PCR ürünlerinin temizlenmesi ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler sekanslama hizmeti için Eurofins firmasına gönderilmiştir. Sekanslar Sequencher 4.10.1(Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) programı kullanılarak incelendikten sonra; GenBank’tan temin edilen *Hyalomma* cinsine ait diğer verilerle beraber, MEGA6 programı kullanılarak Neighbor-joining (NJ) testi ile filogenetik ağaç çizilmiştir.

Çizelge 3.2. Mitokondriyal 12S rDNA primerleri, ileri ve geri sekansları

İsim	Bölge	Sekans (5' – 3')
T2A	12S rRNA	F: AATGAGAGCGACGGGCGATGT
T1B		R: AAAC TAGGATTAGATACCCT

3.5. Mikrosatellit Belirteçlerin Tanımlanması ve Primer Sekanslarının Dizayn Edilmesi

Yeni Nesil Sekanslama (YNS) son yıllarda mikrosatellit belirteçlerin dizayn edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem daha az laboratuara bağımlıdır ve geleneksel olarak kullanılan genomik kütüphane üretme ve tarama yöntemine göre daha ucuzdur. Günümüzde yararlanılan YNS yaklaşımları arasında, Illumina Genom Sekanslama, binlerce yüksek kalite kısa genomik okumayı daha etkili ve görece daha ucuz olarak üretir. Bu nedenlerle, belirteçlerimizi geliştirmek ve sekans okumaları elde etmek için Illumina MiSeq platformu kullanılmıştır. Vejetasyondan toplanan 7 *H. marginatum* örneği genomik fragment oluşturmak için kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bu örnekler seçilirken özellikle kan emmemiş olmasına dikkat edilmiş, böylece kan emmiş kenelerden olası bir konak DNA'sı karışma ihtimali ortadan kaldırılmıştır. Bu hizmet Mr DNA, Shallowater, TX firmasından alınmıştır. Elde edilen fragmentler, WebSat programı kullanılarak mikrosatellit tekrar bölgelerini bulmak üzere kullanılmıştır (<http://wsmartins.net/websat>; [228]). WebSat, mikrosatellit motifleri tespit eden ve her lokus için olası primerlerini belirleyen hızlı ve etkili bir online programdır. Program ayarları 2, 3 ve 4 nükleotitli motifleri en az sırasıyla 4, 4 ve 3 tekrar şeklinde araştırarak formatta ayarlanmıştır. Bu şekilde 42 primer seçilerek test edilmiştir. Bu primerlerin uzunlukları 14-24 baz çifti arasında değişmekte olup, guanin-sitozin içerikleri %41-67, erime sıcaklıkları 59-63 °C'dir (Çizelge 3.4). Amplikonların uzunluğu 119-143 baz çifti arasında değişmektedir. Primerler çalışmaya başlamadan önce 10pmol/μL olacak şekilde seyreltilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.3 Mikrosatellit pozitif lokus tespiti için analize gönderilen *Hyalomma marginatum* örneklerinin eşey, lokasyon, toplama tarihi ve örnekleme yöntemi bilgileri

Numara	Birey Kodu	Tür	Eşey	Metot	Lokasyon	Toplama tarihi
1	MUG14-15	<i>H. marginatum</i>	m	bayraklama	Mugla	2014
2	MUG14-145	<i>H. marginatum</i>	f	vejetasyon	Mugla	2014
3	KIZ14-29	<i>H. marginatum</i>	f	CO ₂ tuzak	Ankara	2014
4	KIZ14-30	<i>H. marginatum</i>	m	CO ₂ tuzak	Ankara	2014
5	GMS14021(1)	<i>H. marginatum</i>	m	Vejetasyon	Gümüşhane	2014
6	GMS14021(2)	<i>H. marginatum</i>	m	Vejetasyon	Gümüşhane	2014
7	AYAS 1	<i>H. marginatum</i>	m	Vejetasyon	Ankara	2015

Çizelge 3.4 . *Hyalomma marginatum* örneklerinde test edilen tüm primerlerin uzunluğu, ileri ve geri primerleri ve mikrosatellit motifleri

No	Primer Adı	Mikrosatellit	Uzunluk (bc)	İleri Primer (5' – 3')	Geri Primer (5' – 3')	Örneğin kodu
1	HYmL1	(TCC) ₅	202	AGGGTCTAAGGGGTGGAACC	ATCGGTTTATCTTTGGCCCG	GMS2
2	HYmL2	(CT) ₁₃	354	TTATTCGAGATCGGAAGGCG	CCATCTGCTGTCTTGTGCG	KIZ14-30
3	HYmL3	(CGG) ₅	330	AGTGAACCATGACGAGTGGG	AATCGGCATGGTAATCTGGG	MUG14-145
4	HYmL4	(GCA) ₄	220	GACAATCCGGTTCGATAAGGC	ATCCATCGGTGAACACCTGG	MUG14-145
5	HYmL5	(ATCT) ₄	226	ATTTGTCCTGTCGATGTGGC	TCATCATAGACCCTGCCAGC	MUG14-145
6	HYmL6	(ATG) ₅	188	GAATTCGTGGCGACTTCAGC	GGCTGCAGAAATTAGCGTCC	MUG14-15
7	HYmL7	(GAT) ₅	212	TGATGATGATGCGTTTGTGC	TCTGACCACGATCAGCAAGG	KIZ14-29
8	HYmL8	(AT) ₆	312	CAGTAAGCGTGCTCGTTTCG	CAAAACCTTCCTTCCCCTGC	MUG14-15
9	HYmL9	(AT) ₅	170	AGCTCACGTCTTCCCTTCG	AATTGCGCACTTTCCTTTGC	MUG14-15
10	HYmL10	(GA) ₅	205	CAGTGGTAGAACACAGGACTGC	ACACGCCAAACTAAAATGCTCT	MUG14-15
11	HYmL11	(GA) ₆	120	AGGGTGAGGAAATACCGAGAA	ATCTAACGGACAAACCGAGAAA	MUG14-15
12	HYmL12	(GAT) ₄	380	ATTCGTGGCGACTTCAGC	ACGGCCTTTCTCTCCTCTCTAT	MUG14-15
13	HYmL13	(TGC) ₄	154	ATTCGCACAAAAGTGACGC	ACTACAGGAACAACCTGAAGGGG	MUG14-15
14	HYmL14	(GCA) ₄	122	ACTACAGGAACAACCTGAAGGGG	CCCTCCCTCTCGCTTCTC	MUG14-15
15	HYmL15	(CT) ₆	221	TAGCCAAACTTCATCCCTGATT	CTCTTCCATCTGCTGTCTTGTG	KIZ14-29
16	HYmL16	(CAT) ₅	119	GTATAAGGTGGAGAGGCCACAG	GCTGCGTAAGACGAGTACAGTTT	KIZ14-29
17	HYmL17	(GAT) ₅	160	CGTTATTAGTCCGTGGATGGAT	GTATAAGGTGGAGAGGCCACAG	KIZ14-29
18	HYmL18	(AG) ₆	209	TGAACAAAGTGCAAGACACACA	CAAACCCATCATCATCGTTAGA	KIZ14-29
19	HYmL19	(TGC) ₄	254	CATCCTGATTGCTGAAAATGG	GATGTTCTACTTCACCTTCGGG	KIZ14-29
20	HYmL20	(CCG) ₄	256	TAGCCAAACTTCATCCCTGATT	TGAACAAAGTGCAAGACACACA	KIZ14-29
21	HYmL21	(CGA) ₄	160	CGTTATTAGTCCGTGGATGGAT	GTATAAGGTGGAGAGGCCACAG	KIZ14-29
22	HYmL22	(ACC) ₄	347	AATTCCTCTATGCTTCGTGAGC	GGCAAGAAAAGGACTGGTTGTA	KIZ14-29

Çizelge 3.4 (Devamı). *Hyalomma marginatum* örneklerinde test edilen tüm primerlerin uzunluğu, ileri ve geri primerleri, mikrosatellit motifleri ve izole edildiği örnek bilgileri

No	Primer Adı	Mikrosatellit	Uzunluk (bp)	İleri Primer (5' – 3')	Geri Primer (5' – 3')	Örneğin kodu
23	HYmL23	(AG) ₆	138	GGGTTATGAGTGTGGGTGAGTT	CTGAGCCTTCCACTACGGC	MUG14-15
24	HYmL24	(AT) ₆	124	AGCTCACGTCTTTACCTTCGAG	GTTACGCTGTAGACACCAACGA	MUG14-15
25	HYmL25	(ATTG) ₅	276	CGTGCCATTCATCTACAGCTAC	ACGGCCTTTCTCTCCTCTCTAT	MUG14-15
26	HYmL26	(ATG) ₅	333	ATTCGTGGCGACTTCAGC	TGGTAATGGTGATGATTGTGGT	MUG14-15
27	HYmL27	(CAT) ₅	169	ACGGCCTTTCTCTCCTCTCTAT	AGCCCTCCACTACGATGATG	MUG14-15
28	HYmL28	(ATG) ₅	213	ATTCGTGGCGACTTCAGC	CTTAATGAGAGCGAAACCAAGC	MUG14-15
29	HYmL29	(AC) ₆	327	AAAGCAGTCAGAGGTTTCGATCT	GAATATAAAGGCCACGGTTGA	MUG14-15
30	HYmL30	(CT) ₁₃	294	CCTACATACATACAGGCGACGA	GACACTTCCATCTGCTGTCTTG	MUG14-145
31	HYmL31	(GA) ₇	158	CTAGTGGTTATGGCACTCGGAC	CCCTTCCTTCCATTCTCCC	MUG14-145
32	HYmL32	(TCA) ₆	218	GTCTAGTGGTTATGGCACTCGG	TACTTGAGGCAAATGCAATGTC	MUG14-145
33	HYmL33	(ATC) ₅	144	GGACGACTAAATCTTTCAGGTAGC	AATTCTTCCGAGGCGAGAC	KIZ14-30
34	HYmL34	(GCG) ₅	317	CACCATAATTCCATGTCCTTCC	CTTTTCTGATTGCCGTCTTTG	KIZ14-30
35	HYmL35	(CA) ₈	190	TACGGAGGTGGGGCAGTA	CGACGAGATGGCTTGAAAA	GMS2
36	HYmL36	(TCC) ₅	184	TGGAACCCCTTACAAGTCATAGA	TGGCCCCGAAATCTTACTACAAC	GMS2
37	HYmL37	(AT) ₆	124	AGCTCACGTCTTTACCTTCGAG	GTTACGCTGTAGACACCAACGA	MUG14-145
38	HYmL38	(AT) ₁₁	338	ATTCATGGGATCTCTACGATGG	CACTCTTACATCTGCCGTCTTG	MUG14-145
39	HYmL39	(AT) ₇	126	AGCTCACGTCTTTACCTTCGAG	GTTACGCTGTAGACACCAACGA	MUG14-15
40	HYmL40	(AC) ₆	312	GTCAGAGGTTTCGATCTGGCTAA	GACCACGTTTTTCATTCACTGCT	MUG14-15
41	HYmL41	(TCA) ₅	176	CTAGTGGTTATGGCACTCGGAC	TACCAAATCTTACTCCCTCCCC	MUG14-15
42	HYmL42	(AT) ₁₁	343	GAACAAAAGGGATAAGAAACCG	CTGATGAGAAGGAAACATGGTC	MUG14-145

3.6. PCR Aşaması

PCR çalışmalarının ilk basamağında, primerlerin çalışabilirliğini test etmek amacıyla, tüm lokalitelerden 1-2 µL DNA ile oluşturulan DNA karışımı ile PCR yapılmıştır. PCR koşullarını optimize etmek için dereceli testler yapılmıştır. Son PCR koşulları ve PCR karışım içeriği Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentlerini görüntülemeye kullanılmıştır. 8 µL PCR ürünü ve 2 µL turuncu 5X yükleme materyali; %2 Nusieve düşük erime sıcaklıklı agarozla oluşturulmuş 0.5X Lityum borat tampon içerisinde, 45 dakika 300 voltta yürütülmüştür. PCR ürünü boyutları Generuler 50 baz çiftlik DNA Ladder kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.7. Genotiplendirme ve Mikrosatellit Belirteçlerin Karakterizasyonu

Bu aşama için tüm lokalitelerden her bir lokus için toplam 106 örnek seçilmiştir (Çizelge 3.6). Örnekler hazırlanırken amplikonların agaroz jelde gösterdikleri bantların gücü dikkate alınmıştır. Zayıf bant gösteren örneklerde 2.5-3 µL PCR ürünü kullanılırken, güçlü bant gösteren örneklerde 1-1.5 µL'lik PCR ürünü kullanılmıştır. Örnekler kapillari elektroforezle genotiplendirme yapılması için Eurofins firmasına gönderilmiştir.

Genotiplendirme sonuçları, Genemarker V2.4.0 kullanılarak DNA bantlarının pik değerleri not edilmiştir (SoftGenetics, LLC, State College, PA). Böylece her bir primer çiftinin ürettiği aleller ve alel fragment uzunlukları her bir örnek için belirlenmiştir. Data, CREATE V1.37 programı kullanılarak pek çok populasyon genetiği programı için kullanılacak uygun formata çevrilmiştir [229].

Gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e), kendileşme katsayısı (F_{is}) ve alel sayısı FSTAT V2.9.3.2 programı kullanılarak hesaplanmıştır [124]. Bağlantı eşitsizliği de yine bu program kullanılarak kaydedilmiştir.

3.8. Populasyonlar Arası Genetik Farklılıkların Araştırılması

Populasyonlardaki genetik farklılaşmayı araştırmak üzere, 10 populasyondan 6-16 birey seçilmiştir. Bu populasyonlardan ikisi Trakya Bölgesi, üçü İç Anadolu Bölgesi, ikisi Ege Bölgesi, ikisi Kuzey Anadolu Bölgesi ve biri Doğu Anadolu Bölgesindedir.

Populasyonların 2014 yılı KKKA insidans oranı 31.1 ile 0.22 arasında değişmektedir (Çizelge 3.1). Populasyonlar arasındaki mesafe 130 ile 1730 km arasındadır. Wright'ın F-istatistiği kullanılarak genetik çeşitliliğin populasyonlar arasındaki dağılımı ve Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı belirlenmiştir [230].

3.9. Populasyon Yapısı Analizleri (STRUCTURE)

Populasyon yapısı STRUCTURE 2.3.4 programı kullanılarak analiz edilmiştir [129]. STRUCTURE, Bayesian kümeleme yaklaşımına dayanmakta olup, veri setini K sayıda ayrı genetik kümeye bölerek analiz eder. Bu çalışmada genetik kümelenmeyi ortaya çıkarmada karışım (admixture) modeli seçilmiştir. Bu model, alt populasyonlardaki her bireyin, genomunun bazı bölümlerini her bir K populasyonundaki farklı atadan aldığını varsayar yani bireyler atasal olarak karışıktır. Alel frekansını değerlendirmede kullanılan İlişkili Alel Sıklığı Modeli (Correlated Allele Frequency Model) ise örnekteki her bir K populasyonun yaygın atasal populasyon tarafından sürüklenmeye maruz kaldığını ve bu sürüklenme oranının farklı efektif populasyon büyüklüğüne bağlı olarak populasyonlar arasında değişkenlik gösterdiğini ifade eder [130]. Bu nedenle, yakın ilişkili populasyonların oldukça benzer alel sıklığı göstermesi beklenir [129], [231]. Analizler için küme sayısı K=1 ile K=6 arasında ayarlanmıştır. Her K değeri için 10 yürütme, 1000000 tekrarlı ön tarama ve 1000000 Monte Carlo Markov Zinciri tekrarı ile gerçekleştirilmiştir. STRUCTURE'dan elde edilen veri STRUCTURE HARVESTER'da değerlendirilmiştir [232]. Bu çevrimiçi program Evanno metodunu uygulamaktadır [233]. STRUCTURE HARVESTER çıktıları CLUMPP (Cluster Matching and Permutation Program) [234] ile düzenlenerek, STRUCTURE'da elde edilen çok sayıda matris tek bir özet matrise indirgenmiştir. CLUMPP sonuçları DISTRUCT'da [235] grafik haline dönüştürülmüştür.

Çizelge 3.5. Mikrosatellit ve 12S rDNA PCR karışımı ve reaksiyon koşulları

	12S rDNA	Mikrosatellit Lokus		
PCR Karışımı	(5 Prime)	(Invitrogen)		
	H ₂ O	10.3 µL	H ₂ O	14.25 µL
	Taq tamponu (10x)	2.5 µL	Taq buffer (10x)	2.5 µL
	Taq güçlendirici	5 µL	MgSO ₄ (50 mM)	1.5 µL
	MgCl ₂	1.5 µL	İleri primer (10 pmol/ µL)	0.5 µL
	Primer T2A(10 pmol/ µL)	1.25 µL	Geri primer (10 pmol/ µL)	0.5 µL
	Primer T1B2 (10 pmol/ µL)	1.25 µL	dNTPs (10 mM)	0.5 µL
	dNTPs	0.5 µL	Taq DNA plus (5U/ µL)	0.25 µL
	Taq DNA polimeraz	0.2 µL	DNA örneği	5 µL
	DNA örneği	2.5 µL	Toplam	25 µL
	Toplam	25 µL		
PCR Reaksiyon Koşulları	94°C →5 dk (ön denaturasyon)	94°C →5 dk (ön denaturasyon)		
	94°C →20 sn (denatürasyon)	94°C →20 sn (denaturasyon)		
	56 °C -1 °C / 25 sn → 5döngü (bağlanma)	58°C →-1.5°/ 30 sn, 6 döngü (bağlanma)		
	70 °C →30 sn (uzama)	70°C →30 saniye (uzama)		
	35 döngü	35 döngü		
	94°C →20 saniye (denaturasyon)	94°C →20 saniye (denaturasyon)		
	50°C →25 saniye (bağlanma)	49°C →40 saniye (bağlanma)		
	70°C →30 saniye (uzama)	68°C →30 saniye (uzama)		
	70°C → 5 dakika (son uzama)	68°C →5 dakika (son uzama)		
	4°C (muhafaza)	4°C (muhafaza)		

Çizelge 3.6. Genotipleme aşamasında kullanılan *Hyalomma marginatum* populasyonlarının birey sayısı, koordinat, yükseklik, örnekleme yöntemi ve 2014 yılı Kırım Kongo Kanamalı Ateşi insidans verileri

Populasyon	Pop-Kodu	Örnek sayısı	Lokalite	Toplama tarihi	Koordinat	Yükseklik	Konak	KKKA insidansı (2014)
Kuzey	GÜM-POP2	16	Kelkit/ Gümüşhane	04.06.2015	40.030°K; 39.514 °D	1554 m	inek	31,11
Kuzey	BAY-POP2	7	Balkaynak Köyü/Bayburt	03.06.2015	40.355 °K; 39.909 °D	1752 m	inek	30,42
Batı	MUG-POP1	14	Ören/Mugla	02.05.2015	37.052 °K; 27.951 °D	349 m	inek	0,35
Batı	AYD-POP2	12	Şahnalı Köyü/Aydın	04.05.2015	37.791 °K; 27.940 °D	86 m	inek	1,18
Orta	ÇAN-POP	9	Hallaçlı Köyü/Çankırı	09.05.2015	40.288°K; 33.949°D	649 m	inek	5,24
Orta	COR-POP2	10	Osmancık/ Çorum	26.05.2015	40.991 °K; 35.01 °D	568 m	Koyun/inek	14,66
Orta	ANK-POP1	6	Y.Karaören KöyüAnkara	02.05.2015	40, 357 °K; 32, 681°D	1041 m	inek	0,22
Doğu	IGD-POP	16	Taşlıca Köyü/ Iğdır	23.07.2015	39.821 °K; 43.813 °D	1800 m	inek	0,53
Trakya	KIRK-POP	7	Kırklareli	30.07.2015	41.743 °K; 27.417 °D	330,8 m	inek	1,47
Trakya	TEK-POP	9	Hayrabolu/Tekirdağ	30.07.2015	41.224 °K; 27.248 °D	130,8 m	inek	0,25

4. BULGULAR

4.1. Arazi ve Teşhis Çalışmaları

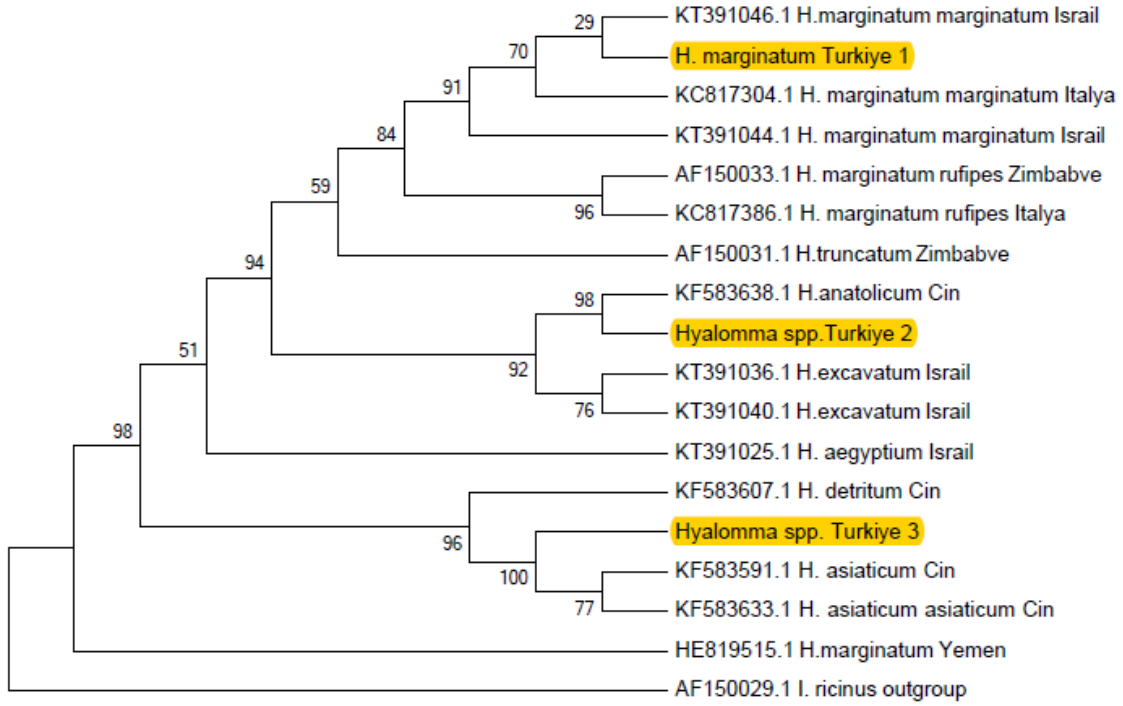
Bu çalışma kapsamında Türkiye'deki 29 ile ait 70 lokalitede arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan 70 lokalitenin 37'sinde *H. marginatum* bireyleri örneklenmiştir. Çalışmada *Hyalomma* cinsine ait 734 birey örneklenmiş olup bunların 621'i *H. marginatum* olarak tiplendirilmiştir (Çizelge 3.1). Örneklerin hepsi ergindir. Çalışma planlanırken de tahmin edildiği üzere en başarılı örnekleme yöntemi konak üzerinden örnekleme olmuştur. CO₂ gömülü tuzak yöntemi ile beklenen başarı elde edilememiştir.

Arazi çalışmaları esnasında bazı lokalitelerde *H. marginatum* bulunamamıştır. Bu durumda ya aynı bölgedeki başka bir lokalite seçilmiş ve ileri tarihte tekrar örnekleme yapılmıştır ya da bazı lokaliteler tekrar edilememiş o yüzden yanıltıcı veri olmaması nedeniyle, çalışma sonuçlarından çıkarılmıştır.

4.2. Mitokondriyal 12S rDNA Sonuçları

Bu analiz sonuçlarına göre, Mardin, Mersin ve KKTC örnekleri dışındaki lokalitelere ait tüm örneklerin sekansları özdeştir. Bu sonuçlar morfolojik verileri de doğrulamıştır. Daha önce *H. excavatum*, *H. anatolicum* ve *H. scupense* olarak teşhis edilen bu 3 lokaliteye ait örnekler popülasyon analizi çalışmalarına dahil edilmemiştir. Çalışmada elde edilen sekanslarla çizilen NJ ağacına göre, Türkiye *H. marginatum* sekansı İsrail ve İtalya'ya ait örneklerle ait sekanslarla yakından ilişkilidir. *Hyalomma excavatum* olarak teşhis edilen ve ağaçta "*Hyalomma spp.*Türkiye 2" olarak kodlanan Akdeniz ve Kıbrıs örnekleri, İsrail *H. excavatum* ve Çin *H. anatolicum* sekansları ile ilişkilendirilmiştir. Mardin'den toplanan ve ağaçta "*Hyalomma spp.*Türkiye 3" olarak kodlanan örnekler ise *Hyalomma asiaticum* Çin örnekleri ile gruplanmıştır (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1.Mitokondriyal 12S analizi sonucu elde edilen Hyalomma cinsine ait sekansların Genbank'tan elde edilen Hyalomma sekansları ile birlikte oluşturulan NJ filogenetik ağacı



4.3. Mikrosatellit Belirteçlerin Dizayn edilmesi ve Karakterizasyonu

Test edilen 42 primerin 35'i zayıf bantlara sahip olduğu için ya da belirgin bir bant göstermediklerinden dolayı çalışmada kullanılmamıştır. Geriye kalan 7 mikrosatellit belirtecin geri primerleri için çalışmanın bir sonraki aşamasında kullanılmak üzere 6FAM, NED, PET ve VIC florasan boyalarla işaretlenmiş primerler kullanılmıştır. (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). GeneMarker programı kullanılarak elde edilen genotiplendirme sonuçlarının sayısal değerleri Çizelge 4.2.'de, yedi belirtecin karakteristiğine dair özellikler Çizelge 4.3'de verilmiştir. Locus başına alel sayısı 2 ile 16 arasında değişmektedir (ortalama=8.42). He değeri 0.479 ve 0.76 arasında değişmektedir. Yedi lokusun altısında Ho değerleri (ortalama 0.76) He değerlerinden daha yüksektir. Lokuslarda bağlantı eşitsizliğine rastlanmamıştır. Fis değerleri 6 lokus için -0.143 ile -0.65 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.2. Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri

Numarası	Populasyon	Örnek	Lokus24	Lokus24	Lokus 27	Lokus27	Lokus33	Lokus33	Lokus40	Lokus40	Lokus41	Lokus41	Lokus1	Lokus1	Lokus5	Lokus5
1	Ankara	ANK_4	114	116	143	167	144	159	312	340	126	174	293	299	211	211
2	Ankara	ANK_5	116	118	143	167	144	159	312	340	126	126	293	299	179	211
3	Ankara	ANK_6	116	120	140	167	144	144	312	340	126	180	293	299	211	287
4	Ankara	ANK_7	116	118	143	173	144	144	312	340	126	180	287	299	179	211
5	Ankara	ANK_8	118	120	140	143	138	150	312	340	126	180	293	299	179	211
6	Ankara	ANK_9	116	122	140	167	144	159	0	0	126	126	293	299	179	211
7	Çankırı	CAN13	116	120	140	143	138	159	312	340	0	0	0	0	0	0
8	Çankırı	CAN14	116	120	143	167	0	0	312	340	126	126	293	299	211	239
9	Çankırı	CAN15	118	120	143	167	144	159	312	340	126	180	299	299	211	239
10	Çankırı	CAN16	114	118	140	143	0	0	312	340	126	201	0	0	239	239
11	Çankırı	CAN17	116	118	143	167	138	159	312	340	126	180	0	0	211	239
12	Çankırı	CAN3	114	120	143	167	0	0	312	340	126	126	293	299	211	239
13	Çankırı	CAN4	116	118	140	143	138	159	312	312	0	0	0	0	0	0
14	Çankırı	CAN5	116	120	140	143	138	159	312	340	0	0	0	0	0	0
15	Çankırı	CAN6	116	120	140	143	138	144	312	340	126	180	0	0	0	0
16	Çorum	COR10	114	118	140	149	156	210	312	340	126	201	293	293	167	239
17	Çorum	COR11	118	122	140	167	0	0	312	312	126	180	287	299	169	239
18	Çorum	COR12	116	120	134	143	138	150	312	312	126	201	293	299	211	239
19	Çorum	COR13	114	118	140	143	138	156	312	340	126	201	299	299	239	239
20	Çorum	COR18	116	122	140	149	0	0	312	340	147	147	299	299	167	167
21	Çorum	COR19	116	118	140	143	144	156	312	340	126	126	299	299	167	167
22	Çorum	COR5	120	118	140	143	141	156	312	312	0	0	0	0	207	223
23	Çorum	COR6	118	122	140	140	141	210	312	312	147	147	299	299	211	239
24	Çorum	COR7	116	122	137	140	141	144	0	0	147	147	0	0	211	239
25	Çorum	COR8	116	122	140	143	138	210	312	312	147	147	0	0	167	231

Çizelge 4.2 (Devamı) Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri

Numarası	Populasyon	Örnek	Lokus24	Lokus24	Lokus 27	Lokus27	Lokus33	Lokus33	Lokus40	Lokus40	Lokus41	Lokus41	Lokus1	Lokus1	Lokus5	Lokus5
26	Aydın	AYD_10	118	120	140	167	138	150	312	312	126	180	293	299	179	211
27	Aydın	AYD_11	116	120	140	167	144	150	312	312	126	126	293	293	211	271
28	Aydın	AYD_12	118	120	143	167	141	144	312	340	126	126	293	299	211	211
29	Aydın	AYD_13	114	118	143	167	144	144	312	340	126	126	299	299	179	211
30	Aydın	AYD_14	116	120	134	143	144	150	312	340	126	174	293	293	211	235
31	Aydın	AYD_15	114	120	140	143	138	144	312	340	126	174	0	0	179	211
32	Aydın	AYD_16	116	118	143	167	141	150	312	340	126	180	0	0	0	0
33	Aydın	AYD_17	118	120	140	167	144	144	312	340	96	126	0	0	179	211
34	Aydın	AYD_18	112	116	140	143	0	0	312	312	126	126	293	293	0	0
35	Aydın	AYD_19	116	120	140	167	144	150	312	340	126	126	299	299	179	239
36	Aydın	AYD_8	118	120	134	167	144	150	312	340	126	180	293	299	211	239
37	Aydın	AYD_9	114	120	140	155	141	144	312	340	126	174	293	299	211	239
38	Muğla	MUG10	116	118	140	143	144	150	312	340	126	174	0	0	0	0
39	Muğla	MUG11	116	120	140	143	138	144	312	312	126	174	0	0	0	0
40	Muğla	MUG12	116	120	140	167	144	144	312	340	126	174	293	293	187	211
41	Muğla	MUG13	116	118	140	143	144	144	312	340	126	201	293	299	211	211
42	Muğla	MUG14	116	120	140	143	141	141	312	340	126	180	293	293	179	211
43	Muğla	MUG15	118	120	134	143	144	150	312	340	126	174	287	293	211	231
44	Muğla	MUG17	116	120	143	167	144	144	312	340	126	174	293	293	179	211
45	Muğla	MUG18	116	120	140	143	141	144	312	340	126	180	293	293	203	239
46	Muğla	MUG19	118	120	143	167	144	159	312	340	126	126	293	293	211	211
47	Muğla	MUG20	116	118	140	143	144	159	312	340	126	201	293	299	211	211
48	Muğla	MUG21	114	120	134	143	141	144	312	340	126	174	293	293	211	211
49	Muğla	MUG22	114	118	140	167	144	159	312	340	126	174	293	302	0	0
50	Muğla	MUG23	116	118	140	143	144	159	312	340	126	180	293	293	211	243

Çizelge 4.2 (Devamı) Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri

Numarası	Populasyon	Örnek	Lokus24	Lokus24	Lokus 27	Lokus27	Lokus33	Lokus33	Lokus40	Lokus40	Lokus41	Lokus41	Lokus1	Lokus1	Lokus5	Lokus5
51	Muğla	MUG9	118	118	143	146	144	150	312	340	126	201	0	0	0	0
52	Bayburt	BAY_10	114	120	140	143	138	144	312	340	126	126	0	0	179	211
53	Bayburt	BAY_11	114	120	140	143	138	144	312	340	126	174	0	0	179	211
54	Bayburt	BAY_18	116	120	143	167	138	144	312	340	0	0	293	293	179	211
55	Bayburt	BAY_19	116	118	143	167	144	144	312	312	0	0	293	293	179	211
56	Bayburt	BAY_20	116	118	143	167	150	159	312	312	111	126	293	299	179	211
57	Bayburt	BAY_21	114	120	140	143	144	144	312	340	126	174	293	299	179	211
58	Bayburt	BAY_22	116	118	0	0	144	144	312	340	0	0	293	293	179	211
59	Gümüşhane	GUM10	114	118	143	167	138	159	312	312	111	126	0	0	0	0
60	Gümüşhane	GUM11	114	118	134	143	138	159	312	340	126	126	293	299	211	239
61	Gümüşhane	GUM12	116	118	140	143	138	144	312	340	111	126	0	0	0	0
62	Gümüşhane	GUM13	114	118	140	143	138	159	312	340	126	180	302	302	179	211
63	Gümüşhane	GUM14	114	120	140	143	138	159	312	340	126	126	293	311	179	211
64	Gümüşhane	GUM15	118	118	140	143	138	159	312	340	126	180	293	299	0	0
65	Gümüşhane	GUM16	118	120	140	143	138	144	312	312	126	126	0	0	199	239
66	Gümüşhane	GUM17	116	120	134	143	144	153	312	312	0	0	299	299	211	211
67	Gümüşhane	GUM18	118	120	143	167	144	159	312	312	126	180	287	287	179	211
68	Gümüşhane	GUM19	116	120	143	167	144	150	312	312	126	180	299	299	179	207
69	Gümüşhane	GUM20	116	118	134	143	144	150	312	340	126	126	299	299	199	211
70	Gümüşhane	GUM21	116	118	140	143	144	144	312	340	126	126	293	299	179	211
71	Gümüşhane	GUM22	116	118	140	143	144	153	312	340	126	126	299	302	211	211
72	Gümüşhane	GUM23	114	120	140	167	138	144	312	340	126	180	299	299	179	211
73	Gümüşhane	GUM6	116	116	143	167	138	159	312	340	126	180	299	299	179	211
74	Gümüşhane	GUM9	116	118	140	143	138	144	312	340	126	180	293	299	203	211
75	Iğdır	IGD10	116	120	143	167	144	153	312	340	126	180	293	299	211	211

Çizelge 4.2 (Devamı) Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri

Numarası	Populasyon	Örnek	Lokus24	Lokus24	Lokus 27	Lokus27	Lokus33	Lokus33	Lokus40	Lokus40	Lokus41	Lokus41	Lokus1	Lokus1	Lokus5	Lokus5
76	Iğdır	IGD11	116	118	155	170	144	144	312	340	126	126	293	293	211	239
77	Iğdır	IGD12	114	120	140	167	144	144	312	340	126	180	293	293	211	211
78	Iğdır	IGD13	116	118	143	167	144	144	312	340	126	126	293	302	0	0
79	Iğdır	IGD14	114	120	143	167	144	144	312	312	126	126	293	293	211	211
80	Iğdır	IGD15	114	120	143	167	144	159	312	340	126	180	293	299	211	211
81	Iğdır	IGD16	114	118	134	167	138	144	312	340	126	180	293	293	211	239
82	Iğdır	IGD17	118	120	140	167	144	159	312	312	126	180	293	293	211	239
83	Iğdır	IGD18	116	120	140	167	138	150	312	340	126	126	293	293	211	211
84	Iğdır	IGD19	116	120	143	167	144	159	312	312	126	180	293	293	211	239
85	Iğdır	IGD20	118	120	143	167	138	150	312	340	126	180	293	293	211	211
86	Iğdır	IGD21	0	0	143	167	144	144	312	312	0	0	293	293	211	211
87	Iğdır	IGD6	118	122	134	140	162	165	312	312	0	0	287	296	0	0
88	Iğdır	IGD7	122	122	134	140	159	165	312	312	0	0	293	293	211	239
89	Iğdır	IGD8	116	120	140	167	144	159	312	312	126	126	0	0	211	239
90	Iğdır	IGD9	116	120	140	167	138	138	312	312	0	0	0	0	0	0
91	Kırklareli	KIRK10	118	120	134	143	144	159	312	340	126	126	293	299	203	211
92	Kırklareli	KIRK11	118	120	140	143	141	159	312	340	126	180	293	293	211	211
93	Kırklareli	KIRK12	116	118	143	167	138	144	312	340	126	126	293	299	0	0
94	Kırklareli	KIRK13	114	118	140	143	144	159	312	340	126	180	293	293	211	211
95	Kırklareli	KIRK14	114	114	140	143	144	159	312	340	126	180	293	293	211	211
96	Kırklareli	KIRK6	116	120	140	167	141	159	312	340	126	126	293	293	203	211
97	Kırklareli	KIRK7	116	118	134	140	144	159	312	340	126	180	293	293	211	211
98	Tekirdağ	TEK10	118	118	140	143	141	150	312	340	126	201	0	0	211	267
99	Tekirdağ	TEK11	120	120	143	167	135	156	312	340	96	126	0	0	211	211
100	Tekirdağ	TEK12	116	120	143	167	144	162	312	340	126	201	0	0	211	211

Çizelge 4.2 (Devamı) Genotiplendirme sonucu her bir lokusa ait örneklerin alel fragment uzunluk değerleri

Numarası	Populasyon	Örnek	Lokus24	Lokus24	Lokus 27	Lokus27	Lokus33	Lokus33	Lokus40	Lokus40	Lokus41	Lokus41	Lokus1	Lokus1	Lokus5	Lokus5
101	Tekirdağ	TEK14	116	120	140	143	144	177	312	340	126	126	0	0	211	211
102	Tekirdağ	TEK15	116	120	143	167	144	159	312	340	126	126	0	0	211	211
103	Tekirdağ	TEK6	114	118	140	143	144	156	312	340	126	180	0	0	211	239
104	Tekirdağ	TEK7	112	118	143	167	144	159	312	340	126	180	0	0	179	211
105	Tekirdağ	TEK8	118	118	143	167	144	144	312	340	126	126	0	0	211	271
106	Tekirdağ	TEK9	116	118	134	167	138	150	312	340	126	126	0	0	211	211

4.4. Populasyonlar Arası Genetik Farklılık Analizleri

F_{ST} sonuçları değerlendirilirken 0-0.05 aralığındaki değerler, alt populasyonlar arasındaki genetik farklılık düşük, 0.05-0.15 aralığındaki değerler, alt populasyonlar arasındaki farklılaşma orta, 0.15-0.25 aralığındaki değerler alt populasyonlar arasındaki farklılaşma yüksek ve 0.25'in üstündeki değerler alt populasyonlar arasındaki farklılaşma çok yüksek olarak değerlendirilmiştir [122]. En farklı populasyon, İç Anadolu Bölgesi'nde Çorum ili olarak tespit edilmiştir. Populasyonların karşılaştırılması sonucunda da, KKKA insidansının yüksek olduğu alanların düşük olduğu alanlardan genetik olarak belirgin bir farklılık göstermediği görülmüştür. En belirgin farklılık Çorum ve Kırklareli populasyonları arasında ölçülmüştür ($F_{ST} = 0.194$). Çorum populasyonu Iğdır populasyonu ($F_{ST} = 0.193$) ve Muğla populasyonu ile de belirgin farklılık ($F_{ST} = 0.173$) göstermiştir (Çizelge 4.4). Çankırı populasyonu da diğer populasyonlardan orta seviyede farklılık göstermiştir.

4.5. Populasyon Yapısı Analizleri

STRUCTURE bireylerin paylaştığı ataların populasyonlarını, lokasyon bilgisini gözönünde bulundurmadan sadece genetik veri temelinde değerlendirir. Bu program kullanılarak gerçekleştirilen bütün simülasyonlar verinin iki kümede toplandığını göstermiştir. Birbirini izleyen K değerlerinin veriyi açıklama olasılıkları arasındaki farkı veren ΔK değeri, en yüksek değerine ($\Delta K = 24.73$) $K=2$ 'de ulaşmıştır (Şekil 4.1). Daha yüksek K değerleri için ΔK değeri 0.9 ile 8.6 arasında değişmektedir. Bu da analiz edilen 10 populasyona ait 106 bireyin 2 kümeye ayrıldığını göstermektedir. Sonuçlar tüm bireylerin iki kümeye de ait genotipleri taşıdıklarını göstermiştir. Çorum populasyonunda kırmızı ile betimlenen genotip daha yaygın iken, diğer tüm populasyonlarda mavi ile betimlenen genotip daha yaygındır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.3. Mikrosatellit analizlerinde kullanılan yedi polimorfik lokusun karakteristik özellikleri

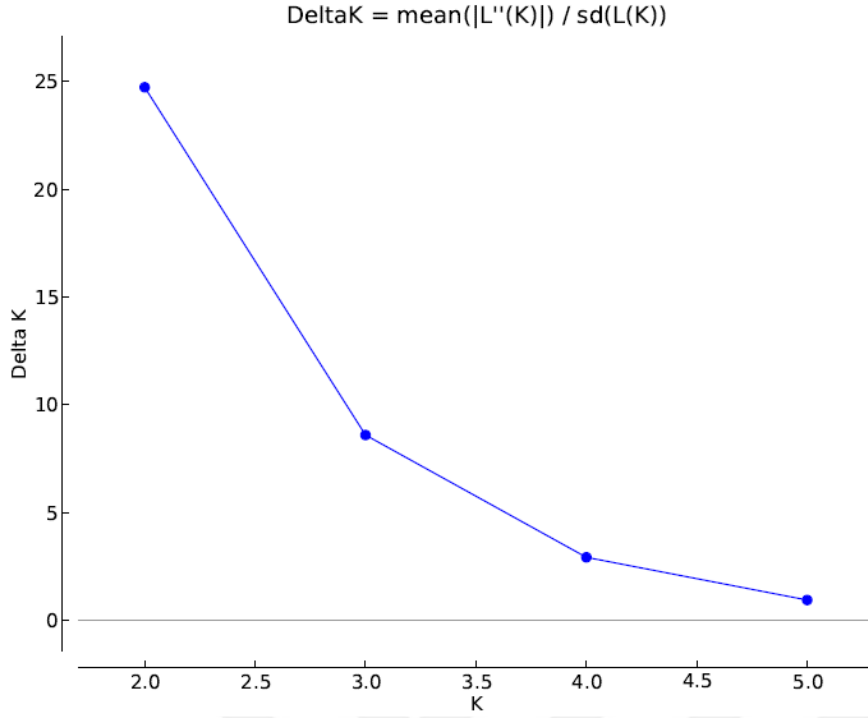
Lokus	Tekrar motifi	Uzunluk aralığı (bp)	İleri primer (5' – 3')	Geri primer (5' – 3')	Ta (°C)	Ho	He	Na	Boya	Fis
HymL1	(TCC)5	287-311	AGGGTCTAAGGGGTGGAACC	ATCGGTTTATCTTTGGCCCG	63	0.466	0,55	6	6FAM	0,046
HymL5	(ATCT)4	167-287	ATTTGTCCTGTCGATGTGGC	TCATCATAGACCCTGCCAGC	61	0.692	0,63	16	6FAM	-0,24
HymL24	(AT)6	112-122	AGCTCACGTCTTTACCTTCGAG	GTTACGCTGTAGACACCAACGA	60	0.926	0,76	6	6FAM	-0,21
HymL27	(CAT)5	134-173	ACGGCCTTTCTCTCCTCTCTAT	AGCCCTCCACTACGATGATG	60	0.990	0,72	10	6FAM	-0,41
HymL33	(ATC)5	135-210	GGACGACTAAATCTTTCAGGTAGC	AATTCTTCCGAGGCGAGAC	59	0.822	0,76	12	PET	-0,14
HymL40	(AC)6	312-340	GTCAGAGGTTTCGATCTGGCTAA	GACCACGTTTTCATTCAGTCTGCT	61	0.791	0,48	2	6FAM	-0,65
HymL41	(TCA)5	96-201	CTAGTGGTTATGGCACTCGGAC	TACCAAATCTTACTCCCTCCCC	61	0.635	0,56	7	VIC	-0,24

Ta= Primer bağlanma sıcaklığı, Na=Alel sayısı, Ho=Gözlenen heterozigotluk, He= Beklenen heterozigotluk, Fis= kendileşme katsayısı

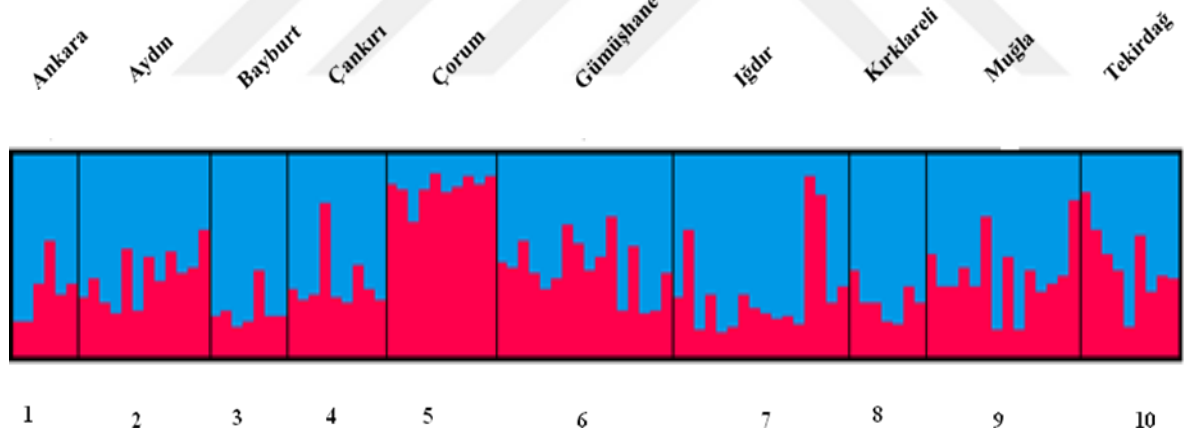
Çizelge4.4 *Hyalomma marginatum* populasyonlarının F_{ST} değerlerine göre karşılaştırılması

FST	Ankara	Aydın	Bayburt	Çankırı	Çorum	Gümüşhane	Iğdır	Kırklareli	Muğla	Tekirdağ
Ankara	0									
Aydın	-0.0009	0								
Bayburt	0.0208	0.0105	0							
Çankırı	0.0685	0.0685	0.1372	0						
Çorum	0.122	0.1123	0.1686	0.0819	0					
Gümüşhane	0.0025	0.0314	0.0597	0.022	0.093	0				
Iğdır	0.0569	0.0374	0.0532	0.1184	0.1933	0.0993	0			
Kırklareli	0.0517	0.0604	0.0718	0.1253	0.1946	0.0824	0.0275	0		
Mugla	0.0341	0.0285	0.0105	0.1267	0.1735	0.0862	0.0364	0.0137	0	
Tekirdağ	0.0013	0.0124	0.04	0.0732	0.1379	0.0225	0.0196	0.0047	0.0054	0

■ orta seviyede genetik farklılık, ■ yüksek seviyede genetik farklılık



Şekil 4.1 STRUCTURE analizine göre K ve Delta K değerleri arasındaki ilişki



Şekil 4.2 STRUCTURE analizine göre tüm populasyonların bireylerinin K=2'ye göre farklı kümelere ait olma olasılıkları

5. TARTIŞMA

5.1. *Hyalomma marginatum*'un Türkiye'deki Dağılımının Değerlendirilmesi

Hyalomma marginatum, Koch 1844, Kuzey Afrika, Asya, Doğu ve Güney Avrupa ve Asya'da yayılım gösteren Afrika kökenli bir kene türüdür [36]. Türkiye'de *H. marginatum* tarafından transfer edilen KKKA, ülkemizin iç ve kuzeydoğu bölgelerinde halk sağlığını tehdit eden ve can kayıplarına neden olan önemli hastalıklardan birisidir. T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2002-2015 yılları arasında 9787 hastaya KKKA teşhisi konmuş, bu vakaların 469'ı ölümlerle sonuçlanmıştır. [43]-[45]. Hastalık halk sağlığını bu kadar ciddi boyutta tehdit ederken, hastalığın vektörü olan *H. marginatum*'un populasyon yapısına ait bilgilerimiz oldukça kısıtlı olup populasyonları arası ilişkiler ve etkileşimler bilinmemektedir. Hastalığın neden belirli bölgelerde yoğunlaştığına dair bilgiler yetersizdir. Dolayısıyla KKKA hastalığı ile ilgili uygun kontrol stratejileri geliştirmek için öncelikle *H. marginatum*'un populasyon yapısını anlamamız gerekmektedir.

Bu amaçla ilk olarak türün Türkiye'de dağılım gösterdiği tüm alanlar göz önüne alınmıştır. Daha önce yapılan araştırmalar, türün Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerde var olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle arazi çalışmaları tüm coğrafi bölgeleri kapsayacak şekilde planlanmıştır [61], [65]. Türkiye'de türün dağılımı ile ilgili 29 ilde yaptığımız kapsamlı arazi çalışmaları sonucunda, literatürde bahsedilenin aksine, bazı lokalitelerde *H. marginatum* bulunamamıştır. Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ve KKTC'de bu kene türü örneklenememiştir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, bizim bulgularımızın doğruluğunu destekler nitelikte sonuçlara işaret etmektedir. Örneğin; Koc ve ark., Antalya ili kene faunası üzerine 3 yıllık bir arazi çalışması yapmış, toplamda 4 *H. marginatum* örnekleyebilmiştir [236]. Bu çalışmada da Akdeniz Bölgesi'nde 3 farklı dönemde (kene aktivitesini kaçırmamak için Mayıs, Haziran ve Ağustos aylarında) toplam 15 lokalitede çalışılmış ve *H. marginatum* bulunamamıştır. Ayrıca KKTC'de gerçekleştirilen arazi çalışmalarında toplanan örnekler *H. excavatum* olarak teşhis edilmiş, *H. marginatum* bulunamamıştır. Bu noktada, *H. marginatum*'un tüm Türkiye'de yayılım gösterdiğini söylemek bu tezin sonuçları kapsamında söz konusu değildir. Bu nedenle Akdeniz Bölgesi'nde, KKTC'yi de kapsayacak biçimde daha kapsamlı bir arazi çalışmasının birkaç yıla yayılacak şekilde gerçekleştirilmesi gerektiği çalışmanın önemli çıktılarından biridir.

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde daha önce kene dağılımı üzerine yapılmış bir çalışma yoktur. Bu çalışma kapsamında 2015-Mayıs ayında Mardin iline bağlı 3 lokalitede çalışma yapılmıştır. Toplam 101 *Hyalomma* bireyi örneklenmiş olup, bunlar *H. excavatum*, *H. scupense* ve *H. anaticum* olarak sınıflandırılmıştır. Bu bölgede sadece bir ilde ve sadece mayıs ayında örnekleme yapıldığından net bir ifadede bulunmak sakıncalı olabilir. Bu bölgede daha geniş kapsamlı arazi çalışmaları yapılarak *H. marginatum* varlığı araştırılmalıdır. Ayrıca, Güneydoğu'da sadece bir ilde 3 farklı kene türünü örneklenmesi, Türkiye'de daha önce kaydedilmeyen ancak İran, Irak ve Suriye'de dağılım gösteren, *H. rufipes* ve *H. asiaticum* türlerinin de olma ihtimalini akla getirmektedir [46], [90], [96], [224], [225], [237], [238], [Apanaskevich, kişisel görüşme, 2016].

Çalışmanın arazi etabı, *H. marginatum*'un daha önce literatürde bahsedildiği gibi tüm Türkiye'de yayılım göstermediği, sadece batı, orta ve kuzey bölgeleri kapsayacak bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir. Ülkenin güney ve güneydoğu hattında ve KKTC'de ise *H. marginatum* örneklenememiştir.

Bu tez çalışmasının arazi bulguları, *H. marginatum*'un dağılımının KKKA hastalığının görüldüğu alanlarla çakıştıldığını da göstermektedir. Ancak bu yorumlar yapılırken, sadece KKKAV görülen alanlar ile ana vektör olan *H. marginatum*'un dağılımının çakışması yanında, pek çok başka faktörün de hastalığın dağılımında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumda, ülkemizin Trakya ve Batı Anadolu Bölgeleri'nde *H. marginatum* bulunmasına rağmen KKKA vakalarının nadir görülmeye ya da olmayışı, virüsün yokluğu, patojenik olmayan virüs soyunun döngüsü, kene-insan temasındaki farklılıklar, vektörün düşük kopyalama yeteneği ile ilgili olabilir.

5.2. *Hyalomma marginatum* Türkiye Populasyonunda Genetik Çeşitliliğin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, Türkiye'de *H. marginatum*'un populasyon yapısını ortaya çıkarmak için mikrosatellit belirteçler tercih edilmiştir. Bu belirteçlerin sečilme nedeni, sahip oldukları yüksek mutasyon oranının yüksek alelik çeşitlilik ile sonuçlanmasıdır [239], [240]. Küçük populasyonlarda ve yakın geçmişte darboğaz etkisine maruz kalan populasyonlarda, sadece yüksek mutasyon oranlarına sahip lokuslar bilgi vericidir [241]. Düşük mutasyonel süreç, uzak geçmişteki olaylara ait izleri verir ve etkisini daha uzun gösterir. Bu nedenle, yüksek

veya düşük alelik çeşitlilik ile lokusların seçimi araştırılan soruya bağlıdır. Mesela, ilgilenilen soru gen akışındaki potansiyel tarihsel bariyer veya son buzul döneminden beri bir alanda yeniden kolonizasyonu izlemek ise, düşük mutasyon oranına sahip belirteçler daha fazla bilgi verici olabilir. Buna karşın, eğer ilgilenilen günümüzde demografi veya yakın geçmişteki (10-100 jenerasyon) değişiklikleri ortaya koyma ise yüksek mutasyon oranına sahip mikrosatellitler tercih edilmelidir [242]. Ayrıca mikrosatellitler türe özgü olduklarından, hedef olmayan organizmalarla çapraz-kontaminasyon gibi problemler, evrensel primerlerle karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Tüm bu özellikleri mikrosatellitleri populasyon genetiği çalışmalarında en fazla tercih edilen belirteçler haline getirmiştir. Ancak en önemli problem mikrosatellitlerin türe özgü dizayn edilmesinin gerekmesidir.

Bugüne kadarmikrosatellit çalışmalarında 12 kene türü için primer dizayn edilmiştir. Ancak *Hyalomma* cinsinin hiçbir türü için daha önce primer dizayn edilmemiştir. Bu nedenle bu çalışmaya başlamadan önce *H. marginatum* ile yakından ilişkili olabilecek herhangi bir türün primeri de mevcut değildi. Bu çalışmada dizayn edilen primerler bu türün populasyon genetiğine yönelik dünyada gerçekleştirilecek diğer çalışmalarda da kullanılabilir. *Hyalomma* cinsinin diğer türlerinde de denenerek, diğer türler için de başarılı sonuçlar verip vermeyeceği test edilebilir.

Moleküler ekolojide genel kanı, çalışmaya çok sayıda lokus dahil etmenin en güvenilir sonuçları vereceği yönündedir. Ancak lokus dahil etmek, inceleme sürecine uygunluk göstermezse, genetik değerlendirmelerin hem hassasiyetini hem de doğruluğunu düşürür. Bu nedenle, inceleme aşamasında yüksek performans gösterenlerin kullanılması genel bilgede bahsettiğimiz çeşitli kaynaklardan gelen hataları azaltır. Buna karşın, lokus sayısının azaltılması da istatistiksel gücü ve genom-boyu örnekleme düşürür. Ancak, birey eklenmesi diğer iki seçeneğe göre F_{ST} değerlendirmeleri için daha hızlı bir doygunluk sağlar [127]. Lokus eklenmesi lokus spesifik süreçlerden ötürü (genetik sürüklenme ya da zayıf seçim gibi) genetik değerlendirmelerdeki çeşitliliği azaltır çünkü her lokus, genomdaki bağımsız bir örnektir [243]. Dahası yüksek polimorfizimli lokusların kullanılması, örnek büyüklüğü de eş zamanlı olarak arttırılmadığı sürece alel frekansı değerlendirmelerindeki hataları arttırabilir [127], [244], [245]. Bütün bu değerlendirmeler gözönüne alınarak çalışmada 7 primer 10 populasyon üzerinde test edilmiştir. Populasyonlar seçilirken örnekleme yapılan tüm alanları temsil etmesine özellikle dikkat edilmiştir. Populasyonlardaki birey sayısı da istatistiksel testlerin gücünü düşürmeyecek şekilde 7-16 birey arasında değişmektedir.

Populasyon yapısını ortaya çıkarmada en fazla kullanılan parametreler F istatistiği parametreleri [230], [246] ve yansız indislerdir [123]. Bu çalışmada 6 lokus için elde edilen F_{IS} (kendileşme katsayısı) değerleri -0,143 ile -0,65 arasında değişmektedir. Sadece HymL1 pozitif değere sahiptir (0.046). Buna göre Türkiye’de *H. marginatum* alt populasyonlarında HWE’den bariz bir sapma olduğu ve heterozigotluğun yüksek olduğu görülmektedir.

Dünyada diğer Ixodid kene türleri ile yapılan çalışmalar, tam tersi olarak populasyonlarda güçlü genetik yapılanma ortaya koymuştur [15], [29-35]. Bu durum 3 faktörle açıklanmıştır. Birinci olarak, ixodid keneler düşük dispersal kapasitesine sahiptir ve bu yapı oluşumu lokal, küçük ölçekli akraba yapısının varlığını yansıtabilir, yani bu durum konak biyolojisine sıkı sıkıya bağlıdır [9], [247], [248]. İkincisi, keneler lokal konak ilişkisi gösterirler yani rasgele olmayan konak kullanımı vardır [33-35], [203], [249, 250]. Bu ilişki konak soylarına bağlı kene formasyonlarının oluşmasını sağlayabilir [251]. Sonuç olarak, konak populasyonları arasında kene dispersalinin konak soylarına bağlı formların istila olasılığını ve lokal populasyon dinamiklerini değiştirebilecek kadar önemli olduğu ortaya konmuştur. Böylece kenelerin lokal konaklara adaptasyon potansiyeli modifiye olabilir.

Lyme ve kene kökenli ensefalitin vektörü *I. ricinus* populasyonları için mikrosatellit belirteçler daha önce karakterize edilmiş ve kullanılmıştır [15], [29-35]. Bu belirteçler kullanılarak yapılan analizler populasyon içinde HW oranından bariz bir sapma olduğu ve heterozigot eksikliğini işaret etmiştir. Bu durumu araştırmacılar iki şekilde yorumlamıştır [15], [30], [32], [215], [251]. Null alel ve kısa alel dominansı gibi teknik problemler hatalı homozigotlar üretebilir. İkincisi, populasyon içerisinde genetik bariyer gibi nedenlerle populasyonun alt populasyonlara ayrılması sonucunda oluşan heterozigot eksikliğini ifade eden Wahlund etkisidir. Konak ve kene davranışı, yaşam evresi, sosyal yapı ve diğer benzer süreçler aynı altgrup bireylerinin kendileşmesini etkileyebilir. Örneğin, aynı yumurtadan çıkan larvaların doğada kümelenedikleri bilinmektedir [247], [248].

Bu çalışmada, Türkiye’deki *H. marginatum* populasyonlarında diğer kene türleri ile yapılan çalışmalarda görülen aksine heterozigot fazlalığı (heterozygote excess) görülmüştür. Dolayısıyla, çalışmada teknik hatalardan kaynaklı null alel ya da büyük alel kaybı olmadığı rahatlıkla söylenebilir. Bunun dışında, kenelerin davranış özelliklerinden kaynaklanan kümeli konak arama ve beslenme davranışına dair kanıtlar bulunamamıştır. *Hyalomma marginatum* populasyonlarında HWE’den görülen bu bariz sapma konak etkisi ile açıklanabilir.

Kuşların tüm Ixodid türleri tarafından parazitlendiğine dair güçlü kanıtlar mevcuttur [252]-[269]. Bu Ixodid türleri *Borrelia spp.*, *Babesia spp.*, *Anaplasma*, *Rickettsia/Coxiella* KKE virüsü ve KKKAV ile infekte olabilir [258], [262], [263], [265]-[268], [270]-[280]. Kuşlardaki kenelerin prevelans oranı, yıllara, mevsime, lokalite ve farklı kuş türlerine göre değişiklik göstermektedir. Farklı türlerdeki kenelerin prevelansı zemindeki beslenme derecesine bağlıdır [268], [281]. Türkiye göçmen kuşların göç rotası üzerindedir ve bu yolla pek çok *H. marginatum* larva ve nimflerinin Afrika'dan Türkiye'ye taşındığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [282], [283]. Dolayısıyla bu durum sürekli gen akışı ve heterozigotluğun artışı ile sonuçlanabilir. Yine çeşitli ülkelerden yapılan büyükbaş hayvan ticareti de ergin formların ülkeye girişini sağlar ve bu durum üzerinde etkili olabilir.

5.3. *Hyalomma marginatum* Türkiye Populasyon Yapısı

FSTAT analizleri, Türkiye'de *H. marginatum* populasyonlarının F_{ST} değerlerini 0 ile 0.19 arasında göstermiştir. En büyük farklılık 0.19 ile Çorum-Iğdır ve Çorum-Kırklareli arasında, 0.17 ile Çorum-Muğla arasında ve 0.16 ile Çorum-Bayburt arasında bulunmuştur. Dolayısıyla Çorum populasyonunda bariz bir farklılık tespit edilmiştir. Aynı şekilde Çankırı populasyonunda da, Çorum populasyonu kadar yüksek olmasa da orta seviyede genetik farklılık tespit edilmiştir ($F_{ST}=0.07-0.12$).

STRUCTURE programı kullanılarak Türkiye *H. marginatum* populasyonlarının kaç gruba ayrıldığı analiz edilmiştir. Bu program populasyonların HWE beklentilerini karşıladığını ve lokuslar arasında bağlantı eşitliğininin olduğunu varsayar. Bu varsayımlar, doğal ve kendileşen populasyonlarda ihlal edilir [284], [285]. Bu analizin sonuçları, Türkiye'de *H. marginatum*'un 2 genotipik gruba ayrıldığını göstermiştir. Buna göre Çorum bir genotipin özelliklerini daha fazla taşıırken, diğer 9 populasyon diğer genotipin özelliklerini taşımaktadır.

H. marginatum yuva çevresi dışında da konak arama aktivitesi gösteren bir kene türüdür. İki konaklı bir kene türü olması ve beslenme süresinin uzun olması konaklarıyla daha uzak mesafelere rahatlıkla disperse olabilmesini sağlar. Dolayısıyla populasyonlar arasında gen akışı söz konusu olabilir ve populasyonların güçlü bir genetik yapı göstermesi beklenmeyebilir. İnsan eliyle konak hayvanların taşınması ile oluşan genetik şekillenme *H. marginatum* kenelerinde gözlenebilir. Özellikle ülkemizde hayvanların bir yerden başka bir

yere taşınması ve satılmasına dair (Kurban bayramında) çok sayıda veri ve kendi gözlemlerimiz mevcuttur. Bütün bu bilgiler Türkiye’de *H. marginatum*’ların güçlü bir genetik yapı oluşturmayacağına işaret etmektedir. Sonuçlarımız genel anlamda populasyonlar arası bir gen akışı olduğunu göstermektedir. Çankırı ve Çorum populasyonlarında görülen genetik farklılık kene biyolojisi ve davranışından kaynaklanmayan başka faktörlerle açıklanmalıdır.

Populasyon genetiği çalışmaları, artropod vektör kökenli hastalıkların temel dinamikleri ile ilgili bilgileri; vektörlerin dispersal örüntüsü ve bunun patojeni yaymadaki potansiyelini değerlendirerek elde eder. Keneler gibi kanatsız vektörlerde, gen akışı konakların hareketine bağlı olarak gerçekleşir. Ancak, kene davranışı ve hayat döngüsü stratejileri, oldukça yüksek hareket yetisine sahip olan konaklarda olsalar bile dispersallerini sınırlar ve genetik yapıda artışa neden olur. Günümüze kadar çalışılan türlerin yarısında (*Amblyomma*, *Bothriocroton*, *Dermacentor* and *Ornithodoros* cinslerine ait türler), kene genetik yapısının konağın hareket kapasitesine bağımlı olduğu belirlenmiştir. Sınırlı harekete sahip konaklardaki kenelerde düşük gen akışı gözlenirken, yüksek harekete sahip konaklarla ilişkili kenelerde yüksek gen akışı gözlemlenmiştir. *Ixodes*, *Ornithodoros* ve *Rhipicephalus* gibi kene gruplarında ise davranışsal kısıtlamaların da gen akışında etkili bir faktör olduğu gösterilmiştir [286]. Infekte kenelerden ziyade infekte konakların hareketi, hastalıkların uzak mesafelere yayılmasında daha önemli faktördür. Bu gibi durumlarda, hastalık kontrol çabalarında, kenelerden ziyade konaklara odaklanılmalıdır [286].

Kuşlar, memelileri engelleyen çitler gibi bariyerleri, dağları, buzulları, çöl ve okyanusları kolaylıkla geçebilirler. Kuşlar, infekte keneleri taşıyarak kene kökenli patojenlerle infekte olurlar ve patojenleri tekrar başka kenelere transfer ederler. Böylece aynı konaktan beslenme (co-feeding) ile patojenleri keneler arasında taşırlar. Ayrıca, kuşlar, kene kökenli patojenlerle infekte olarak patojeni kuvvetlendirici konak olarak davranabilirler ve başka keneleri infekte ederek onların da başka konaklara patojen transfer etmesini sağlarlar. Yeni kene türlerinin, kene kökenli patojenlerin kuşlar tarafından getirildikten sonra, yeni bir lokalitede nasıl davranacağı hala gösterilememiş olmasına rağmen, bunun gerçekleştiğine dair kesin kanıtlar mevcuttur [91], [287], [288]. Kuş göç rotaları, kenelerin ve patojenlerin mekansal dağılımı ile ilgili bilgiler, kenelerin ve kene kökenli hastalıkların dağılımını anlamada oldukça önemlidir.

Populasyon yapısı ve kuş-konak soyu formasyonu ile ilgili en kapsamlı çalışmalar, *Ixodes uriae* üzerine yapılmıştır [17], [203], [216], [251], [289-295]. Bu tür *I. ricinus* kompleksin

üyesidir ve Lyme hastalığı patojeni *B. burgdorferi*'nin vektörüdür. Üç konaklı bir kene türü olup, hem kuzey hem de güney kutup bölgelerinde bulunan denizkuşu kolonilerinin yuvalarında parazittir [296]. *Ixodes uriae*'nin konak soylarının araştırılması Atlantik popülasyonundaki iki türle başlamıştır (kara bacaklı martı *Rissa tridactyla* ve Atlantik kutup martısı *Fratercula arctica*). Farklı konakların simpatrik kene popülasyonlarındaki genetik farklılığın, aynı konaktaki allopatrik popülasyonlara göre daha fazla olduğu görülmüştür [249]. Kuzey ve güney kutup bölgesinden toplanan örneklerle gerçekleştirilen 8 mikrosatellit belirteç analizi kene popülasyonları arasında genetik izolasyon olduğunu göstermiştir. Deniz kuşlarının göç rotası üzerinde olan Kuzey Atlantik ve Kuzey Pasifik popülasyonlarında da aynı sonuçlar elde edilmiştir [250], [290]. Bu durum, kene popülasyonlarını koloni tipi (mono veya heterospesifik) ya da coğrafi uzaklıktan ziyade konak türüne göre gruplama imkanı vermiştir [297]. Ayrıca, konak soylarının sadece genetik olarak izole olmadığı, aynı zamanda yüksek derecede morfolojik varyasyon gösterdiği de ortaya konmuştur [17].

Baltık ülkelerinde *I. ricinus* popülasyonlarının genetik yapısının karakterize edildiği ve genetik çeşitliliğinin araştırıldığı çalışmada, literatürde bulunan mikrosatellit belirteçler kullanılmıştır. Litvanya, Letonya ve Estonya'daki 18 lokaliteden toplam 180 kene (170 *I. ricinus* ve 10 *I. persulcatus*), 4 polimorfik mikrosatellit lokus kullanarak, Litvanya (n=60), Letonya (n=60) ve Estonya'ya (n=60) ait 6 popülasyonun genetik çeşitliliği karşılaştırılmıştır. En yüksek gözlenen heterozigozluk (H_o) kıyı bölgelerinde görülürken, en düşük değer karasal bölgelerde görülmüştür. Bu durum popülasyon yapısında kuşların konak olarak önemini göstermektedir. Bu çalışma, *I. ricinus* popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin kıyı lokalitelerinde ve kuş göç rotaları üzerinde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Karasal alanların genetik olarak daha az çeşitlilik gösterdiği kaydedilmiştir [13].

Hasle ve arkadaşlarının 2009 yılında Norveç'te yaptığı çalışmada, 2003-2005 yılında kuşlarda örneklenen kene sayısı Mehl [255] (1984)'in 1965-1970 yılları arasında elde ettiği verilerle karşılaştırılmıştır [268]. Buna göre kuzeye doğru göç eden göçmen kuşların kene ile infestasyon oranının %4.2'den %6.9'a çıktığı görülmüştür. Norveç'te yapılan bir başka çalışmada 9768 serçegillere ait kuş muayene edilmiş ve 7 *H. rufipes* nimfi bulunmuştur. Muhtemelen her yıl Norveç'e bu şekilde *Hyalomma* bireyleri gelmiş olabilir, ancak buradaki soğuk iklimde popülasyon kurmaları söz konusu olamamıştır. Her yıl 30-80 milyon ötücü kuşun her ilkbaharda göç ettiklerini düşünürsek, milyonlarca kenenin her yıl transfer edilebileceğini söyleyebiliriz. Kısıtlayıcı faktör kenelerin dispersal yeteneği olmayacaktır.

Alanın uygunluğu, kenelerin üremesi ve hayatta kalması için sınırlayıcı faktördür. Uygun iklimsel faktörler kene popülasyonlarının kurulması için ön koşullardan biridir. Keneler kurumaya eğilimli olduğundan [298], güneş, toprak ve vejetasyon örtüsünün mikroklima koşulları, kenenin hayatta kalması için belirleyici faktörlerdendir.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün Avrupa'da ortaya çıkması ile ilişkili olarak, 2009-2010 yılları boyunca Afrika'dan Avrupa'ya gelen göçmen kuşlar, kene varlığı açısından araştırılmıştır. Akdeniz'deki iki kuş gözlem alanında (İtalya ve Yunanistan) 78 farklı türe ait 14824 kuş toplanmış ve kene varlığı açısından araştırılmıştır. Toplanan 747 kenenin %88'i *H. marginatum* kompleksin bireyleridir, KKKAV'nin temel kene vektörleri *H. rufipes* ve *H. marginatum* olarak sınıflandırılmıştır. Örneklerin %99'u larva ve nimflerdir. Yunanistan'ın adalar bölgesindeki Antikhytira kuş gözlem istasyonunda gözlenen kıvılcıklı örümcek kuşu üzerinde 19 *H. marginatum* kompleks bireyi (3 larva ve 16 nimf) yakalanmıştır. Bu kenelerle yapılan KKKAV analizi sonucunda 3 örnek pozitif sonuç vermiştir ve aynı diziyeye sahiptir. S segmenti baz alınarak daha önce yapılan araştırmalar, filogenetik olarak 7 farklı grubun varlığını ortaya koymuştur: Afrika1-3, Asya1-2 ve Avrupa1-2. Avrupa 1 daha önce Rusya, Türkiye, Yunanistan, Bulgaristan ve Balkanlarda; Avrupa 2 ise Yunanistan'da bulunan ve patojenik olmayan AP92'dir. Antikhytira soyuna ait dizilerin diğer genbank verileri kullanılarak çizilen ağaçları Afrika 3 genotipi ile benzerlik göstermiş ve bu soy hattı içerisinde yerini almıştır [299]. Ayrıca, bu infekte keneler ya yarı doymuş ya da tam doymuş nimfler olmaları nedeniyle, kuş göçe başlamadan larva aşamasında tutunmuş olma durumları söz konusudur.

Göçmen kuşlarla taşınan kenelerle ilgili Türkiye'de oldukça az sayıda çalışma vardır. Leblebicioglu ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada, Kızılırmak Deltası'nda 2010-2012 yılları arasında yakalanan ve halkalanan 13377 kuşun 65'inde kene bulunmuştur [283]. Bu kuşlardan 4 cinse ait 188 kene (*Ixodes*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* ve *Rhipicephalus*) tespit edilmiştir. Sadece 2 kenenin *Hyalomma* sp.ve *Ixodes* sp.'nin KKKAV taşıdığı tespit edilmiştir. Dünyada KKKAV'nin 7 farklı genotipi bulunmakta olup, bu çalışmada elde edilen diziler genotip 4'e aittir. Virüs tespit edilen *Hyalomma* sp. nimfi büyük saz ardıçkuşu, *Ixodes* sp. nimfi ise Avrupa kıvılcıklı örümcek kuşu üzerinden toplanmıştır. Her iki kuş türü de Türkiye'den yuvalamadan kışlamaya ya da tam tersi yönde yılda iki kere geçerler. KKKAV'nin farklı bölgeler ve ülkeler arasında kenelerle taşınması olasılığı her iki kuş türünün göçü süresince yüksektir. Çünkü bu kuşlar göç boyunca birçok kez dururlar [300], KKKAV özellikle de Güney Avrupa'daki uygun ekolojik koşullara sahip mola alanlarında muhtemelen artacaktır.

Bütün bu bilgiler göz önüne alındığında ve elde edilen genetik verilerle karşılaştırıldığında, kuş göç rotalarına bağlı olarak farklı genetik yapıya sahip *H. marginatum* bireylerinin Türkiye’de populasyon kurabilme ihtimalinin yüksek olduğu görülebilir. Ancak, infekte kenelerin kuşlarla transferi tek başına Türkiye’deki salgınları açıklamada yeterli değildir. Bununla beraber, iklimsel değişiklikler, çevresel değişiklikler, hassas konak hayvanların sayısının artışı, kene ve hayvan hareketi KKA’nın yayılmasında rol oynayabilir. KKA’nın coğrafik dağılımında kuşlar ve keneler arasındaki etkileşimi araştırmak için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

5.4. Epidemiyolojik Değerlendirmeler

Enfeksiyon hastalıklarının ve vektörlerinin populasyon genetiği araştırmaları genetik epidemiyoloji veya moleküler epidemiyoloji olarak adlandırılır [301]. Parazit ve vektörlerin doğal populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin çalışılması, parazit-vektör-konak dinamiklerini etkileyen ve yönlendiren ekolojik ve evrimsel süreçlerin aydınlatılmasını sağlar. Fakat bu karmaşık dinamiklerin araştırılması, sürekli geliştirilen istatistik yöntemlerin ve yeni populasyon genetiği araçlarının takip edilmesini gerektirir [15], [302]

Genetik olarak farklı olan populasyonların farklı vektöriyel kapasiteye sahip olmaları her zaman tartışma konusudur. Bir kene türü içerisindeki coğrafi varyasyon; patojeni edinme, sürdürme ve transfer yeteneğini etkiler [19]. Protozoan *Theileria cervi*’nin vektör yeterliliğinin, *Amblyomma americanum*’un doğal populasyonları ile, laboratuvar kolonileri, arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir [23].

Doğu Amerika’da *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, Lyme hastalığına neden olan *B. burgdorferi* sensu lato kompleksinin bir üyesidir ve *Ixodes scapularis* (kara bacaklı kene) tarafından taşınır [303]. Lyme hastalığının bölgedeki dağılımı birbirinden oldukça farklıdır. Kuzeyde yüksek insidans görülürken güneyde düşük insidans görülmektedir. Bu dağılım ilk olarak, her bölgede farklı vektör kapasitesine sahip farklı vektör türlerinin, *Ixodes dammini* ve *I. scapularis*’in varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Populasyon genetiği çalışmaları, türler arasında güncel gen akışının söz konusu olduğunu ortaya koymuş ve bu kenelerin iki farklı türe ayrılmadığını göstermiştir [208], [304]. Lyme hastalığının bölgedeki bu insidans farklılığı, en iyi şekilde, farklı konak türlerinin varlığı ile açıklanmıştır [305], [306]. Elverişli konak güneyde sürüngen türleri iken, kuzeyde beyaz ayaklı faredir [303].

Rhipicephalus sanguineus kompleks, 17 kene türünden oluşan taksonomik bir gruptur [307]. *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto, grubun dünyada en fazla dağılım gösteren üyesidir ve *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii* and *Rickettsia massiliae* gibi pek çok hastalık etkenini taşır [51], [308]-[311]. Son yıllarda *R. sanguineus* s.s.'nin populasyon genetiği çalışmaları, bu kene türünün Amerika'da iki farklı grubunun olduğunu, dolayısıyla da Kayalık Dağları benekli ateşi hastalığının, kıtanın kuzeyinde ve güneyinde iki bağımsız olay olarak görüldüğünü ortaya koymuştur [21]. Yine aynı kene türü ile Güney Amerika'da gerçekleştirilen bir başka çalışmada, Brezilya'dan toplanan *R. sanguineus* s.s. örneklerinin *E. canis*'in vektörü olduğu, ancak Arjantin ve Uruguay'dan toplanan örneklerin bu hastalık etkenini taşımadığı gösterilmiştir [22].

Türkiye'de KKKAV ile ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla insan vakalarındaki pasif sürveyans ve hayvanlardaki serolojik çalışmalara dayanmaktadır. Görüşler çoğunlukla yeni odakların olmadığı, var olan sessiz odakların konak populasyonlarındaki değişimi etkileyen kademeli değişimlere bağlı olarak kene populasyonlarındaki artışla güçlendiği yönündedir. Habitat parçalanması, terkedilmiş alanların konak populasyonları üzerindeki etkisi, çalılırların artışı ve bunun daha iyi konak habitatlarını teşvik etmesi, sığırların hareketi ile infekte kenelerin bir alana taşınması, aktif odakların değişiminin arkasındaki önemli nedenlerdir.

Türkiye'deki KKKA insidanslarında son yıllardaki artış göz önüne alındığında, iklimin hastalığın dağılımında doğrudan etkili olduğuna dair kanıt yoktur [312]. Insidans oranı ve bölgesel koşulların, uzaktan algılama kullanılarak elde edilen çeşitli iklimsel koşulların aylık değerleri ile karşılaştırmalı analizinin yapıldığı bir çalışmada, KKKAV'nin aktif odaklarının görüldüğü yerlerde iklimin, *H. marginatum*'un görüldüğü ancak insan vakalarının görülmediği alanlardan farklı olmadığı ortaya konmuştur [312]. Buna karşın, Türkiye'de KKKA vakalarının yüksek insidansının alan kullanımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [313]. Bu argüman, en yaygın bildirilen transmisyon mekanizması ile de uyumludur: İnfekte kene ısırığı, parçalanmış alanlarda artan kene yoğunluğu, böylece insanın keneye fazlaca maruz kaldığı bir çevrenin oluşması. Ancak, alan kullanımı tek başına aktif KKKA odaklarını düzenleyen faktör olarak düşünülemez. En azından Türkiye'de, tarım alanlarının kademeli olarak terk edilmesi, çalı yoğunluğunun artmasına neden olmuştur [38].

Bu çalışmanın en önemli sorularından biri *H. marginatum* yapısındaki olası farklılıkların KKKA insidansının yüksek olduğu alanlarla düşük olduğu alanlar arasında farklılık gösterip göstermediğini ortaya koymaktı. Buna göre, KKKA insidansının yüksek olduğu Gümüşhane (31.11) ve Bayburt (30.42)'un, KKKA insidansının daha düşük olduğu alanlardan farklı bir genetik yapıya sahip olması gerektiği hipotezi ortaya atılmıştır. Ancak literatürün aksine, Gümüşhane ve Bayburt popülasyonları hastalık insidansının düşük olduğu diğer alanlardan farklı bir genetik yapı ortaya koymamıştır. Aynı kene türünün Türkiye'deki alt popülasyonları içerisinde sadece Çorum popülasyonu diğer alt popülasyonlardan belirgin bir farklılık göstermiştir. Bu nedenle, mikrosatellit analizleri, Türkiye'de KKKA hastalığının ülkedeki dağılımı ve kenenin genetik yapısı arasında bir ilişki göstermemiştir.

Türkiye'deki KKKA salgını, Bente ve ark. (2013)'nin çalışmalarında kaydedildiği gibi, virüsün yeni bir patojenik soyunun ülkeye ulaştığını ifade etmekle açıklanamaz [105]. Estrada-Pena ve Fuente (2014) tarafından açıklandığı üzere, Türkiye'deki salgın çok sayıda değişken gözönüne alınarak incelenmelidir. Tarımsal alanların kademeli olarak terk edilişi, hem kenelerin hem de ergin öncesi formların konaklarının hayatta kalması için uygunluk gösteren çalı örtüsünün artması, viral döngünün kendi kendini yükseltmesinde etkili olan habitat parçalanması, insan ve virüs odağının temas oranının artması vakaların artışıdaki etmenler olarak sıralanabilir [53].

Dolayısıyla, KKKA'nın yeni odaklara yayılması ya da bazı bölgelerde yeniden ortaya çıkması ile ilgili ortaya atılacak senaryolardaki hipotezler iklimsel değişiklikler, büyük toynaklıların hareketi, artan habitat parçalanması ve tarım alanlarının terk edilmesinin kombine etkisi üzerine kurulu yaklaşımlara dayanmalıdır. Bu çalışmada kullanılan mikrosatellit belirteçler, *H. marginatum* genetik yapısı ve KKKA vaka dağılımı açısından bir ilişki göstermemiştir.

5.5. Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada;

- 1) *Hyalomma marginatum*'un, Türkiye'de popülasyon içi genetik çeşitliliği ve farklı alt popülasyonları arasındaki genetik farklılıklar değerlendirilmiştir.

- 2) Dünyada ilk kez bu türe özgü 42 mikrosatellit primer dizayn edilmiş, 7'si çalıştırılmıştır.
- 3) Türkiye popülasyonunda görülen heterozigot fazlalığının Afrika'dan göçmen kuşlar tarafından taşınan *H. marginatum* nimfleri ile ve büyükbaş hayvan hareketi ile gerçekleşen gen akışına bağlı olduğu düşünülmektedir.
- 4) Popülasyon yapı analizleri Türkiye'de *H. marginatum*'un iki farklı grubu olduğuna işaret etmektedir. Çorum popülasyonu hem FSTAT hem de STRUCTURE analizlerinde, Çankırı popülasyonu ise FSTAT analizlerinde diğer popülasyonlardan farklılık göstermiştir. Ülkenin iç kesimlerde görülen bu farklılığın, farklı göç rotaları kullanan kuşların getirdiği, farklı genetik yapıya sahip *H. marginatum* bireyleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.
- 5) Elde edilen veriler, ülkemizde KKKA insidansının en yüksek olduğu Gümüşhane ve Bayburt popülasyonlarından örneklenen *H. marginatum* bireylerinin, diğer popülasyonlardan farklı bir genetik yapıya sahip olmadığını göstermiştir.

Bundan sonraki çalışmalar ile göçmen kuşlardan toplanan örneklerle yapılacak moleküler çalışmalarla elde edilen veriler ilişkilendirilecektir. Afrika'dan da örnekleme yaparak Türkiye ve Afrika *H. marginatum* bireylerinin genetik yapılarının karşılaştırılması hedeflenmektedir.

İklimsel parametrelerin kenelerin dağılımı, yaşam evreleri, mortalite oranları, bıraktıkları yumurta sayısı, popülasyon büyüklüğü, insanları infekte eden patojenleri edinme ihtimali ve kene-insan temasını etkilediği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [53], [69], [314]. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen veriler, örnekleme yapılan alanların ekolojik özellikleri ile ilişkilendirilerek tekrar değerlendirilecektir.

Mikrosatellit lokus sayısı artırılarak analizler tekrarlanacaktır.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi hastalığının insidansında görülen farklılık, virüs soyundaki farklılıktan da kaynaklı olabilir. Dolayısıyla gelecekte yapılacak çalışmalar, kenelerin genetik yapısı ile virüs soyu ilişkilendirilerek ele alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Gooding, R., Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. *Clinical microbiology reviews*.9 (3):p. 301-320. **1996.**
- [2] Anderson, J. F. and Magnarelli, L. A., Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America*.22 (2):p. 195-215. **2008.**
- [3] Hill, C. A. and Wikel, S. K., The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research. *Trends in parasitology*.21 (4):p. 151-153. **2005.**
- [4] Sonenshine, D., Biology of ticks. Vol. 2. Part IV. Ecology, behavior, and host-parasite interactions. ed: Oxford University Press, New York, New York, **1993.**
- [5] Uilenberg, G., Thiaucourt, F., and Jongejan, F., On molecular taxonomy: what is in a name? *Experimental & Applied Acarology*.32 (4):p. 301-312. 2004/05/01 **2004.**
- [6] Van Zee, J. P., Geraci, N., Guerrero, F., Wikel, S., Stuart, J., Nene, V., *et al.*, Tick genomics: the *Ixodes* genome project and beyond. *International journal for parasitology*.37 (12):p. 1297-1305. **2007.**
- [7] Parola, P. and Raoult, D., Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases*.32 (6):p. 897-928. **2001.**
- [8] Busch, J. D., Stone, N. E., Nottingham, R., Araya-Anchetta, A., Lewis, J., Hochhalter, C., *et al.*, Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. *Parasites & vectors*.7 (1):p. 1. **2014.**
- [9] Dharmarajan, G., Beasley, J., and Rhodes, O., Spatial and temporal factors affecting parasite genotypes encountered by hosts: Empirical data from American dog ticks (*Dermacentor variabilis*) parasitising raccoons (*Procyon lotor*). *International journal for parasitology*.40 (7):p. 787-795. **2010.**
- [10] Healy, J., Phosphoglucosyltransferase polymorphism in the tick *Ixodes ricinus*. *Parasitology*.78 (01):p. 7-17. **1979.**
- [11] Koffi, B. B., RISTERUCCI, A., Joulia, D., Durand, P., Barre, N., De Meeûs, T., *et al.*, Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Molecular Ecology Notes*.6 (2):p. 502-504. **2006.**
- [12] Lampo, M., Rangel, Y., and Mata, A., Population genetic structure of a three-host tick, *Amblyomma dissimile*, in eastern Venezuela. *The Journal of parasitology*.p. 1137-1142. **1998.**

- [13] Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Rosef, O., Turcinaviciene, J., Ambrasiene, D., and Makareviciute, D., Genetic variation of ticks (*Ixodes ricinus* L.) in the Lithuanian and Norwegian populations. *Experimental & applied acarology*.40 (3-4):p. 259-270. **2006.**
- [14] Vial, L., Durand, P., Arnathau, C., Halos, L., Diatta, G., Trape, J.-F., *et al.*, Molecular divergences of the *Ornithodoros sonrai* soft tick species, a vector of human relapsing fever in West Africa. *Microbes and infection*.8 (11):p. 2605-2611. **2006.**
- [15] De Meeûs, T., Béati, L., Delaye, C., Aeschlimann, A., Renaud, F., and Ross, K., Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution*.56 (9):p. 1802-1807. **2002.**
- [16] Barker, S. C. and Murrell, A., Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. in *Ticks and Tick-Borne Pathogens*, Springer. p. 55-68.**2003**
- [17] Dietrich, M., Beati, L., Elguero, E., Boulinier, T., and McCoy, K. D., Body size and shape evolution in host races of the tick *Ixodes uriae*. *Biological Journal of the Linnean Society*.108 (2):p. 323-334. **2013.**
- [18] McCoy, K. D., Boulinier, T., Tirard, C., Michalakis, Y., and Ashley, M., Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution*.57 (2):p. 288-296. **2003.**
- [19] Mclain, D. K., Wesson, D. M., Oliver, J. H., and Collins, F. H., Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*.32 (3):p. 353-360. **1995.**
- [20] McCoy, K., The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. *Parasite*.15 (3):p. 444-448. **2008.**
- [21] Eremeeva, M. E., Zambrano, M. L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S. E., Santos-Silva, M. M., *et al.*, *Rickettsia rickettsii* in Rhipicephalus ticks, Mexicali, Mexico. *Journal of medical entomology*.48 (2):p. 418-421. **2011.**
- [22] Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F. A., Richtzenhain, L. J., and Labruna, M. B., Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*.117 (1):p. 51-55. **2011.**
- [23] Reichard, M., Kocan, A., Van Den Bussche, R., Barker, R., Wyckoff III, J., and Ewing, S., Sequence variation of the ribosomal DNA second internal transcribed spacer region in two spatially distinct populations of *Amblyomma americanum* (L.)(Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*.91 (2):p. 260-263. **2005.**

- [24] Heywood, V. H. and Iriondo, J. M., Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*.113 (3):p. 321-335. **2003**.
- [25] Ramamoorthi, J., Thilagam, K., Sivaselvam, S., and Karthickeyan, S., Genetic characterization of Barbari goats using microsatellite markers. *Journal of veterinary science*.10 (1):p. 73-76. **2009**.
- [26] Condit, R. and Hubbell, S. P., Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*.34 (1):p. 66-71. **1991**.
- [27] Georges, M., Mishra, A., Sargeant, L., Steele, M., and Zhao, X., Progress towards a primary DNA marker in cattle.in *Proceedings of the 4th World Congress on Genetics applied to Livestock Production, Edinburgh 23-27 July 1990. XIII. Plenary lectures, molecular genetics and mapping, selection, prediction and estimation.* p.: 107-112. 1990,
- [28] Allendorf, F. W. and Luikart, G., *Conservation and the genetics of populations.* ed.: John Wiley & Sons, **2009**.
- [29] Delaye, C., Aeschlimann, A., Renaud, F., Rosenthal, B., and De Meeus, T., Isolation and characterization of microsatellite markers in the *Ixodes ricinus* complex (Acari: Ixodidae). *Molecular ecology*.7 (3):p. 360-361. **1998**.
- [30] De Meeûs, T., Lorimier, Y., and Renaud, F., Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*. *Microbes and Infection*.6 (3):p. 299-304. **2004**.
- [31] de Meeûs, T., Humair, P.-F., Grunau, C., Delaye, C., and Renaud, F., Non-Mendelian transmission of alleles at microsatellite loci: an example in *Ixodes ricinus*, the vector of Lyme disease. *International journal for parasitology*.34 (8):p. 943-950. **2004**.
- [32] Roed, K. H., Hasle, G., Midthjell, V., Skretting, G., and Leinaas, H. P., Identification and characterization of 17 microsatellite primers for the tick, *Ixodes ricinus*, using enriched genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*.6 (4):p. 1165-1167. **2006**.
- [33] Kempf, F., De Meeûs, T., Arnathau, C., Degeilh, B., and McCoy, K. D., Assortative pairing in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the European vector of Lyme borreliosis. *Journal of medical entomology*.46 (3):p. 471-474. **2009**.
- [34] Kempf, F., De Meeûs, T., Vaumourin, E., Noel, V., Taragel'ová, V., Plantard, O., *et al.*, Host races in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis. *Infection, genetics and evolution*.11 (8):p. 2043-2048. **2011**.

- [35] Kempf, F., McCoy, K. D., and De Meeûs, T., Wahlund effects and sex-biased dispersal in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis: new tools for old data. *Infection, Genetics and Evolution*.10 (7):p. 989-997. **2010**.
- [36] Apanaskevich, D. A. and Horak, I. G., The genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. Re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H.(Euhyalomma) marginatum* Koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *International Journal of Acarology*.34 (1):p. 13-42. **2008**.
- [37] Apanaskevich, D. A., Santos-Silva, M. M., and Horak, I. G., The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H.(Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H.(E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia parasitologica*.55 (1):p. 61. **2008**.
- [38] Ergönül, Ö., Crimean-Congo haemorrhagic fever. *The Lancet Infectious Diseases*.6 (4):p. 203-214. **2006**.
- [39] Whitehouse, C. A., Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research*.64 (3):p. 145-160. **2004**.
- [40] Karti, S. S., Odabasi, Z., Korten, V., Yilmaz, M., Sonmez, M., Caylan, R., *et al.*, Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerging infectious diseases*.10 (8):p. 1379. **2004**.
- [41] Tonbak, S., Aktas, M., Altay, K., Azkur, A. K., Kalkan, A., Bolat, Y., *et al.*, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *Journal of clinical microbiology*.44 (11):p. 4120-4124. **2006**.
- [42] Özdarendeli, A., Çanakoğlu, N., Berber, E., Aydın, K., Tonbak, Ş., Ertek, M., *et al.*, The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus research*.147 (2):p. 288-293. **2010**.
- [43] Kalaycioglu, A. T., Durmaz, R., Uyar, Y., Unaldi, O., Aksekili, E., Ozkul, A., *et al.*, Lack of genetic diversity in Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Turkey: Assessment of present and future patterns of disease. *Journal of Medical Virology*.84 (3):p. 471-478. **2012**.
- [44] Yilmaz, G. R., Buzgan, T., Irmak, H., Safran, A., Uzun, R., Cevik, M. A., *et al.*, The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002–2007. *International Journal of Infectious Diseases*.13 (3):p. 380-386. **2009**.

- [45] Yilmaz, G., Buzgan, T., Torunoglu, M., Safran, A., Irmak, H., Com, S., *et al.*, A preliminary report on Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, March-June 2008. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*.13 (33):p. 717-727. **2008.**
- [46] Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Pena, A., Horak, I. G., *et al.*, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **2010.**
- [47] Sonenshine, D., *Biology of ticks*, vol. 1 and 2. ed: Oxford University Press, New York, 1991.
- [48] Horak, I. G., Camicas, J.-L., and Keirans, J. E., The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental & applied acarology*.28 (1-4):p. 27-54. **2002.**
- [49] Murrell, A., Campbell, N. J., and Barker, S. C., Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.16 (1):p. 1-7. **2000.**
- [50] Murrell, A., Campbell, N. J. H., and Barker, S. C., A Total-Evidence Phylogeny of Ticks Provides Insights into the Evolution of Life Cycles and Biogeography. *Molecular phylogenetics and evolution*.21 (2):p. 244-258. **2001.**
- [51] Walker, J. B., Keirans, J. E., and Horak, I. G., The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world. ed.: Cambridge University Press, **2000.**
- [52] Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J., Estrada-Pena, A., Horak, I., Latif, A., *et al.*, Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. ed.: Bioscience reports Edinburgh, **2003.**
- [53] Estrada-Peña, A. and de la Fuente, J., The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral research*.108:p. 104-128. **2014.**
- [54] Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., and Lane, R. S., Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls. *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*.p. 29-46. **2002.**
- [55] Estrada-Peña, A. and Jongejan, F., Ticks Feeding on Humans: A Review of Records on Human-Biting Ixodoidea with Special Reference to Pathogen Transmission. *Experimental & Applied Acarology*.23 (9):p. 685-715. 1999/09/01 **1999.**

- [56] Jongejan, F. and Uilenberg, G., The global importance of ticks. *Parasitology*.129 (SupplementS1):p. S3-S14. **2004**.
- [57] Jongejan, F. and Uilenberg, G., Ticks and control methods. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*.13 (4):p. 1201-1226. **1994**.
- [58] Despommier, D., Gwadz, R., Hotez, P., and Knirsch, C., The Arthropods. *Parasitic Diseases*.p. 227-248. **2000**.
- [59] Sparagano, O., Allsopp, M., Mank, R., Rijpkema, S., Figueroa, J., and Jongejan, F., Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. *Experimental & applied acarology*.23 (12):p. 929-960. **1999**.
- [60] Karaer, Z., Yukarı, B., and Aydın, L., Türkiye keneleri ve vektörlükleri. Alınmıştır: Özcel, M., Daldal, N. (Editörler) *Artropod Hastalıkları Vektörler*. s.p. 363-434. **1997**.
- [61] Bursali, A., Keskin, A., and Tekin, S., A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. *Experimental and Applied Acarology*. 57 (1):p. 91-104. 2012/05/01 **2012**.
- [62] Bursali, A., Keskin, A., Şimşek, E., Keskin, A., and Tekin, S., A survey of ticks (Acari: Ixodida) infesting some wild animals from Sivas, Turkey. *Experimental and Applied Acarology*. 66 (2):p. 293-299. **2015**.
- [63] Gargili, A., Kar, S., Yilmazer, N., Cerit, C., Sonmez, G., Sahin, F., *et al.*, Evaluation of ticks biting humans in Thrace Province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*.16 (Suppl-A):p. 141-146. **2010**.
- [64] Yesilbag, K., Aydın, L., Dincer, E., Alpay, G., Girisgin, A. O., Tuncer, P., *et al.*, Tick survey and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey. *Experimental and applied acarology*. 60 (2):p. 253-261. **2013**.
- [65] Aydın, L. and Bakirci, S., Geographical distribution of ticks in Turkey. *Parasitology Research*.101 (2):p. 163-166. **2007**.
- [66] Hekimoglu, O. and Özer, A. N., Distribution of hard tick species in Ankara, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*.39 (2):p. 256-262. **2015**.
- [67] Hekimoglu, O., Ozer, N., Ergunay, K., and Ozkul, A., Species distribution and detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in field-collected ticks in Ankara Province, Central Anatolia, Turkey. *Experimental and applied acarology*. 56 (1):p. 75-84. **2012**.

- [68] Bakirci, S., Sarali, H., Aydin, L., Eren, H., and Karagenc, T., Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey. *Experimental and applied acarology*.56 (2):p. 165-178. **2012.**
- [69] Estrada-Peña, A., Ostfeld, R. S., Peterson, A. T., Poulin, R., and de la Fuente, J., Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. *Trends in Parasitology*.30 (4):p. 205-214. **2014.**
- [70] Belozarov, V., Diapause and biological rhythms in ticks. *Physiology of ticks*.p. 469-500. **1982.**
- [71] Tälleklint-Eisen, L. and Lane, R. S., Spatial and temporal variation in the density of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Environmental Entomology*.29 (2):p. 272-280. **2000.**
- [72] Estrada-Peña, A., Ruiz-Fons, F., Acevedo, P., Gortazar, C., and la Fuente, J., Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean–Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic. *Journal of applied microbiology*.114 (1):p. 278-286. **2013.**
- [73] Barnard, D. R., Mechanisms of Host—Tick Contact with Special Reference to *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Beef Cattle Forage Areas. *Journal of medical entomology*.28 (5):p. 557-564. **1991.**
- [74] Lees, A. and Milne, A., The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L.). *Parasitology*.41 (3-4):p. 189-208. **1951.**
- [75] Gray, J. S., *Ixodes ricinus* seasonal activity: implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *International Journal of Medical Microbiology*.298:p. 19-24. **2008.**
- [76] Perret, J.-L., Guerin, P. M., Diehl, P. A., Vlimant, M., and Gern, L., Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology*.206 (11):p. 1809-1815. **2003.**
- [77] Perret, J.-L., Rais, O., and Gern, L., Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *Journal of medical entomology*.41 (3):p. 361-365. **2004.**
- [78] Perret, J.-L., Guigoz, E., Rais, O., and Gern, L., Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitology research*.86 (7):p. 554-557. **2000.**

- [79] Randolph, S., Green, R., Hoodless, A., and Peacey, M., An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *International journal for parasitology*.32 (8):p. 979-989. **2002**.
- [80] Estrada-Pena, A. and Venzal, J. M., Climate niches of tick species in the Mediterranean region: modeling of occurrence data, distributional constraints, and impact of climate change. *Journal of medical entomology*.44 (6):p. 1130-1138. **2007**.
- [81] Lindsay, L., Mathison, S., Barker, I., McEwen, S., Gillespie, T., and Surgeoner, G., Microclimate and habitat in relation to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) populations on Long Point, Ontario, Canada. *Journal of Medical Entomology*.36 (3):p. 255-262. **1999**.
- [82] Ogden, N., Barker, I., Beauchamp, G., Brazeau, S., Charron, D., Maarouf, A., *et al.*, Investigation of ground level and remote-sensed data for habitat classification and prediction of survival of *Ixodes scapularis* in habitats of southeastern Canada. *Journal of medical entomology*.43 (2):p. 403-414. **2006**.
- [83] Estrada-Peña, A., Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., and Nijhoff, A. M., Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Frontiers in cellular and infection microbiology*.3:p. 29. **2013**.
- [84] Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J., and Walker, A., Ticks of domestic animals in Mediterranean region, a guide to identification of species, published by University of Zaragoza. ed: Spain, **2004**.
- [85] Rosenzweig, M., Species diversity in space and time. Cambridge University Press, Cambridge, UK. ed, **1995**.
- [86] Sahney, S., Benton, M. J., and Falcon-Lang, H. J., Rainforest collapse triggered Carboniferous tetrapod diversification in Euramerica. *Geology*.38 (12):p. 1079-1082. **2010**.
- [87] Koch, C., Systematische übersicht über die Ordnung der Zecken. *Archiv für Naturgeschichte*.10 (1):p. 217-239. **1844**.
- [88] Neumann, G., Revision de la famille des Ixodides.(4e memoire.) *Mini. Soc. zool*. **1901**.
- [89] Schulze, P. and Schlotke, E., Bestimmungstabellen für das Zeckengenuss *Hyalomma* Koch s. str. *Sitzungsber. Abh. Naturforsch. Ges. Rostock*.2:p. 32-46. **1930**.
- [90] Apanaskevich, D. A. and Horak, I. G., The genus *Hyalomma* Koch, 1844: v. re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma)*

- marginatum* koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. International Journal of Acarology.34 (1):p. 13-42. 2008/03/01 **2008**.
- [91] Hoogstraal, H., The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. Journal of medical entomology.15 (4):p. 307-417. **1979**.
- [92] Latif, A. and Walker, A., An introduction to the biology and control of ticks in Africa. International Consortium on Ticks and Tick Borne Diseases (ICTTD-2) project. **2004**.
- [93] Apanaskevich, D. and Filippova, N., [Larval identification of species and subspecies of the genus *Hyalomma* (Acari: Ixodidae) from Russia and neighbouring territories]. Parazitologiya.41 (4):p. 268-283. **2006**.
- [94] Pomerantzev, B., Fauna of USSR Arachnida, Ixodid Ticks (Ixodidae) Paukoobraznye. The American Institute of Biological Sciences, Washington DC.p. 89-95. **1950**.
- [95] Hoogstraal, H., African Ixodoidea. VoI. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). African Ixodoidea. VoI. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). **1956**.
- [96] Apanaskevich, D., [Discrimination of subspecies in a polymorphic species *Hyalomma marginatum* (Acari, Ixodidae) based on adult stage]. Parazitologiya.38 (1):p. 20-32. **2003**.
- [97] Balashov, I. U. r. S., A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-Vectors of diseases of man and animals. ed.: Medical Zoology Department, US Naval Medical Research Unit no. 3, **1972**.
- [98] Enigk, K. and Grittner, I., Zur Zucht und Biologie der Zecken. Zeitschrift für Parasitenkunde.16 (1):p. 56-83. **1953**.
- [99] Petney, T., Robbins, R., Guglielmone, A., Apanaskevich, D., Estrada-Peña, A., Horak, I., *et al.*, A Look at the World of Ticks. in Progress in Parasitology. H. Mehlhorn, Springer Berlin Heidelberg. p. 283-296.**2011**
- [100] Ouhelli, H., Comparative development of *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *H. detritum* (Schulze, 1919), *H. anatolicum excavatum* (Koch, 1844), *H. lusitanicum* (Koch, 1844) and *H. dromedarii* (Koch, 1844) under laboratory conditions. Acta Parasitologica.39 (3):p. 153-157. **1994**.

- [101] Emelianova, I., "*Hyalomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) ticks of Central Precaucasia and surrounding territories.(Distribution, ecology, role in the natural foci of Crimean-Congo haemorrhagic fever)," MSc thesis in Biology. Stavropol: State University of Stavropol, p 146, **2006**.
- [102] Needham, G. R. and Teel, P. D., Off-host physiological ecology of Ixodid ticks. *Annual review of entomology*.36 (1):p. 659-681. **1991**.
- [103] Ergonul, O. and Whitehouse, C. A., Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. ed.: Springer, **2007**.
- [104] Hoogstraal, H., Changing patterns of tickborne diseases in modern society. *Annual review of entomology*.26 (1):p. 75-99. **1981**.
- [105] Bente, D. A., Forrester, N. L., Watts, D. M., McAuley, A. J., Whitehouse, C. A., and Bray, M., Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral research*.100 (1):p. 159-189. **2013**.
- [106] Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibáñez, P., Sánchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., *et al.*, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis*.18 (1):p. 179-180. **2012**.
- [107] Watts, D., Ksiazek, T., Linthicum, K., and Hoogstraal, H., Crimean-Congo hemorrhagic fever. *The arboviruses: epidemiology and ecology*.2:p. 177-260. **1988**.
- [108] Vatansever, Z., Uzun, R., Estrada-Pena, A., and Ergonul, O., Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*, Springer. p. 59-74.**2007**
- [109] Zeller, H., Cornet, J., and Camicas, J., Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in birds: field investigations in Senegal. *Research in virology*.145:p. 105-109. **1994**.
- [110] Zeller, H. G., Cornet, J.-P., Diop, A., and Camicas, J.-L., Crimean—Congo Hemorrhagic Fever in Ticks (Acari: Ixodidae) and Ruminants: Field Observations of an Epizootic in Bandia, Senegal (1989–1992). *Journal of medical entomology*.34 (5):p. 511-516. **1997**.
- [111] Nalca, A. and Whitehouse, C. A., Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection among animals. in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*, Springer. p. 155-165.**2007**
- [112] Wilson, M., Gonzalez, J.-P., Cornet, J.-P., and Camicas, J.-L., Transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus from experimentally infected sheep to *Hyalomma truncatum* ticks. *Research in virology*.142 (5):p. 395-404. **1991**.

- [113] Gordon, S. W., Linthicum, K. J., and Moulton, J., "Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two species of *Hyalomma* ticks from infected adults to cofeeding immature forms," DTIC Document 1993.
- [114] Chamberlain, J., Cook, N., Lloyd, G., Mioulet, V., Tolley, H., and Hewson, R., Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of general virology*.86 (12):p. 3337-3341. **2005.**
- [115] Hewson, R., Gmyl, A., Gmyl, L., Smirnova, S. E., Karganova, G., Jamil, B., *et al.*, Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*.85 (10):p. 3059-3070. **2004.**
- [116] Turell, M. J., Role of ticks in the transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. in *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*, Springer. p. 143-154. **2007**
- [117] Hartl, D. L., Clark, A. G., and Clark, A. G., *Principles of population genetics*. ed. vol. 116: Sinauer associates Sunderland, **1997.**
- [118] Balloux, F. and Lugon-Moulin, N., The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*.11 (2):p. 155-165. **2002.**
- [119] Waples, R. S. and Do, C., LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular ecology resources*.8 (4):p. 753-756. **2008.**
- [120] Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., Lillandt, B. G., Wennerberg, L., and Von Schantz, T., Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology*.9 (10):p. 1529-1538. **2000.**
- [121] Wright, S., The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*.p. 395-420. **1965.**
- [122] Weir, B. S. and Cockerham, C. C., Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*.p. 1358-1370. **1984.**
- [123] Goudet, J., Fstat (ver. 2.9. 4), a program to estimate and test population genetics parameters. ed, 2003.
- [124] Rousset, F., Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*.145 (4):p. 1219-1228. **1997.**
- [125] Lowe, A., Harris, S., and Ashton, P., *Ecological genetics: Design, analysis and application*. Blackwells. ed: oxford, 2004.

- [126] Kalinowski, S., Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity*.94 (1):p. 33-36. **2005**.
- [127] Ryman, N., Palm, S., André, C., Carvalho, G. R., Dahlgren, T. G., Jorde, P. E., *et al.*, Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Molecular Ecology*.15 (8):p. 2031-2045. **2006**.
- [128] Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P., Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*.155 (2):p. 945-959. **2000**.
- [129] Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K., Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*.164 (4):p. 1567-1587. **2003**.
- [130] Albert, V., Jonsson, B., and Bernatchez, L., Natural hybrids in Atlantic eels (*Anguilla anguilla*, *A. rostrata*): evidence for successful reproduction and fluctuating abundance in space and time. *Molecular ecology*.15 (7):p. 1903-1916. **2006**.
- [131] Lecis, R., Pierpaoli, M., Biro, Z., Szemethy, L., Ragni, B., Vercillo, F., *et al.*, Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Molecular Ecology*.15 (1):p. 119-131. **2006**.
- [132] Ostrowski, M., David, J., Santoni, S., Mckhann, H., Reboud, X., Le Corre, V., *et al.*, Evidence for a large-scale population structure among accessions of *Arabidopsis thaliana*: possible causes and consequences for the distribution of linkage disequilibrium. *Molecular Ecology*.15 (6):p. 1507-1517. **2006**.
- [133] Tautz, D. and Renz, M., Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*.12 (10):p. 4127-4138. **1984**.
- [134] Ellegren, H., Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*.5 (6):p. 435-445. **2004**.
- [135] Schlötterer, C. and Wiehe, T., Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. in *Microsatellites*, Oxford University Press. p. 238-248.**1999**
- [136] Schlötterer, C., Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*.109 (6):p. 365-371. **2000**.
- [137] Navajas, M. and Fenton, B., The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental & applied acarology*.24 (10-11):p. 751-774. **2000**.
- [138] Sharma, P. C., Grover, A., and Kahl, G., Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in biotechnology*.25 (11):p. 490-498. **2007**.

- [139] Guo, W.-J., Ling, J., and Li, P., Consensus features of microsatellite distribution: microsatellite contents are universally correlated with recombination rates and are preferentially depressed by centromeres in multicellular eukaryotic genomes. *Genomics*.93 (4):p. 323-331. **2009**.
- [140] Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., and Nevo, E., Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*.11 (12):p. 2453-2465. **2002**.
- [141] Tóth, G., Gáspári, Z., and Jurka, J., Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*.10 (7):p. 967-981. **2000**.
- [142] Morgante, M., Hanafey, M., and Powell, W., Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature genetics*.30 (2):p. 194-200. **2002**.
- [143] Field, D. and Wills, C., Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*.263 (1367):p. 209-215. **1996**.
- [144] Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., and Ben-Sasson, S. A., Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.93 (13):p. 6470-6475. **1996**.
- [145] Litt, M. and Luty, J. A., A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*.44 (3):p. 397. **1989**.
- [146] Tautz, D., Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*.17 (16):p. 6463-6471. **1989**.
- [147] Weber, J. L. and May, P. E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human genetics*.44 (3):p. 388. **1989**.
- [148] Eckert, K. A. and Hile, S. E., Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular carcinogenesis*.48 (4):p. 379-388. **2009**.
- [149] Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H., Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*.27 (4):p. 617-631. **2008**.
- [150] Hammock, E. A. and Young, L. J., Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science*.308 (5728):p. 1630-1634. **2005**.

- [151] Sunnucks, P., Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*.15 (5):p. 199-203. **2000**.
- [152] Jarne, P. and Lagoda, P. J., Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*.11 (10):p. 424-429. **1996**.
- [153] Selkoe, K. A. and Toonen, R. J., Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*.9 (5):p. 615-629. **2006**.
- [154] Glenn, T. C. and Schable, N. A., Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in enzymology*.395:p. 202-222. **2005**.
- [155] Schlötterer, C. and Tautz, D., Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*.20 (2):p. 211-215. **1992**.
- [156] FitzSimmons, N. N., Moritz, C., and Moore, S. S., Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*.12 (3):p. 432-440. **1995**.
- [157] Rico, C., Rico, I., and Hewitt, G., 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*.263 (1370):p. 549-557. **1996**.
- [158] Beck, N. R., Double, M. C., and Cockburn, A., Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution*.20 (1):p. 54-61. **2003**.
- [159] Eisen, J., Mechanistic basis for microsatellite instability. *Microsatellites: Evolution and applications*.1:p. 34-48. **1999**.
- [160] Weber, J. L. and Wong, C., Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics*.2 (8):p. 1123-1128. **1993**.
- [161] Bachtrog, D., Weiss, S., Zangerl, B., Brem, G., and Schlötterer, C., Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution*.16 (5):p. 602-610. **1999**.
- [162] Kimura, M. and Crow, J. F., The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*.49 (4):p. 725-738. **1964**.
- [163] Kimura, M. and Ohta, T., Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.75 (6):p. 2868-2872. **1978**.

- [164] Viard, F., Franck, P., Dubois, M.-P., Estoup, A., and Jarne, P., Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci, and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution*.47 (1):p. 42-51. **1998**.
- [165] Adams, R. I., Brown, K. M., and Hamilton, M. B., The impact of microsatellite electromorph size homoplasy on multilocus population structure estimates in a tropical tree (*Corythophora alta*) and an anadromous fish (*Morone saxatilis*). *Molecular ecology*.13 (9):p. 2579-2588. **2004**.
- [166] Curtu, A.-L., Finkeldey, R., and Gailing, O., Comparative sequencing of a microsatellite locus reveals size homoplasy within and between European oak species (*Quercus spp.*). *Plant Molecular Biology Reporter*.22 (4):p. 339-346. **2004**.
- [167] Garza, J. C. and Freimer, N. B., Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research*.6 (3):p. 211-217. **1996**.
- [168] Rousset, F., Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*.142 (4):p. 1357-1362. **1996**.
- [169] Blankenship, S. M., May, B., and Hedgecock, D., Evolution of a perfect simple sequence repeat locus in the context of its flanking sequence. *Molecular Biology and Evolution*.19 (11):p. 1943-1951. **2002**.
- [170] Epperson, B. K., Mutation at high rates reduces spatial structure within populations. *Molecular Ecology*.14 (3):p. 703-710. **2005**.
- [171] Slatkin, M., A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*.139 (1):p. 457-462. **1995**.
- [172] Estoup, A. and Cornuet, J., Microsatellite evolution: inferences from population data. *Microsatellites: evolution and applications*.49:p. 65. **1999**.
- [173] Paetkau, D. and Strobeck, C., The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular ecology*.4 (4):p. 519-520. **1995**.
- [174] Dakin, E. and Avise, J., Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*.93 (5):p. 504-509. **2004**.
- [175] Neff, B. D. and Gross, M. R., Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*.55 (9):p. 1717-1733. **2001**.
- [176] DeWoody, J. and Avise, J., Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*.56 (3):p. 461-473. **2000**.

- [177] Zane, L., Bargelloni, L., and Patarnello, T., Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*.11 (1):p. 1-16. **2002**.
- [178] Castoe, T. A., Poole, A. W., Gu, W., Jason de Koning, A., Daza, J. M., Smith, E. N., *et al.*, Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources*.10 (2):p. 341-347. **2010**.
- [179] Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., and Blaxter, M. L., Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*.12 (7):p. 499-510. **2011**.
- [180] Ossowski, S., Schneeberger, K., Clark, R. M., Lanz, C., Warthmann, N., and Weigel, D., Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome research*.18 (12):p. 2024-2033. **2008**.
- [181] Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., and Jackson, S. A., Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in biotechnology*.27 (9):p. 522-530. **2009**.
- [182] Garg, R., Patel, R. K., Tyagi, A. K., and Jain, M., De novo assembly of chickpea transcriptome using short reads for gene discovery and marker identification. *DNA research*.18 (1):p. 53-63. **2011**.
- [183] Malausa, T., Gilles, A., Meglecz, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., *et al.*, High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*.11 (4):p. 638-644. **2011**.
- [184] Stapley, J., Reger, J., Feulner, P. G., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., *et al.*, Adaptation genomics: the next generation. *Trends in ecology & evolution*.25 (12):p. 705-712. **2010**.
- [185] Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., *et al.*, Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular ecology resources*.11 (4):p. 591-611. **2011**.
- [186] Natarajan, P. and Parani, M., De novo assembly and transcriptome analysis of five major tissues of *Jatropha curcas* L. using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing. *BMC genomics*.12 (1):p. 1. **2011**.
- [187] Parchman, T. L., Geist, K. S., Grahnen, J. A., Benkman, C. W., and Buerkle, C. A., Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. *BMC genomics*.11 (1):p. 1. **2010**.

- [188] Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H., ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*.38 (16):p. e164-e164. **2010.**
- [189] Castoe, T. A., Poole, A. W., de Koning, A. J., Jones, K. L., Tomback, D. F., Oyler-McCance, S. J., *et al.*, Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS One*.7 (2):p. e30953. **2012.**
- [190] Mizrachi, E., Hefer, C. A., Ranik, M., Joubert, F., and Myburg, A. A., De novo assembled expressed gene catalog of a fast-growing Eucalyptus tree produced by Illumina mRNA-Seq. *BMC genomics*.11 (1):p. 1. **2010.**
- [191] Li, D., Deng, Z., Qin, B., Liu, X., and Men, Z., De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *BMC genomics*.13 (1):p. 1. **2012.**
- [192] Fu, N., Wang, Q., and Shen, H.-L., De novo assembly, gene annotation and marker development using Illumina paired-end transcriptome sequences in celery (*Apium graveolens* L.). *PloS one*.8 (2):p. e57686. **2013.**
- [193] Feldmeyer, B., Wheat, C. W., Krezdorn, N., Rotter, B., and Pfenninger, M., Short read Illumina data for the de novo assembly of a non-model snail species transcriptome (*Radix balthica*, *Basommatophora*, *Pulmonata*), and a comparison of assembler performance. *BMC genomics*.12 (1):p. 1. **2011.**
- [194] Reneker, J., Shyu, C.-R., Zeng, P., Polacco, J. C., and Gassmann, W., ACMES: fast multiple-genome searches for short repeat sequences with concurrent cross-species information retrieval. *Nucleic acids research*.32 (suppl 2):p. W649-W653. **2004.**
- [195] Grover, A., Aishwarya, V., and Sharma, P., Searching microsatellites in DNA sequences: approaches used and tools developed. *Physiology and Molecular Biology of Plants*.18 (1):p. 11-19. **2012.**
- [196] Tabachnick, W. J. t. and Black Iv, W., Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitology Today*.11 (1):p. 27-30. **1995.**
- [197] Hilburn, L. R. and Sattler, P. W., Are tick populations really less variable and should they be. *Heredity*.57 (1):p. 113-117. **1986.**
- [198] Bull, C. M., Andrews, R., and Adams, M., Patterns of genetic variation in a group of parasites, the Australian reptile ticks. *Heredity*.53 (5):p. 509-525. **1984.**

- [199] Wallis, G. and Miller, B., Electrophoretic analysis of the ticks *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* and *O.(P.) sonrai* (Acari: Argasidae). *Journal of medical entomology*.20 (5):p. 570-571. **1983**.
- [200] Kubasu, S., The ability of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae) stocks in Kenya to become infected with *Theileria parva*. *Bulletin of Entomological Research*.82 (03):p. 349-353. **1992**.
- [201] Sattler, P. W., Hilburn, L. R., Davey, R. B., George, J. E., Bernardo, J., and Avalos, R., Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of North American *Boophilus* (Acari: Ixodidae). *The Journal of parasitology*.p. 95-100. **1986**.
- [202] de Meeûs, T., McCoy, K. D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., *et al.*, Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête”. *Infection, Genetics and Evolution*.7 (2):p. 308-332. **2007**.
- [203] Schlötterer, C., The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*.5 (1):p. 63-69. **2004**.
- [204] Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A., A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*.34 (3):p. 1. **2002**.
- [205] Mangold, A. J., Bargues, M. D., and Mas-Coma, S., Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastricata* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*.84 (6):p. 478-484. 1998/05/01 **1998**.
- [206] Black, W. C. and Piesman, J., Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.91 (21):p. 10034-10038. October 11, 1994 **1994**.
- [207] Norris, D. E., Klompen, J., Keirans, J. E., and Black, W. C., Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology*.33 (1):p. 78-89. **1996**.
- [208] Beati, L. and Keirans, J. E., Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*.87 (1):p. 32-48. **2001**.
- [209] Guzinski, J., Saint, K. M., Gardner, M. G., Donnellan, S. C., and Bull, C. M., Permanent genetic resources: Development of microsatellite markers and analysis of

- their inheritance in the Australian reptile tick, *Bothriocroton hydrosauri*. *Molecular ecology resources*.8 (2):p. 443-445. **2008**.
- [210] Leo, S., Davis, C., and Sperling, F., Characterization of 14 microsatellite loci developed for *Dermacentor albipictus* and cross-species amplification in *D. andersoni* and *D. variabilis* (Acari: Ixodidae). *Conservation Genetics Resources*.4 (2):p. 379-382. **2012**.
- [211] Dharmarajan, G., Fike, J. A., and Beasley, J. C., Development and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in the American dog tick (*Dermacentor variabilis*). *Molecular ecology resources*.9 (1):p. 131-133. **2009**.
- [212] Van Houtte, N., Van Oosten, A. R., Jordaens, K., Matthysen, E., Backeljau, T., and Heylen, D. J. A., Isolation and characterization of ten polymorphic microsatellite loci in *Ixodes arboricola*, and cross-amplification in three other *Ixodes* species. *Experimental and Applied Acarology*.61 (3):p. 327-336. 2013/11/01 **2013**.
- [213] Fagerberg, A. J., Fulton, R. E., and Black Iv, W. C., Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*.10 (3):p. 225-236. **2001**.
- [214] Dharmarajan, G., Beasley, J., and Rhodes, O., Heterozygote deficiencies in parasite populations: an evaluation of interrelated hypotheses in the raccoon tick, *Ixodes texanus*. *Heredity*.106 (2):p. 253-260. **2011**.
- [215] McCoy, K. D. and Tirard, C., Isolation and characterization of microsatellites in the seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Molecular Ecology*.9 (12):p. 2212-2213. **2000**.
- [216] Araya-Anchetta, A., A study of macro and micro-evolutionary factors determining population genetics in ticks. Flagstaff, Arizona: Dissertation: Northern Arizona University. **2012**.
- [217] Chigagure, N. N., Baxter, G. D., and Barker, S. C., Microsatellite loci of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*.24 (12):p. 951-956. **2000**.
- [218] Cutullé, C., Jonsson, N., and Seddon, J., Population structure of Australian isolates of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary parasitology*.161 (3):p. 283-291. **2009**.
- [219] Kirchoff, V. S., Peacock, M. M., and Teglas, M. B., Identification and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the argasid tick *Ornithodoros coriaceus*. *Molecular ecology resources*. **2008**.

- [220] Li, X. and Dunley, J., Optimal sampling and spatial distribution of *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor variabilis* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*.22 (4):p. 233-248. 1998/04/01 **1998**.
- [221] Castro, M. B. and Clover, J. R., A comparison of visual and flagging methods for estimating adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) tick abundance. *Journal of Vector Ecology*.35 (2):p. 435-438. **2010**.
- [222] Kensinger, B. J. and Allan, B. F., Efficacy of Dry Ice-Baited Traps for Sampling *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) Varies with Life Stage but Not Habitat. *Journal of medical entomology*.48 (3):p. 708-711. 2011/05/01 **2011**.
- [223] Apanaskevich, D. and Horak, I., the genus *Hyalomma* Koch, 1844. II. Taxonomic status of *H.(Euhyalomma) anatolicum* Koch, 1844, *H.(E.) excavatum* Koch, 1844 (Acari, Ixodidae) with redescrptions of all stages. *Acarina*.13 (2):p. 181-197. **2005**.
- [224] Apanaskevich, D. A., Filippova, N. A., and Horak, I. G., The genus *Hyalomma* Koch, 1844. X. Redescription of all parasitic stages of *H.(Euhyalomma) scupense* Schulze, 1919 (= *H. detritum* Schulze)(Acari: Ixodidae) and notes on its biology. **2010**.
- [225] Apanaskevich, D., [Host-parasite relationships of the genus *Hyalomma* Koch, 1844 (Acari, Ixodidae) and their connection with microevolutionary process]. *Parazitologiya*.38 (6):p. 515-523. **2003**.
- [226] Beati, L., Nava, S., Burkman, E. J., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Guglielmone, A. A., et al., *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC evolutionary biology*.13 (1):p. 267. **2013**.
- [227] Martins, W. S., Lucas, D. C. S., Neves, K. d. S., and Bertioli, D. J., WebSat—a web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics*.3 (6):p. 282-283. **2009**.
- [228] Coombs, J., Letcher, B., and Nislow, K., CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*.8 (3):p. 578-580. **2008**.
- [229] Wright, S., Fisher and Ford on" The Sewall Wright Effect". *American Scientist*.39 (3):p. 452-479. **1951**.
- [230] Rosenberg, N. A. and Nordborg, M., A general population-genetic model for the production by population structure of spurious genotype–phenotype associations in discrete, admixed or spatially distributed populations. *Genetics*.173 (3):p. 1665-1678. **2006**.

- [231] Earl, D. A., STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetics resources.4 (2):p. 359-361. **2012.**
- [232] Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular ecology.14 (8):p. 2611-2620. **2005.**
- [233] Jakobsson, M. and Rosenberg, N. A., CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics.23 (14):p. 1801-1806. **2007.**
- [234] Rosenberg, N. A., DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes.4 (1):p. 137-138. **2004.**
- [235] Koc, S., Aydın, L., and Cetin, H., Tick species (Acari: Ixodida) in Antalya City, Turkey: species diversity and seasonal activity. Parasitology research.114 (7):p. 2581-2586. **2015.**
- [236] Apanaskevich, D., [Differentiation of closely related species *Hyalomma anatolicum* and *H. excavatum* (Acari: Ixodidae) based on a study of all life cycle stages, throughout entire geographical range]. Parazitologiya.37 (4):p. 259-280. **2002.**
- [237] Apanaskevich, D. and Horak, I., The genus *Hyalomma*. XI. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) asiaticum* (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. Experimental and Applied Acarology.52 (2):p. 207-220. 2010/10/01 **2010.**
- [238] Jin, L. and Chakraborty, R., Population structure, stepwise mutations, heterozygote deficiency and their implications in DNA forensics. Heredity.74 (3):p. 274-285. **1995.**
- [239] Schlötterer, C., Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? Current Biology.8 (4):p. R132-R134. **1998.**
- [240] Hedrick, P. W., Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution.p. 313-318. **1999.**
- [241] Queller, D. C., Strassmann, J. E., and Hughes, C. R., Microsatellites and kinship. Trends in Ecology & Evolution.8 (8):p. 285-288. **1993.**
- [242] Kalinowski, S. T., How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? Heredity.88 (1):p. 62-65. **2002.**
- [243] Ruzzante, D. E., A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.55 (1):p. 1-14. **1998.**

- [244] Gomez-Uchida, D. and Banks, M. A., Microsatellite analyses of spatial genetic structure in darkblotched rockfish (*Sebastes crameri*): Is pooling samples safe? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.62 (8):p. 1874-1886. **2005.**
- [245] Nagylaki, T., Fixation indices in subdivided populations. Genetics.148 (3):p. 1325-1332. **1998.**
- [246] Chevillon, C., Koffi, B. B., Barré, N., Durand, P., Arnathau, C., and De Meeûs, T., Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmission patterns: pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Infection, Genetics and Evolution.7 (2):p. 298-304. **2007.**
- [247] Heylen, D. and Matthysen, E., Contrasting detachment strategies in two congeneric ticks (Ixodidae) parasitizing the same songbird. Parasitology.137 (04):p. 661-667. **2010.**
- [248] McCoy, K., Boulinier, T., Tirard, C., and Michalakis, Y., Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. Journal of Evolutionary Biology.14 (3):p. 395-405. **2001.**
- [249] McCoy, K. D., Boulinier, T., and Tirard, C., Comparative host–parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. Molecular Ecology.14 (9):p. 2825-2838. **2005.**
- [250] Kempf, F., Boulinier, T., De Meeûs, T., Arnathau, C., and McCOY, K. D., Recent evolution of host-associated divergence in the seabird tick *Ixodes uriae*. Molecular Ecology.18 (21):p. 4450-4462. **2009.**
- [251] Hoogstraal, H., Kaiser, M. N., Traylor, M. A., Guindy, E., and Gaber, S., Ticks (Ixodidae) on birds migrating from Europe and Asia to Africa, 1959-61. Bulletin of the World Health Organization.28 (2):p. 235. **1963.**
- [252] Nuorteva, P. and Hoogstraal, H., The Incidence of Ticks (Ixodoidea, Ixodidae) on Migratory Birds arriving in Finland during the Spring of 1962. Ann. Med. Exper. et Biol. Fenniae.41 (4):p. 457-68. **1963.**
- [253] Anderson, J. F. and Magnarelli, L. A., Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. The Yale journal of biology and medicine.57 (4):p. 627. **1984.**
- [254] Mehl, R., Michaelsen, J., and Lid, G., Ticks (Acari, Ixodides) on migratory birds in Norway. Fauna Norv Ser B.31:p. 46-58. **1984.**
- [255] Weisbrod, A. and Johnson, R. C., Lyme disease and migrating birds in the Saint Croix River Valley. Applied and Environmental Microbiology.55 (8):p. 1921-1924. **1989.**

- [256] Stafford, K. C., Bladen, V. C., and Magnarelli, L. A., Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds (Aves) and white-footed mice in Lyme, CT. *Journal of Medical Entomology*.32 (4):p. 453-466. **1995.**
- [257] Olsen, B., Duffy, D. C., Jaenson, T., Gylfe, A., Bonnedahl, J., and Bergström, S., Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. *Journal of Clinical Microbiology*.33 (12):p. 3270-3274. **1995.**
- [258] Nicholls, T. H. and Callister, S. M., Lyme disease spirochetes in ticks collected from birds in midwestern United States. *Journal of medical entomology*.33 (3):p. 379-384. **1996.**
- [259] Smith, R. P., Rand, P. W., Lacombe, E. H., Morris, S. R., Holmes, D. W., and Caporale, D. A., Role of bird migration in the long-distance dispersal of *Ixodes dammini*, the vector of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*.174 (1):p. 221-224. **1996.**
- [260] Ishiguro, F., Takada, N., Masuzawa, T., and Fukui, T., Prevalence of Lyme disease *Borrelia spp.* in ticks from migratory birds on the Japanese mainland. *Applied and environmental microbiology*.66 (3):p. 982-986. **2000.**
- [261] Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., Semenov, A. V., and Bolshakov, C. V., Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *Journal of Medical Entomology*.38 (4):p. 471-474. **2001.**
- [262] Bjöersdorff, A., Bergström, S., Massung, R. F., Haemig, P. D., and Olsen, B., Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerging Infectious Diseases*.7 (5):p. 877. **2001.**
- [263] Scharf, W. C., Immature ticks on birds: temporal abundance and reinfestation. *Northeastern Naturalist*.11 (2):p. 143-150. **2004.**
- [264] Comstedt, P., Bergstrom, S., Olsen, B., Garpmo, U., Marjavaara, L., Mejlön, H., *et al.*, Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerging infectious diseases*.12 (7) **2006.**
- [265] Poupon, M.-A., Lommano, E., Humair, P.-F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., *et al.*, Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*.72 (1):p. 976-979. **2006.**
- [266] Ogden, N., Lindsay, L., Hanincova, K., Barker, I., Bigras-Poulin, M., Charron, D., *et al.*, Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Applied and environmental microbiology*.74 (6):p. 1780-1790. **2008.**

- [267] Hasle, G., Bjune, G., Edvardsen, E., Jakobsen, C., Linnehol, B., Røer, J. E., *et al.*, Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *Journal of Parasitology*.95 (6):p. 1342-1351. **2009**.
- [268] Hasle, G., Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. The biology and ecology of ticks shape the potential for the transmission of zoonotic pathogens. **2015**.
- [269] Olsén, B., Jaenson, T., and Bergström, S., Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology*.61 (8):p. 3082-3087. **1995**.
- [270] Gylfe, Å., Bergström, S., Lundström, J., and Olsen, B., Epidemiology: reactivation of *Borrelia* infection in birds. *Nature*.403 (6771):p. 724-725. **2000**.
- [271] Hanincova, K., Schäfer, S., Etti, S., Sewell, H.-S., Taragelova, V., Ziak, D., *et al.*, Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*.126 (01):p. 11-20. **2003**.
- [272] Kjelland, V., Stuen, S., Skarpaas, T., and Slettan, A., *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*.52 (1):p. 1. **2010**.
- [273] Franke, J., Hildebrandt, A., and Dorn, W., Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes—updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks and tick-borne diseases*.4 (1):p. 11-25. **2013**.
- [274] Socolovschi, C., Reynaud, P., Kernif, T., Raoult, D., and Parola, P., Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks and tick-borne diseases*.3 (5):p. 355-360. **2012**.
- [275] Daniels, T. J., Battaly, G. R., Liveris, D., Falco, R. C., and Schwartz, I., Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerging infectious diseases*.8 (12):p. 1524-1525. **2002**.
- [276] Hasle, G., Dispersal of ticks and tick-borne pathogens by birds: Dynamics of birds' transport of ticks to Norway. **2011**.
- [277] Elfving, K., Olsen, B., Bergström, S., Waldenström, J., Lundkvist, Å., Sjöstedt, A., *et al.*, Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. *PLoS One*.5 (1):p. e8572. **2010**.

- [278] Waldenstrom, J., Lundkvist, A., Falk, K. I., Garpmo, U., Bergstrom, S., Lindegren, G., *et al.*, Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerging infectious diseases*.13 (8):p. 1215. **2007**.
- [279] Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O., Leivits, A., Järvekülg, L., and Golovljova, I., Tick-borne pathogens in ticks feeding on migratory passerines in western part of Estonia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.13 (7):p. 443-448. **2013**.
- [280] Marsot, M., Henry, P.-Y., Vourc'h, G., Gasqui, P., Ferquel, E., Laignel, J., *et al.*, Which forest bird species are the main hosts of the tick, *Ixodes ricinus*, the vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, during the breeding season? *International journal for parasitology*.42 (8):p. 781-788. **2012**.
- [281] Keskin, A. and Erciyas-Yavuz, K., A Preliminary Investigation on Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Birds in Kızılırmak Delta, Turkey. *Journal of medical entomology*.53 (1):p. 217-220. **2016**.
- [282] Leblebicioglu, H., Eroglu, C., Erciyas-Yavuz, K., Hokelek, M., Acici, M., and Yilmaz, H., Role of migratory birds in spreading Crimean-Congo hemorrhagic fever, Turkey. *Emerging infectious diseases*.20 (8):p. 1331. **2014**.
- [283] Fisher, R. A., Has Mendel's work been rediscovered? *Annals of Science*.1 (2):p. 115-137. **1936**.
- [284] Lachenbruch, P. A., Note on initial misclassification effects on the quadratic discriminant function. *Technometrics*.21 (1):p. 129-132. **1979**.
- [285] Araya-Anchetta, A., Busch, J. D., Scoles, G. A., and Wagner, D. M., Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution*.29:p. 164-179. **2015**.
- [286] Kaiser, M. N., Hoogstraal, H., and Watson, G. E., Ticks (Ixodoidea) on migrating birds in Cyprus, fall 1967 and spring 1968, and epidemiological considerations. *Bulletin of Entomological research*.64 (01):p. 97-110. **1974**.
- [287] Jameson, L. J., Morgan, P. J., Medlock, J. M., Watola, G., and Vaux, A. G., Importation of *Hyalomma marginatum*, vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, into the United Kingdom by migratory birds. *Ticks and tick-borne diseases*.3 (2):p. 95-99. **2012**.
- [288] Dietrich, M., Kempf, F., Boulinier, T., and McCoy, K. D., Tracing the colonization and diversification of the worldwide seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Molecular ecology*.23 (13):p. 3292-3305. **2014**.

- [289] Dietrich, M., Kempf, F., Gómez-Díaz, E., Kitaysky, A. S., Hipfner, J. M., Boulinier, T., *et al.*, Inter-oceanic variation in patterns of host-associated divergence in a seabird ectoparasite. *Journal of biogeography*.39 (3):p. 545-555. **2012.**
- [290] McCoy, K., Barbosa, A., and Cuervo, J. J., Population genetic structure and colonisation of the western Antarctic Peninsula by the seabird tick *Ixodes uriae*. **2012.**
- [291] McCoy, K. D., Boulinier, T., Chardine, J. W., Danchin, E., and Michalakis, Y., Dispersal and distribution of the tick *Ixodes uriae* within and among seabird host populations: the need for a population genetic approach. *The Journal of parasitology*.p. 196-202. **1999.**
- [292] McCoy, K. D., Boulinier, T., Tirard, C., and Michalakis, Y., Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology*.14 (3):p. 395-405. **2001.**
- [293] McCoy, K. D., Boulinier, T., Tirard, C., and Michalakis, Y., Host-Dependent Genetic Structure Of Parasite Populations: Differential Dispersal Of Seabird Tick Host Races. *Evolution*.57 (2):p. 288-296. **2003.**
- [294] McCoy, K. D., Chapuis, E., Tirard, C., Boulinier, T., Michalakis, Y., Le Bohec, C., *et al.*, Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.272 (1579):p. 2389-2395. **2005.**
- [295] McCoy, K. D. and Tirard, C., Reproductive strategies of the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*.88 (4):p. 813-816. **2002.**
- [296] McCoy, K. D., Léger, E., and Dietrich, M., Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *The biology and ecology of ticks shape the potential for the transmission of zoonotic pathogens*. **2015.**
- [297] Daniel, M. and Dusbabek, F., Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment. vol. 91, ed: Oxford University Press New York, NY, Oxford, 1994, p. 138.
- [298] Mild, M., Simon, M., Albert, J., and Mirazimi, A., Towards an understanding of the migration of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of General Virology*.91 (1):p. 199-207. **2010.**
- [299] Alerstam, T. and Christie, D. A., *Bird migration*. ed.: Cambridge University Press, **1993.**

- [300] Tibayrenc, M., Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International journal for parasitology*.28 (1):p. 85-104. **1998.**
- [301] Prugnolle, F. and De Meeûs, T., Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*.88 (3):p. 161-165. **2002.**
- [302] Piesman, J., Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North America. Lyme borreliosis: biology, epidemiology, and control. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International.p. 223-49. **2002.**
- [303] Wesson, D. M., McLain, D. K., Oliver, J. H., Piesman, J., and Collins, F. H., Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.90 (21):p. 10221-10225. November 1, 1993 **1993.**
- [304] LoGiudice, K., Ostfeld, R. S., Schmidt, K. A., and Keesing, F., The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.100 (2):p. 567-571. January 21, 2003 **2003.**
- [305] Telford 3rd, S., The name *Ixodes dammini* epidemiologically justified. *Emerging infectious diseases*.4 (1):p. 132. **1998.**
- [306] Camicas, J.-L., Hervy, J.-P., Adam, F., and Morel, P.-C., The ticks of the world (Acarida, Ixodida): nomenclature, described stages, hosts, distribution. ed.: Éditions de l'ORSTOM, **1998.**
- [307] Parola, P., Paddock, C. D., and Raoult, D., Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical microbiology reviews*.18 (4):p. 719-756. **2005.**
- [308] Otranto, D., Dantas-Torres, F., and Breitschwerdt, E. B., Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in parasitology*.25 (4):p. 157-163. **2009.**
- [309] Bowman, D. D., Introduction to the alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. *Topics in companion animal medicine*.26 (4):p. 173-177. **2011.**
- [310] Labruna, M. B., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J. M., Dolz, G., *et al.*, Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*.16 (2):p. 2435-2457. **2011.**

- [311] Estrada-Peña, A., Vatansever, Z., Gargili, A., and Ergönul, Ö., The trend towards habitat fragmentation is the key factor driving the spread of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiology and Infection*.138 (08):p. 1194-1203. **2010**.
- [312] Estrada-Peña, A., Zatansever, Z., Gargili, A., Aktas, M., Uzun, R., Ergonul, O., *et al.*, Modeling the spatial distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreaks in Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.7 (4):p. 667-678. **2007**.
- [313] Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., and Lounibos, L. P., Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-borne and zoonotic diseases*.7 (1):p. 76-85. **2007**.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Olcay Hekimoğlu

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : olcayh@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekoloji ABD Beytepe
Kampüsü, 06800 Beytepe Ankara

Eğitim

Lise : Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi, 2001

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanlar
Bölümü, 2007

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2010

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2016

Yabancı Dil ve Düzeyi

Almanca: İyi

İngilizce: İyi

İş Deneyimi

Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi, 2010-

Deneyim Alanları

Kene gruplarının sistematik durumlarının morfolojik ve moleküler filogenetik analizlerle yeniden değerlendirilmesi,

Kenelerin tür içi genetik yapısının araştırılması.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. Türkiye’de Dağılım Gösteren *Hyalomma marginatum* Koch, 1844’ün Populasyon Yapısına yönelik Araştırmalar. Özer Ayşe Nurdan, Hacettepe Üniversitesi BAB Uluslararası Katılımlı Proje, FUA-2015-5895, (82000 TL)

2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Vektörü *Hyalomma marginatum*'un Türkiye'deki Dağılımına Yönelik Çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi BAB Destek Projesi, FHD-2015-5343, (19800 TL)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Hekimoğlu O., Ozer A.N. Distribution of hard tick species in Ankara, Turkey. Turk J Zool, (2015), 39: 256-262.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Hekimoğlu O., N. Özer. Distribution of Hard Tick Species in Central and Southwest Regions of Turkey. 19th E-SOVE Conference 2014, Thessaloniki, Greece.

Tez Döneminde Tezden Bağımsız Üretilmiş Yayınlar

1. Hekimoğlu O., Sağlam İ.K., Özer N., Estrada-Pena, Agustin. 2016. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. Ticks Tick-borne Dis, 7(5), 798-807



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 01/09/2016

Tez Başlığı / Konusu: Türkiye'de Dağılım Gösteren *Hyalomma marginatum* Koch, 1844'ün Populasyon Yapısına Yönelik Araştırmalar

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 45 sayfalık kısmına ilişkin, 01/09/2016 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4' tür.

Uygulanan filtrelemeler:


- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Olcay Hekimoğlu
Öğrenci No: N10143337
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Ekoloji
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.


01.09.2016

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



Prof. Dr. Ayşe Nurdan Özer