

**TÜRKİYE'DE BULUNAN KUM SİNEĞİ TÜRLERİNDE
(DIPTERA: PSYCHODIDAE) *CACOPHONY* VE *PERIOD*
GEN BÖLGELERİNİN VARYASYONU**

**VARIATION OF *CACOPHONY* AND *PERIOD* GENE
REGIONS IN SAND FLY SPECIES (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) IN TURKEY**

BEGÜM KARAOĞLU

DOÇ. DR. ÖZGE ERİŞÖZ KASAP

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

ÖZET

TÜRKİYE'DE BULUNAN KUM SİNEĞİ TÜRLERİNDE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) *CACOPHONY* VE *PERIOD* GEN BÖLGELERİNİN VARYASYONU

Begüm KARAOĞLU

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özge ERİŞÖZ KASAP

Ocak 2020, xiii+139 sayfa

Kum sinekleri insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren birçok patojenin taşınmasında etkilidir. Vektör-patojen ilişkisinin doğru kurulabilmesi için tür teşhisi, en önemli adımı oluşturmaktadır. Kum sinekleri temelde morfolojik karakterler kullanılarak birbirlerinden ayrılırken; yakın akraba türleri ve tür komplekslerinin üyelerini birbirlerinden ayırmak oldukça zordur. Kum sineği davranışıyla ilgili genlerin yakın akraba türleri ve tür komplekslerini ayırmada başarılı olduğu bilinmektedir. Çalışmanın amacı, kum sineklerinin kur yapma davranışı ile ilgili *cacophony* ve *period* genleri kullanılarak Türkiye'de çok çeşitli coğrafi kökenlerden toplanan kum sineği türleri içindeki ve arasındaki farklılıkları ortaya koymaktır.

Analizler, Türk kum sineği faunasının temsilcisi olan 16 tür / tür kompleksine ait toplam 884 örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yukarıda belirtilen genlerin amplifikasyonundan sonra tür içi ve türler arası uzaklıklar hesaplandı, filogenetik ağaçlar oluşturuldu ve populasyonların genetik analizleri yapıldı. Bu genlerin farklı türler ve tür komplekslerinin üyeleri arasındaki ayırım gücü de tartışıldı.

Cacophony geni için elde edilen sonuçlar türler arası mesafe değerlerinin *Paraphlebotomus* alt cinsinde %1.34-%14.36, *Larroussius* alt cinsinde %4.23-%10.34, *Adlerius* alt cinsinde %0.93-%31.86, *Transphlebotomus* alt cinsinde %5.15-%7.55, *Sergentomyia* alt cinsinde %18 arasında değiştiğini göstermiştir. *Period* geni için türler arası genetik uzaklık değerleri *Paraphlebotomus* alt cinsinde %1.94-%12.77 arasında değişmiş; *Larroussius* ve *Adlerius* alt cinsinde sırasıyla %6 ve %7 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen *cacophony* ve *period* genlerinin Türkiye'deki tüm kum sineği türlerinin ayırt edilmesinde başarılı ve tür komplekslerinin üyelerinin belirlenmesinde kullanışlı oldukları bulunmuştur. Buna ek olarak *cacophony* geni kullanılarak *Phlebotomus major* kompleksi üyeleri arasında olası bir hibridizasyon durumu tespit edilmiştir. Tüm sonuçların birlikte değerlendirilmesi, hem *cacophony* hem de *period* geninin kum sineği taksonomisinde kullanılabilecek önemli moleküler belirteçler olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kur davranışı, kur şarkısı, *cacophony*, *period*, Kum sineği, Türkiye

ABSTRACT

VARIATION OF *CACOPHONY* AND *PERIOD* GENE REGIONS IN SAND FLY SPECIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) IN TURKEY

Begüm KARAOĞLU

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özge ERİŞÖZ KASAP

January 2020, xiii+139 pages

Sand flies are important in transporting many pathogens which are closely related to human and animal health. Specimen identification is the most important step in establishing the vector-pathogen relationship correctly. While specimen identification of sand flies basically relies on traditional approaches, it is difficult to make a robust discrimination between the members of species complexes and between closely related species using only morphological characters. Genes related to sand fly behavior have been reported to be successful in distinguishing between the closely related species and species complexes. The aim of this study was to reveal the variations within and between the sand fly species collected from a wide range of geographical origins in Turkey using *cacophony* and *period* genes that are related to courtship behavior of sand flies.

The analyses were conducted using a total of 884 specimens belonging to 16 species/species complexes that are the representatives of Turkish sand fly fauna. Intraspecific and interspecific distances were estimated, phylogenetic trees were

constructed and genetic analyses of populations were performed after the amplification of above mentioned genes. The discrimination power of these genes between the different species and members of species complexes were also discussed.

Results obtained for *cacophony* gene showed that the interspecific distance values range between 1.34% - 14.36% in *Paraphlebotomus* subgenus, 4.23% - 10.34% in *Larroussius* subgenus, 0.93% - 31.86% in *Adlerius* subgenus, 7.55% - 5.15% in *Transphlebotomus* subgenus and 18.00% in *Sergentomyia* subgenus. For the *period* gene, the interspecific distance values were ranged between 1.94% -12.77% in *Paraphlebotomus* subgenus and estimated as 6% and 7% in *Larroussius* and in *Adlerius* subgenera, respectively. Both *cacophony* and *period* genes evaluated in this study were found to be successful in discrimination of all sand fly species in Turkey, and helpful for the delineation of the members of the species complexes. Moreover, using the *cacophony* gene a possible hybridization event was identified between the members of *Phlebotomus major* complex for the first time. Evaluation of all results together showed that both *cacophony* and *period* genes are important molecular markers which can be used in sand fly taxonomy.

Keywords: Courtship behavior, Love songs, *cacophony*, *period*, Sand fly, Turkey

TEŞEKKÜR

Laboratuvarda çalışmaya başladığım ilk günden bugüne kadar akademik bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, tüm fikirlerimi dilediğim gibi denemem için özgür ve huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, desteği ve inancıyla her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve tez süresince gösterdiği yoğun ilgi ile hem bilimsel hem de manevi katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özge Erişöz Kasap'a,

Lisans eğitimimden bu yana maddi manevi her konuda bana destek olan, ilgisini ve inancını her zaman hissettiğim, bilgisi ve deneyimiyle bana yol gösteren hocam Sayın Prof. Dr. Bülent Alten'e,

Moleküler çalışmalarımızın bir kısmını gerçekleştirdiğimiz A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü'nün imkanlarından yararlanmamızı sağlayan Prof. Dr. Aykut Özkul'a ve Prof. Dr. Hilal Özdağ'a; laboratuvardaki yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin ve ekibine,

Her zaman yanımda olan değerli dostlarım Pınar Kurtoğlu, Memet Gözübüyük ve Murat Can Demirok'a; desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Beril Erdem'e,

Birçok projede, araştırmada ve çalışmada birlikte yer aldığımız, her zaman desteklerini ve yardımlarını hissettiğim değerli ekip arkadaşlarım Gizem Oğuz, Ayda Yılmaz, Sevilay Karagül ve Kıvanç Sevim'e; maddi ve manevi her türlü desteği için Dr. Filiz Günay'a,

Hayattaki en büyük destekçim olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kum Sineklerinin Biyolojisi ve Vektöriyel Önemi	1
1.2. Kum Sineklerinin Sınıflandırılması	2
1.3. Kum Sineklerinde Tür Teşhisi	3
1.3.1. Morfolojik Yöntemler	4
1.3.2. Moleküler Yöntemler	6
1.4. Kum Sineklerinde Kur Davranışı	7
1.5. Kum Sineklerinde Kur Davranışını Kontrol Eden Genler	8
1.6. <i>cacophony</i> ve <i>period</i> Gen Bölgelerinin Kum Sineklerinin Tür Tanımlamasındaki Önemi	11
2. YÖNTEM	13
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Örnekler	13
2.2. Laboratuvar Çalışmaları	15
2.2.1. <i>cacophony</i> Geninin Amplifikasyonu	15
2.2.2. <i>cacophony</i> Geninin DNA Dizi Analizi	16
2.2.3. Heterozigot İnsersiyon/Delesyon Görülen Bireylerin Klonlanması ...	17
2.2.4. <i>period</i> Geninin Amplifikasyonu	27
2.2.5. <i>period</i> Geninin DNA Dizi Analizi	31
2.3. DNA Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi	31
3. BULGULAR	32
3.1. <i>cacophony</i> Geni İçin Elde Edilen Bulgular	32
3.1.1. <i>Phlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	32
3.1.2. <i>Paraphlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	33

3.1.3. <i>Larroussius</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	41
3.1.4. <i>Adlerius</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular.....	63
3.1.5. <i>Transphlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	72
3.1.6. <i>Sergentomyia</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	77
3.2. <i>period</i> Geni için Elde Edilen Bulgular	84
3.2.1. <i>Phlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular.....	84
3.2.2. <i>Paraphlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	84
3.2.3. <i>Larroussius</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	93
3.2.4. <i>Adlerius</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular.....	106
3.2.5. <i>Transphlebotomus</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular	111
3.2.6. <i>Sergentomyia</i> Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular ...	111
4. TARTIŞMA.....	115
5. KAYNAKLAR	132
ÖZGEÇMİŞ.....	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dişi kum sineklerinin morfolojik teşhisinde kullanılan başlıca karakterler.....	5
Şekil 1.2.	Erkek kum sineklerinin morfolojik teşhisinde kullanılan başlıca karakterler..	5
Şekil 1.3.	Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı α -1 alt ünitesi ve IVS6 domaininin şematik gösterimi	9
Şekil 1.4.	<i>period</i> geni bölümlerinin şematik gösterimi	10
Şekil 2.1.	<i>P. tobbi</i> 'nin <i>cacophony</i> geni ve primerlerin gen dizisi üzerindeki yerleşimleri.	15
Şekil 2.2.	Heterozigot <i>P. tobbi</i> örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	17
Şekil 2.3.	<i>S. minuta</i> türüne ait iki farklı (A ve B) bireyden elde edilen farklı heterozigotluk örüntüsü.....	18
Şekil 2.4.	<i>P. major</i> s.l. (A) ve <i>P. kandelakii</i> s.l. (B) türlerine ait farklı heterozigotluk örüntüsü	19
Şekil 2.5.	TA Klonlama yönteminin şeması	21
Şekil 2.6.	Koloni PZR'da örneklerin ve örneklere ait kolonilerin plate'te yerleşiminin şematik görüntüsü.....	24
Şekil 2.7.	pCR 2.1 vektörün haritası.....	25
Şekil 3.1.	<i>cacophony</i> geni amplifikasyonu gerçekleştirilen <i>P. papatasi</i> bireylerine ait örnek agaroz jel elektroforezi görüntüsü	32
Şekil 3.2.	<i>Cacophony</i> geni DNA dizi analizi gerçekleştirilen <i>P. papatasi</i> bireyleri için örnek kromatogram görüntüsü	33
Şekil 3.3.	<i>Paraphlebotomus</i> alt cinsine ait türlerin <i>cacophony</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri	37
Şekil 3.4.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Paraphlebotomus</i> alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	39
Şekil 3.5.	<i>Cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. kandelakii</i> s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı	47
Şekil 3.6.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. major</i> s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı	52
Şekil 3.7.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. perfiliewi</i> s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	57
Şekil 3.8.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. tobbi</i> için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	60
Şekil 3.9.	<i>Larroussius</i> alt cinsine ait türlerin <i>cacophony</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri	62
Şekil 3.10.	<i>Adlerius</i> alt cinsine ait türlerin <i>cacophony</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.	68

Şekil 3.11.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Adlerius</i> alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı	71
Şekil 3.12.	<i>Transphlebotomus</i> alt cinsine ait türlerin <i>cacophony</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.....	74
Şekil 3.13.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Transphlebotomus</i> alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	76
Şekil 3.14.	<i>Sergentomyia</i> alt cinsine ait türlerin <i>cacophony</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.....	81
Şekil 3.15.	<i>cacophony</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Sergentomyia</i> alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	83
Şekil 3.16.	<i>Paraphlebotomus</i> alt cinsine ait türlerin <i>period</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.....	89
Şekil 3.17.	<i>period</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Paraphlebotomus</i> alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	91
Şekil 3.18.	<i>period</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. perfilieivi</i> s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı.....	99
Şekil 3.19.	<i>period</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Larroussius</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>P. tobbi</i> için elde edilen ML filogenetik ağacı	104
Şekil 3.20.	<i>Larroussius</i> alt cinsine ait türlerin <i>period</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.	105
Şekil 3.21.	<i>Adlerius</i> alt cinsine ait türlerin <i>period</i> haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.	108
Şekil 3.22.	<i>period</i> haplotipleri kullanılarak oluşturulan <i>Sergentomyia</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>S. minuta</i> için elde edilen ML filogenetik ağacı	114

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan örnek ve lokalite sayısının türlere göre dağılımı.	14
Çizelge 2.2.	Türe özgü PZR koşulları.....	29
Çizelge 3.1.	<i>Cacophony</i> geni analiz edilen <i>Paraphlebotomus</i> türleri için DNA dizisi elde edilen ve heterozigot indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için tespit edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitlilik değerleri	35
Çizelge 3.2.	<i>Paraphlebotomus</i> türlerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.....	35
Çizelge 3.3.	<i>Paraphlebotomus</i> alt cinsinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.....	40
Çizelge 3.4.	<i>Paraphlebotomus</i> alt cinsinde yer alan grupların <i>cacophony</i> geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.	41
Çizelge 3.5.	<i>Cacophony</i> geni analiz edilen <i>Larroussius</i> türleri için DNA dizisi elde edilen ve heterozigot indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için tespit edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitlik değerleri	43
Çizelge 3.6.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. kandelakii</i> s.l. örneklerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	44
Çizelge 3.7.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. kandelakii</i> s.l. gruplarının <i>cacophony</i> geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.	48
Çizelge 3.8.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. major</i> s.l. örneklerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	48
Çizelge 3.9.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. major</i> s.l. gruplarının <i>cacophony</i> geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.	53
Çizelge 3.10.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. perfiliewi</i> s.l. örneklerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	54
Çizelge 3.11.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. tobbi</i> örneklerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	58
Çizelge 3.12.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.....	63
Çizelge 3.13.	<i>Adlerius</i> alt cinsi içerisinde yer alan türlerin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği. .	64
Çizelge 3.14.	<i>Adlerius</i> alt cinsi içerisinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.....	65
Çizelge 3.15.	<i>Adlerius</i> alt cinsi içerisinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.....	72

Çizelge 3.16.	<i>Transphlebotomus</i> alt cinsi içerisinde yer alan türlerin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	73
Çizelge 3.17.	<i>Transphlebotomus</i> alt cinsi içerisinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	73
Çizelge 3.18.	<i>Transphlebotomus</i> alt cinsinde yer alan türlerin <i>cacophony</i> geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.	77
Çizelge 3.19.	<i>Sergentomyia</i> türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	78
Çizelge 3.20.	<i>Sergentomyia</i> türlerinin <i>cacophony</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	79
Çizelge 3.21.	<i>Paraphlebotomus</i> türlerinin <i>period</i> geni için analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	85
Çizelge 3.22.	<i>Paraphlebotomus</i> türlerinin <i>period</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	86
Çizelge 3.23.	<i>Paraphlebotomus</i> alt cinsinde yer alan türlerin <i>period</i> geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.	93
Çizelge 3.24.	<i>Larroussius</i> türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	94
Çizelge 3.25.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P.perfiliewi</i> s.l. örneklerinin <i>period</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	95
Çizelge 3.26.	<i>Larroussius</i> alt cinsinde yer alan <i>P. tobbi</i> örneklerinin <i>period</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	100
Çizelge 3.27.	<i>Adlerius</i> türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	106
Çizelge 3.28.	<i>Adlerius</i> türlerinin <i>period</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	107
Çizelge 3.29.	<i>Sergentomyia</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>S. minuta</i> 'nın analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliği.	112
Çizelge 3.30.	<i>Sergentomyia</i> alt cinsi içerisinde yer alan <i>S. minuta</i> 'nın <i>period</i> geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.	112
Çizelge 4.1.	<i>Cacophony</i> , <i>period</i> ve <i>cox1</i> genlerine ait özet sonuç tablosu.	130

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°	Derece
α	Alfa
μ	Mikro

Kısaltmalar

°C	santigrat derece
AMOVA	Moleküler varyans analizi
bç	baz çifti
<i>cac</i>	<i>cacophony</i>
<i>COI</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit I (cytochrome oxidase I)</i>
<i>cox I</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit I (cytochrome oxidase I)</i>
<i>cox II</i>	<i>cytochrome oxidase II</i>
<i>cyt b</i>	<i>cytochrome b</i>
dk	dakika
DFS	DNA Free Sensitive
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EF 1-α</i>	<i>Elongation factor 1-α</i>
Indel	insersiyon / delesyon
KanL	Kanin Leishmaniasis
KCl	Potasyum Klorür

KL	Kutanöz Leishmaniasis
km	kilometre
LB	Luria-Bertani
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ML	Maximum Likelihood
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
<i>ND 1 / 2 / 4</i>	<i>NADH dehydrogenase 1 / 2 / 4</i>
<i>per</i>	<i>period</i>
pH	Hidrojen iyon derişimi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	dakikadaki dönüş sayısı
sn	saniye
Tm	erime noktası
TSS	Transformasyon ve Saklama Solüsyonu
U	Ünite
ZVL	Zoonotik Visseral Leishmaniasis
µl	mikrolitre
µM	mikromolar

1. GİRİŞ

1.1. Kum Sineklerinin Biyolojisi ve Vektöriyel Önemi

Kum sinekleri açık kahverengi renkte, uzun bacaklara sahip, boyları nadiren 3,5 mm'yi aşan sineklerdir. Yoğun kıllara sahip vücut yapıları, dinlenme halinde kanatlarını vücutlarının üzerinde "V" şeklinde tutmaları ve karakteristik zıplama hareketleri ile diğer dipterlerden kolayca ayırt edilebilirler. Holometabol canlılardır; yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört yaşam evresi bulunur [1, 2]. Yaşam döngüleri, türe ve başta sıcaklık olmak üzere çevresel koşullara bağlı olarak değişmekle birlikte, genellikle 30-45 gün arasında tamamlanır [3]. Hem dişi hem de erkek ergin bireyler bitkilerden salgılanan şekerli salgılar ve bitki öz suları ile beslenirler. Buna ek olarak çoğu kum sineği türünün dişi bireyleri, yumurtalarının gelişimi sırasında ihtiyaç duydukları proteini sağlayabilmek için en az bir kez kan emmek zorundadır. Bu yolla enfekte omurgalı bir canlıdan kan emerek aldığı patojenleri, tekrar kan emme yolu ile başka canlılara aktarmaktadır [1, 4]. Konak tercihleri türlere göre farklılık gösterebilmekle birlikte kuşlar, sürüngenler ve memelilerden oluşan geniş bir tercih aralıkları mevcuttur [5]. Ergin kum sinekleri genellikle sabahın erken saatleri, akşam ve gece aktiftirler. Dinlenme halinde iken hayvan barınakları, kiler, duvar oyukları, ağaç kovukları, mağaralar ve kuş yuvaları gibi serin ve karanlık mikro habitatlarda bulunurlar [1, 2]. Kum sineklerinin doğadaki üreme alanları ile ilgili çok fazla çalışma bulunmasa da dişi bireylerin yumurtalarını, larvaların gelişmelerini tamamlayabilmelerine olanak sağlamak amacıyla organik materyal bakımından zengin ve nemli ortamlara bıraktıkları bilinmektedir [4].

Kum sineklerinin uçuş mesafeleri genellikle çok kısadır, karakteristik zıplama hareketleri nedeni ile larvaların beslenme habitatlarından fazla uzaklaşamazlar [1]. Bununla birlikte bazı türlerin yaklaşık iki km uzaklıktaki bölgelere kadar uçabildikleri kaydedilmiştir [1, 6].

Dünyada 49° Kuzey ve 40° Güney enlemleri arasında Güney Avrupa, Asya, Afrika, Avusturalya, Orta ve Güney Amerika'da yayılım gösteren kum sinekleri, Yeni Zelanda ve Pasifik Adaları'nda bulunmamaktadır. Türkiye'de ise farklı fauna profilleri ile tüm coğrafi bölgelerde varlıklarına rastlanmaktadır [1, 2].

Ergin dişi bireyler ve omurgalı hayvanlar arasındaki beslenme ilişkisi, kum sineklerinin insan ve hayvan sağlığı bakımından dünyada son derece önemli bir yere sahip olmasına neden olmaktadır. *Leishmania* Ross, 1903 cinsine ait parazitlerin bilinen ve kanıtlanmış tek vektörü olmalarının yanı sıra, birçok viral ve bakteriyel hastalığın taşınmasında etkili olmaları, kum sineklerini dünya çapında önlem alınması ve mücadele edilmesi gereken kritik vektör canlılar haline getirmiştir [4, 7]. Kum sineği kaynaklı özellikle leishmaniasis ve phlebovirus enfeksiyonları her yıl milyonlarca insanı tehdit etmektedir [8]. Türkiye'de *Leishmania infantum* Nicoll, 1908'un yol açtığı zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL) [9] ile *Leishmania tropica* (Wright, 1903) ve *Leishmania infantum* parazitlerinin neden olduğu kutanöz leishmaniasisin (KL) [10] varlığı bilinmektedir. Aynı zamanda *Leishmania infantum*, insan enfeksiyonlarından daha yüksek prevalans gösteren ve hayvan sağlığını etkileyen kanin leishmaniasis'e (KanL) de yol açmaktadır [11]. Hastalık etkenlerinin taşınmasında vektörün ait olduğu tür, risk faktörlerinin belirlenmesi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle kum sinekleri ile ilgili olarak gerçekleştirilen taksonomik çalışmalar, vektör-parazit ilişkisini aydınlatmada ve etkili mücadelede yöntemlerinin geliştirilmesinde son derece önemli bir rol oynamaktadır [11, 12].

1.2. Kum Sineklerinin Sınıflandırılması

Kum sinekleri Arthropoda şubesi, Insecta sınıfının, Diptera takımında yer alan, Psychodidae ailesinin Phlebotominae alt ailesi içerisinde bulunmaktadır. Yeni Dünya'da *Lutzomyia* França, *Brumptomyia* França ve Parrot ve *Warileya* Hertig ile Eski Dünya'da *Phlebotomus* Rondani ve Berté, *Sergentomyia* França ve Parrot ve *Chinius* Leng olmak üzere toplamda altı cinsi bulunmaktadır [13]. Tüm dünyada 800'den fazla türü bulunan kum sineklerinin 98'i, insan leishmaniasis'inin kanıtlanmış veya şüphelenilen vektörleridir. Medikal öneme

sahip bu türler Yeni Dünya'da genellikle *Lutzomyia* cinsine ait iken, Eski Dünya'da *Phlebotomus* cinsine aittir [2, 4].

Türkiye'de *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinslerine ait altı alt cins içerisinde sınıflandırılan toplam 28 türün varlığı bilinmektedir. Bu türlerden *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 ve *Phlebotomus tobbi* Adler, Theodor & Lourie, 1930 sırasıyla *L. tropica* ve *L. infantum*'un kanıtlanmış vektörleridir [10, 14].

1.3. Kum Sineklerinde Tür Teşhisi

Kum sinekleri vektör-konak-patojen ilişkisine bağlı olarak insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren önemli vektör canlılardır. Yalnızca konak tercihleri değil, aynı zamanda biyolojileri, ekolojileri, coğrafi bölgeler arasındaki yayılımları, vektöriyel kapasiteleri gibi birçok farklı parametre de türden türe farklılık göstermektedir [4]. Vektör-patojen ilişkilerinin doğru tanımlanabilmesi, yayılımlarının ortaya çıkarılması ve buna bağlı olarak taşıdıkları hastalıklar ile ilgili risk faktörlerinin belirlenerek gerekli önlemlerin etkili bir şekilde ve zamanında alınabilmesi adına doğru tür teşhisi, yapılacak her türlü çalışmanın ilk ve en kritik noktasını oluşturmaktadır [12].

Kum sineklerinde tür teşhisi birçok farklı yol ile sağlanmaktadır. Ergin öncesi dönemde elektron mikroskobu altında gerçekleşen ayrıntılı mikroanatomi gözlemleri [15], ergin dönemde baş, kanat ve genitalyada bulunan karakterlerin morfolojik ve morfometrik analizleri [16], mitotik metafaz kromozomunda gözlenen G-bağlanma örüntüsüne bağlı sitogenetik çalışmalar [17] ile mikrosatelit bölgelerinin veya mitokondriyal ya da çekirdek genomda yer alan gen bölgelerinin DNA dizi analizlerine dayanan moleküler teknikler gibi farklı araştırma yöntemleri, tür teşhisi için uygulanan çeşitli yöntemler arasında yer almaktadır [7, 18].

Tür teşhisi çalışmalarında farklı yöntemler kullanılsa da gerek tür içi / türler arası var olduğu anlaşılan varyasyonlar, gerekse söz konusu yöntemlerden bazılarının

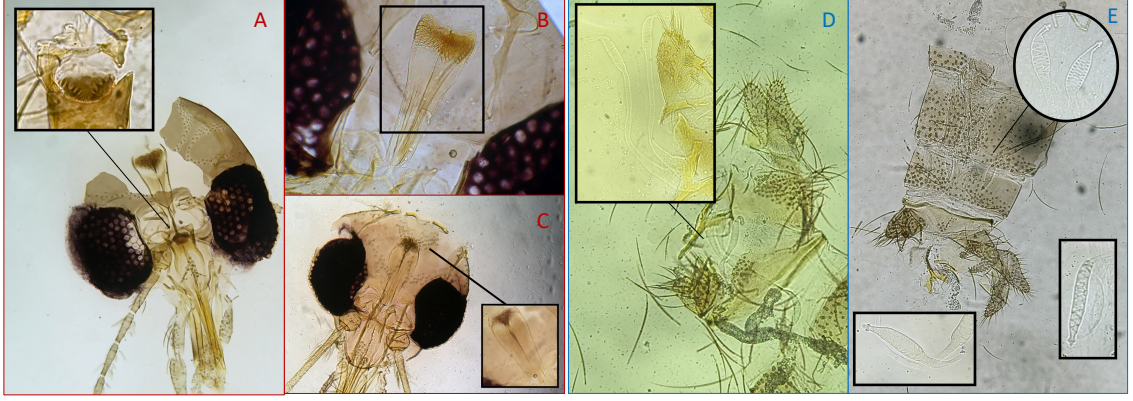
özel cihazların kullanımını gerektirmesi sebebiyle, kum sinekleri ile ilgili günümüze kadar gerçekleştirilen taksonomik çalışmaların büyük bir kısmı morfolojik ve moleküler yöntemlere odaklanmıştır [7, 16, 18].

1.3.1. Morfolojik Yöntemler

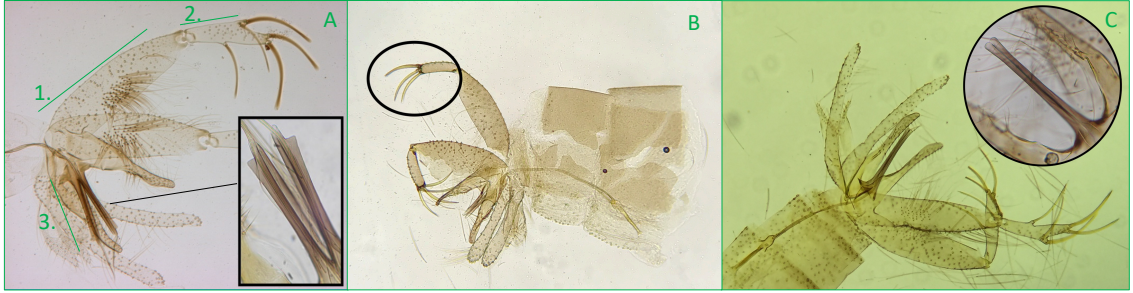
Morfolojik tür teşhisi, yapılacak çalışmadan bağımsız olarak uygulanacak ilk adımı oluşturur. Başka bir deyişle taksonomik, filogenetik, ekolojik veya epidemiyolojik her türlü çalışma için organizmanın doğru tanımlanması, sonrasında izlenecek yolun doğru belirlenmesi adına esastır. Yumurta ve larvalar morfolojik tür tanımlamasında neredeyse hiç kullanılmazken dişi ve erkek ergin bireylerin tür tayinleri, baş ve genitalyası disekte edilip uygun solüsyonlar kullanılarak preparatlarının hazırlanmasının ardından ışık mikroskobu altında ve uygun teşhis anahtarları ile yapılmaktadır [19].

Dişi kum sineklerinde farinks ve cibariumda bulunan dişlerin sayısı, şekli ve pozisyonu, teşhiste kullanılan önemli morfolojik karakterleri oluşturur. Aynı zamanda genitalyalarında bulunan spermateka kanalının baş ve gövdesinin şekli, segment sayısı ve yapısı da dişilerde dikkat edilmesi gereken önemli karakterlerdir [20, 21].

Erkek kum sineklerinde ise farinks ve cibarium dişleri çok belirgin bir yapıya sahip olmadığı için daha çok genitalyada bulunan yapılar dikkate alınmaktadır. Coxite ve style uzunluğu, style üzerindeki spin sayısı, aedegusun şekli gibi yapılar erkeklerde ayırt edici morfolojik karakterlerdir [20, 21]. Aynı zamanda kanat damarları, anten ve bacak segmentleri ile ağız parçaları da her iki eşey için ayırıcı özellik gösteren diğer karakteri oluşturur [19]. Morfolojik tür teşhisinde yaygın olarak kullanılan karakterler Şekil 1.1 ve Şekil 1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Dişi kum sineklerinin morfolojik teşhisinde kullanılan başlıca karakterler. A. Cibarium dişleri, B-C. Farinks armatürü ve farinks dişleri, D. Spermateka, E. Spermateka başı (Yılmaz, Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarları, 2016-2019).



Şekil 1.2. Erkek kum sineklerinin morfolojik teşhisinde kullanılan başlıca karakterler. A.1. Coxite, A.2. Style, A.3. Aedeagus, B. Style'den çıkan spinler, C. Aedeagus (Yılmaz, Karaoğlu, Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarları, 2019).

Morfolojik tür teşhisi, kum sineği örneklerinin uygun koşullarda saklanması ve tanımlayıcı karakterinin kaybolmadan doğru şekilde prepratlarının yapılması ile mümkün olmaktadır. Buna ek olarak popülasyonlar arasında gösterdiği varyasyon ile oldukça geniş fenotipik plastisiteye sahip türler, morfolojik karakterlerin tür ayırımında yetersiz kaldığı alt cinsler, morfolojik olarak birbirinin neredeyse aynısı olan fakat aralarında pre-zigotik veya post-zigotik üreme izolasyonu bulunan yakın akraba türler olarak tanımlanan kriptik türler ve kriptik türlerden oluşan tür kompleksleri gibi bazı tür ve tür grupları için morfolojik teşhis yetersiz kalmakta ve moleküler tür teşhisine ihtiyaç duyulmaktadır [12, 22-24].

1.3.2. Moleküler Yöntemler

Morfolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı ve kesin sonuç vermediği durumlarda, organizmaların nükleik asit ve protein analizlerini esas alan moleküler tekniklere dayalı teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra yapılan morfolojik çalışmaların desteklenmesi, vektöriyel kapasite, vektör-patojen ilişkisi, konak tercihi, değişen çevresel koşullara adaptasyon, filogenetik analizler, türleşme, populasyon yapısı ve genetiği gibi birçok farklı çalışma alanında da moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır [18, 25, 26]. Bunun gibi durumlarda DNA dizi analizi, tercih edilen ilk yöntemlerden birini oluşturmaktadır. Farklı taksonlara ait bireylerden elde edilen DNA dizilerinin ikili ve çoklu karşılaştırılması, moleküler taksonomik ve evrimsel birçok çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır [23].

Elde edilen karşılaştırmalı veriler, morfolojik olarak ayırt edilemeyen türlerin teşhisine ve türlerin sınırlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Moleküler taksonomik ve filogenetik çalışmalarda gen seçimi oldukça önemlidir. Mitokondriyal DNA genleri maternal kalıtım göstermeleri, rekombine olmamaları ve yüksek mutasyon hızları nedeni ile yakın akraba türleri birbirinden ayırmada sıklıkla kullanılmaktadır. *Cytochrome oxidase I (cox I)*, *cytochrome oxidase II (cox II)*, *cytochrome b (cyt b)*, *NADH dehydrogenase 1 (ND1)*, *NADH dehydrogenase 2 (ND2)* ve *NADH dehydrogenase 4 (ND4)* gen bölgeleri, kum sineği sistematüğinde kullanılan başlıca mitokondriyal genleri oluşturmaktadır. Buna ek olarak *Elongation factor 1- α (EF 1- α)*, *ribozomal 28S* ve *internal transcribed spacer 2 (ITS 2)* çekirdek DNA kalıtımını temsil eden genler ile *cacophony (cac)* ve *period (per)* gibi periyodik davranışlar ile ilgili genler de moleküler taksonomik çalışmalarda yer alan önemli genlerdir [7, 23, 26, 27].

Filogenetik çalışmalar için mitokondriyal gen dizileri üzerinden süregelen çalışmalar, kum sineği taksonomisini aydınlatmada birçok durumda tek başına yeterli olmakla birlikte beraberinde analize alınan çekirdek DNA'sı, sahip olduğu daha yavaş evrimleşme hızı ve çoğunlukla içerdiği korunmuş bölgelerin varlığı nedeniyle yapılan çalışmayı doğrulamak ve çalışmanın güvenilirliğini arttırmak adına önemlidir. Tüm bunlara ek olarak *cac* ve *per* gibi sirkadiyan ritim ve kur

davranışı ile ilişkili genler gibi evrimleşme hızı yüksek olduğu düşünölen genlerde meydana gelen amino asit değışimleri, özellikle mitokondriyal ve çekirdek genomda yer alan genlerin ayırmada yeterince başarılı olamadığı taksonomik problemlerin çözümünde ve türleşme süreci hakkında yorum yapmada önemli aday genlerdir [7, 23, 27, 28].

Kum sineği taksonomisini aydınlatmada karşılaşılan zorluklar ve özellikle tür komplekslerini ayırmada meydana gelen problemler, taksonomistleri ve araştırmacıları yeni ve ayırım gücü yüksek genler aramaya itmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda kur davranışını kontrol eden, bu yolla da türler arasındaki üreme izolasyonu ile doğrudan ilişkili *cacophony* ve *period* gen bölgelerinin, moleküler taksonomiye yeni bir yaklaşım getireceği düşünülmektedir [28].

1.4. Kum Sineklerinde Kur Davranışı

Kur davranışı aynı türe ait karşıt eşeyli bireylerin birbirini tanınması, eşeyssel uyarılmanın sağlanması, dişi ve erkek kopulasyonunun başlaması, eşeyssel seçilim gibi birçok fonksiyona sahiptir ve her canlı grubunda farklı şekilde ifade olmasıyla üreme izolasyonuna doğrudan katkı sağlamaktadır. Böceklerde kur davranışı farklı şekillerde görölmektedir: Renkli kanat ve göz yapıları görme duyusuna yönelik uyarılar sağlarken; antenler, palpuslar veya genital yapıların teması ile dokunsal şekillerde de kur davranışları gerçekleşebilmektedir. Benzer şekilde uzun mesafede gerçekleşen kur davranışları, çekirgelerde olduğu gibi daha çok ses aracılığı ile sağlanmaktadır. Meyve sinekleri ve kum sinekleri gibi bazı böceklerde ise yakın mesafe kur davranışı görölmektedir ve türe özgü oluşturdukları farklı kanat titreşimleri ile iletişim sağlanmaktadır. Ortaya çıkan farklı frekanslardaki kur şarkıları, aynı türe ait farklı eşeylerin birbirini tanımasındaki en önemli yolu oluşturmaktadır [29, 30].

Kum sineklerinde gözlenen kur davranışı, *Drosophila* cinsinin bireylerinde olduğu gibi, farklı kanat çırpma frekanslarına bağlı olarak oluşturulan türe özgü kur şarkısına dayanmaktadır. Kum sineklerinde çiftleşme konak üzerinde veya

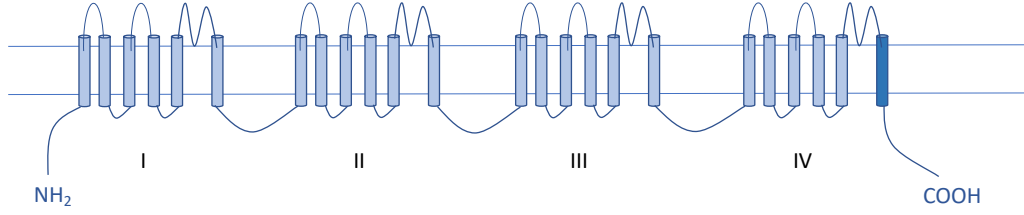
çevresinde gerçekleşmektedir. Erkek bireyler, kan emme davranışı göstermemelerine rağmen konağın üzerine veya çevresine toplanarak eşey feromonları salgılar; diğer yandan kanat titreşimlerine bağlı farklı frekanslarda “kur şarkısı” oluştururlar. Böylece erkek bireyler, türe özgü alan savunması yaparken, aynı zamanda kendi türlerine ait dişi bireyleri bu alana çekerek çiftleşmeye teşvik ederler [1, 4].

Türe özgü üretilen kur şarkısı, aynı türe ait bireylerin birbirini tanımasında en etkili yol olmakla beraber; özellikle yakın akraba türler arasındaki ayrımı sağlaması, kanat çırpma frekanslarında meydana gelen bir değişimle beraber bireylerin birbirini tanıyamaması ve sonuç olarak türlerin çiftleşmeleri için gereken eşleşmelerde ortaya çıkan uyumsuzluklar ile üreme izolasyonunun gerçekleşmesinde en önemli parametrelerden birini oluşturmaktadır. Bu nedenle, oldukça karmaşık bir taksonomiye sahip kum sineklerini doğru teşhis etmede kur davranışını kontrol eden genlerin oldukça önemli moleküler belirteçler oldukları düşünülmektedir [31, 32].

1.5. Kum Sineklerinde Kur Davranışını Kontrol Eden Genler

Kur davranışını kontrol eden genler, kum sineklerinde türleşme ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda en kullanışlı moleküler belirteçler arasında yer almaktadır. Varlıkları ilk olarak *Drosophila* türlerinde ortaya konmuş *cacophony* (*cac*) ve *period* (*per*) genlerinin, kum sineklerinde de kanat çırpma frekansını ve buna bağlı olarak “kur şarkısı”nı kontrol ettiği bilinmektedir [31, 32].

Cacophony (*cac*) geni, voltaj bağımlı kalsiyum kanalının α -1 alt ünitesini kodlar. Bu alt ünite, her biri altı adet transmembran domaininden oluşan birbirine eş dört tekrardan meydana gelir. Her tekrarda beşinci ve altıncı transmembran domaini arasında kalan kısım kanalın porlarını oluşturur. Dördüncü tekrarın altıncı transmembran domaini, IVS6 domaini olarak isimlendirilir [33]. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalının α -1 alt ünitesinin şematik gösterimi Şekil 1.3.'te verilmiştir.



Şekil 1.3. Voltaj bağımlı kalsiyum kanalı α -1 alt ünitesi ve IVS6 domaininin şematik gösterimi (R. Lins ve ark., 2002'den, değiştirilerek).

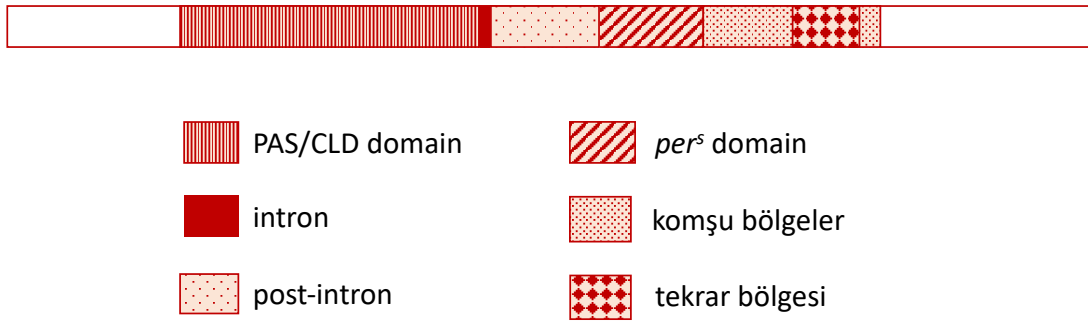
IVS6 domaininde meydana gelen mutasyonlar, şarkı veya görüş ile ilgilidir ya da letal etkili olabilmektedir. Mutant alellerin ürettiği sinyallerin daha uzun aralıklı ve daha fazla döngü ile karakterize olduğu bilinmektedir [31]. Ayrıca benzer şekilde mutasyon meydana gelen alellerden birinin, *Drosophila* türleri arasında benzer "kur şarkısı" üretmesine sebep olduğu da bilinmektedir. Yeni Dünya kum sinekleri ile *cac* geni üzerine yapılan çalışmalar, bu genin *Lutzomyia longipalpis* tür kompleksi içerisinde yer alan türlerin ayrımını sağlamada önemli bir belirteç olduğunu göstermiştir [34].

Genin içerisinde IVS6 domainini kodlayan yaklaşık 270 baz çiftlik bölge, 100 baz çifte yakın bir intron bölgesi içerir. Ekzon bölgesi türler arasında oldukça iyi korunmuşken, *Drosophila*'da bulunmayan intron bölgesi, kum sineklerinde çok daha az korunmuştur ve türler arasında birçok insersiyon, delesyon ve nokta mutasyonun varlığı bilinmektedir. IVS6 domaininde yer alan intronların bu şekilde hızlı evrimleşmesinin ve yüksek oranda polimorfik olmasının bir sonucu olarak *cac* geni, popülasyon genetiği çalışmaları için de güçlü bir belirteç olma özelliğindedir [32, 33].

İlk defa *Drosophila*'da yapılan çalışmalarda ortaya konulan, pupadan çıkma davranışının sirkadiyan ritmini ve erginlerin lokomotor aktivitelerini kontrol ettiği bilinen *period* (*per*) geni, eşeyssel davranış ve üreme izolasyonu için kullanılan bir diğer önemli moleküler belirteçtir. "Kur şarkısı" ritminin türe özgü farklılığını kontrol etmesi ve kriptik türler arasında üreme izolasyonu sağlaması nedeniyle,

türleşmeye sebep olan genlerden biri olarak düşünülmektedir [34, 35]. Yüksek oranda genetik varyasyon gösteren *per* geni ve bu genin homologları, *Drosophila* dışındaki diğer böceklerin populasyon genetiği ve moleküler evrim çalışmalarında da oldukça önemlidir [36]. Kum sinekleri ile yapılan çalışmalarda, *Lutzomyia longipalpis* tür kompleksine ait üyelerin belirlenmesinde *per* geninin başarılı sonuç verdiği ortaya konulmuştur [34, 35].

Büyük bir proteini kodlayan *per* geni, yaklaşık 50 baz çiftlik bir intron bölgesi bulundurmaktadır ve iki önemli bölge içerir. Bunlardan ilki, nokta mutasyon meydana gelmesi durumunda, oluşturduğu PER proteini ve diğer proteinler arasındaki etkileşimi ile ilişkili, oldukça korunmuş PAS bölgesidir. Diğer önemli bölge ise Threonin-Glisin (Thr-Gly) tekrar bölgesidir. *Drosophila*'da fazla korunmamış olan bu tekrar bölgesi, kum sineklerinde görece kısa bir yapıya sahiptir [36]. Özellikle kriptik türleri ayırmada ortaya koyduğu başarılı sonuçlar ile *per* geninin populasyon genetiği ve moleküler evrim çalışmalarında kullanışlı bir belirteç olma özelliği göstermektedir [35]. *period* geninin bölümleri, Şekil 1.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. *period* geni bölümlerinin şematik gösterimi (C. J. Mazzoni, 2002'den, değiştirilerek).

1.6. *cacophony* ve *period* Gen Bölgelerinin Kum Sineklerinin Tür Tanımlamasındaki Önemi

Kum sineklerinin tür teşhisinde geleneksel morfolojik yöntemlerden sonra en çok kullanılan yöntem, çeşitli moleküler belirteçlerin yardımı ile gerçekleşen moleküler tür teşhisidir [12, 18]. Bu belirteçler içerisinde en çok kullanılan mitokondriyal *cytochrome c oxidase subunit I* (*COI* veya *cox1*) geninin yaklaşık 650 baz çiftlik gen bölgesi, farklı canlı gruplarına ait birçok türün tanımlanmasında kullanılan ve “barkod” olarak isimlendirilen evrensel bir moleküler belirteç olma özelliği göstermektedir [37]. Barkodlama çalışmaları, birçok farklı şubeye ait canlı grubunun teşhisinde olduğu gibi [38], kum sineklerinde de morfolojik veriler ile birlikte değerlendirildiğinde, türlerin güvenilir bir şekilde teşhis edilmesinde kullanılan yöntemlerden birisidir [12, 39]. Farklı lokalitelerden toplanan neotropikal kum sineklerinde yapılan çalışmalar, Brezilya’daki kriptik kum sineği türlerini ortaya koymada ve türlerin sınıflandırılmasında DNA barkodlamasının etkinliğini göstermektedir [40]. Ayrıca türlerin sınıflandırılmasında mümkün olan en doğru ayrımı sağlamak ve teşhisin doğruluğuna emin olmak amacı ile barkod bölgelerinin yanı sıra farklı mitokondriyal veya çekirdek DNA dizileri de çalışmalarda kullanılmaktadır [18].

Buna ek olarak kum sineklerinde sıklıkla görülen fenotipik varyasyon, tür teşhisi sırasında çeşitli problemler yaratabilmekte, moleküler veriler ile birlikte değerlendirilen sonuçlar doğrultusunda korele olmayan sonuçlar ortaya koyabilmektedir. Depaquit ve arkadaşlarının [22] Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika’dan toplanan *P. perfilliewi* s.l. örnekleri ile yaptıkları çalışmada populasyonlar arasında fenotipik plastisite oldukça fazla görülmüş, yalnızca morfolojik karakterler dikkate alınarak kompleksin içerisinde yer alan türleri ayırmak mümkün olmadığı gibi, aynı zamanda çalışmaya dahil edilen iki adet moleküler belirteç (*cyt b* ve *ITS2*) arasında da uyumsuz filogenetik sonuçlar elde edilmiştir. Kasap ve arkadaşları [24] tarafından yapılan başka bir çalışma, Türkiye’deki *P. major* s.l. türlerinin taksonomik durumunun tam olarak açıklanamadığını ortaya koymuştur. Farklı lokalitelerden toplanan *P. major* s.l. örnekleri için morfolojik karakterler ile *cyt b* ve *EF 1- α* moleküler belirteçler birlikte değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile oluşturulan filogenetik analizler, *P.*

major s.l. kompleksine ait *P. neglectus* ve *P. syriacus* türleri dışında komplekse ait üçüncü bir olası taksonun daha varlığını ortaya koymuştur. Ancak grubun gerçek üye sayısı, yayılımları ve taksonomik durumları henüz tam olarak bilinmemektedir.

Kriptik türlerin belirlenmesinde, tür komplekslerine ait bireylerin ortaya çıkarılmasında ve yayılımlarının anlaşılmasında günümüzde rutin olarak kullanılan moleküler belirteçlerin yanı sıra, ayırım gücü yüksek ve güvenilir yeni gen bölgelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gibi durumlarda, çeşitli mutasyonların oluşması halinde kur şarkısını değiştirerek üreme izolasyonu ile türleşme sürecinde büyük rol oynayan *cacophony* ve *period* genleri, türler arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılmasında yeni moleküler belirteçler olarak kullanılmaktadır [12, 31]. *Lutzomyia longipalpis* tür kompleksi ile yapılan çalışmalarda, bu gen bölgelerinin komplekse ait bireyleri tanımlamada yüksek ayırım gösterdiğine dair çalışmalar kaydedilmiştir [28]. Aynı zamanda *per* geninde tanımlanan polimorfizmler, bu genin yeni bir barkod bölge olarak kullanılabilmesine dair öneriler ortaya koymaktadır [35].

Tez çalışması kapsamında, Türkiye’de varlığı bilinen bütün tür ve tür kompleksleri, *cacophony* ve *period* gen bölgeleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu gen bölgelerinden elde edilen sonuçlar, Türkiye’de var olduğu bilinen 28 türün önceki barkod sonuçları ile karşılaştırılarak Türkiye’de bulunan kum sineği taksonomisinin tekrar değerlendirilmesi, kriptik türleri tanımlamada yeni birer moleküler belirteç olarak bu genlerin kullanılıp kullanılmayacağına tartışılması, populasyonlar arasındaki gen akışının ortaya çıkarılması ve tür içi ile türler arasında yapılan çeşitli analizlerle literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir. Aynı zamanda *cacophony* ve *period* gen bölgeleri ile ilgili çalışmalar yalnızca Yeni Dünya kum sinekleri için gerçekleşmiş olmakta, Eski Dünya kum sinekleri için literatürde neredeyse böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile hem Eski Dünya kum sinekleri için ilk veriler oluşturulmuş hem de Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen türler için iki gene de ait genetik yaklaşımlar ortaya koyulmuştur.

2. YÖNTEM

2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Örnekler

Kum sineklerinin örneklenmesi, Doç. Dr. Özge Erişöz Kasap'ın doktora ve sonrası araştırmaları kapsamında 2005-2016 yılları arasında Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerine yapılan arazi çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Araziden toplanan örnekler, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yer alan Ekolojik Bilimler Araştırma Laboratuvarları'na getirilerek burada morfolojik ve/veya moleküler tür teşhisleri tamamlanmıştır [12, 23].

Baş ve genitalyası disekte edilen kum sineklerinin morfolojik teşhisleri uygun anahtarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir [20, 21, 41, 42]. "Qiagen DNeasy Blood and Tissue (Hilden, Germany)" izolasyon kiti ile her bir bireyin toraksından izole edilen ve -20°C'de saklanan örneklerle ait DNA'lar ise moleküler teşhis çalışmalarında kullanılmıştır [12, 23].

Tez çalışması kapsamında Türkiye'yi temsil edecek şekilde 29 ildeki, 101 lokaliteden toplanan kum sineği örnekleri çalışmaya dahil edilmiş; sonuçların güvenilirliği arttırmak amacıyla mümkün olan en fazla sayıda birey kullanılmaya özen gösterilerek toplamda altı alt cinse ait 884 örnek, *cacophony* ve *period* gen bölgelerine ait analizler ile tez çalışmasına katılmıştır. Çalışmaya dahil edilen her türe ait birey ve lokalite sayısı Çizelge 2.1.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan örnek ve lokalite sayısının türlere göre dağılımı.

Takson		Örnek Toplanan Lokalite Sayısı	Birey Sayısı
Subgenus <i>Phlebotomus</i> Rondani and Berte			
<i>Phlebotomus papatasi</i> (Scopoli, 1786)	√	14	69
Subgenus <i>Paraphlebotomus</i> Theodor			
<i>Phlebotomus alexandri</i> Sinton, 1928	√	8	32
<i>Phlebotomus caucasicus</i> Marzinowsky, 1917	√	1	2
<i>Phlebotomus jacusieli</i> Theodor, 1947	√	3	8
<i>Phlebotomus sergenti</i> Parrot, 1917	√	12	63
<i>Phlebotomus similis</i> Perfiliev, 1963	x		
<i>Paraphlebotomus</i> sp.*		1	4
Subgenus <i>Larroussius</i> Nitzulescu			
<i>Phlebotomus burneyi</i> Lewis, 1967			
<i>Phlebotomus kandelakii</i> Schurenkova, 1929			
<i>Phlebotomus major</i> Annandale, 1910			
<i>Phlebotomus neglectus</i> Tonnoir, 1921			
<i>Phlebotomus syriacus</i> Adler & Theodor, 1931			
<i>Phlebotomus galilaeus</i> Theodor, 1958			
<i>Phlebotomus perfiliewi</i> Parrot, 1939			
<i>Phlebotomus transcaucasicus</i> Perfiliev, 1937			
<i>Phlebotomus tobbi</i> Adler, Theodor & Lourie, 1930	√	22	121
Subgenus <i>Adlerius</i> Nitzulescu			
<i>Phlebotomus balcanicus</i> Theodor, 1958	√	2	9
<i>Phlebotomus brevis</i> Theodor & Mesghali, 1964	√	2	3
<i>Phlebotomus halepensis</i> Theodor, 1958	√	11	45
<i>Phlebotomus kyreniae</i> Theodor, 1958	√	2	9
<i>Phlebotomus simici</i> Nitzulescu, 1931	√	9	49
<i>Adlerius</i> sp.*		2	18
Subgenus <i>Transphlebotomus</i> Adler			
<i>Phlebotomus anatolicus</i> Erisoz Kasap, Depaquit & Alten, 2015	√	1	5
<i>Phlebotomus economidesi</i> Léger, Depaquit & Ferté, 2001	√	1	1
<i>Phlebotomus killicki</i> Dvorak, Votypka & Volf, 2015	√	2	9
<i>Phlebotomus mascittii</i> Grassi, 1908	x		
Subgenus <i>Sergentomyia</i> França & Parrot			
<i>Sergentomyia antennata</i> Newstead, 1912	x		
<i>Sergentomyia dentata</i> Sinton, 1933	√	6	32
<i>Sergentomyia minuta</i> (Rondani, 1843)	√	4	35
<i>Sergentomyia theodori</i> (Parrot, 1942)	x		
			884

√ Çalışmaya dahil edilen türleri göstermektedir.

x Çalışmaya dahil edilmeyen türleri göstermektedir.

* Morfolojik karakterler kullanılarak tür düzeyine kadar teşhisi yapılamayan örnekleri göstermektedir.

** Morfolojik karakterler kullanılarak tür düzeyine kadar teşhisi yapılamayan ve tür kompleksi olarak değerlendirilen örnekleri göstermektedir.

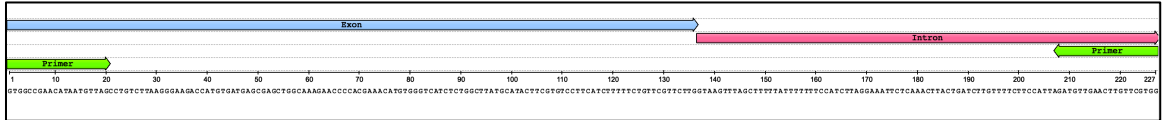
2.2. Laboratuvar Çalışmaları

2.2.1. *cacophony* Geninin Amplifikasyonu

Türkiye'nin çeşitli lokalitelerinden toplanan ve DNA'sı izole edilen kum sineği örneklerinin *cacophony* geninin amplifikasyonu için çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Ekoloji Anabilim Dalı Evrimsel ve Ekolojik Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda "SNP Hot Start" Taq seti ile "5L1cac (ileri)" ve "3L1cac (geri)" primer çifti [33] kullanılmış, laboratuvarında bulunan SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher) ile amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, türler arasında oldukça varyasyon gösteren yaklaşık 100 baz çiftlik (bç) intron bölgesini içeren yaklaşık 270 nükleotitlik bir bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir. Primerlerin nükleotid dizileri aşağıda belirtilmiş, gen üzerindeki konumları ise Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

5L1cac ileri; 5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3'

3L1cac geri; 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3'



Şekil 2.1. *P. tobbi*'nin *cacophony* geni ve primerlerin gen dizisi üzerindeki yerleşimleri.

Her reaksiyon 50 µl son hacimde gerçekleştirilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nunda (PZR) kullanılan reaktifler ve hacimleri aşağıda verilmiştir:

Reaktifler	Son Konsantrasyon	Reaktif Hacimleri (x1)
sdH ₂ O	-	30,7 µl
10X Tampon	1X	5 µl
2,5 mM dNTP	200 µM	4 µl
25 mM MgCl ₂	2 mM	4 µl
10 µM Primer (İleri)	0,4 µM	2 µl
10 µM Primer (Geri)	0,4 µM	2 µl
5U/µl Taq Polimeraz	1,5 U	0,3 µl
Kalıp DNA	-	2 µl

PZR'nin gerekleŖtiđi sıcaklık koŖulları aŖađıda gösterildiği gibidir:

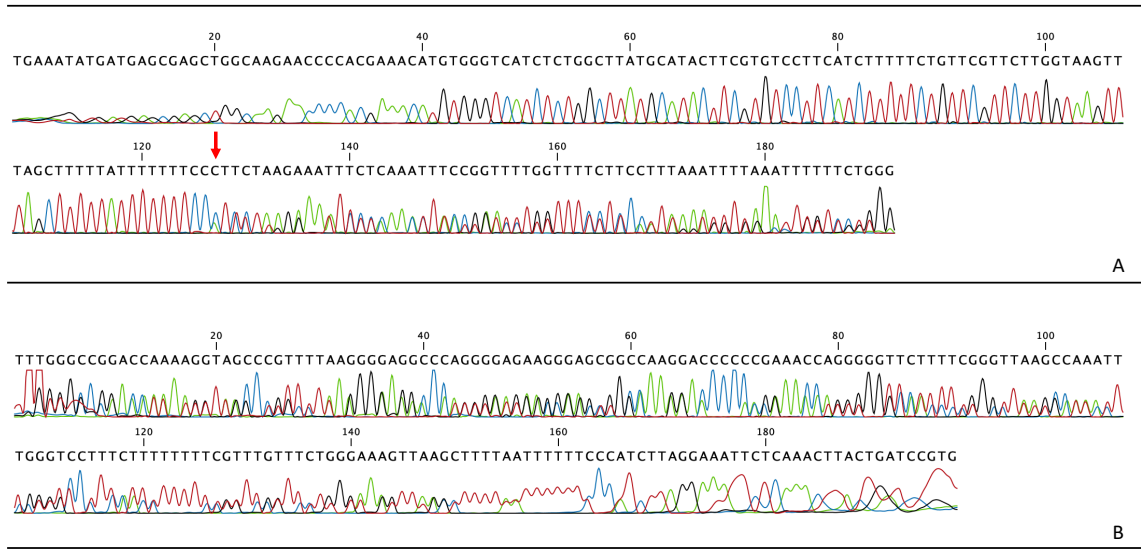
95°C	5 dakika	
95°C	30 saniye	} X 35
55 °C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	10 dakika	

Bütün reaksiyonlar, alıŖma sırasında bir kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek amacı ile negatif kontrol eŖliđinde kurulmuŖtur. Reaksiyon sonunda her örneğe ait 6 μ l PZR ürünü, 1 μ l 6x yükleme tamponu ile karıŖtırılıp, Red Safe ile boyanmıŖ %2'lik agaroz jelde yürütülerek sonular elde edilmiŖtir. Agaroz jel elektroforezi ile *Paraphlebotomus sp.* ve *Adlerius sp.* alt cinslerine ait türlerde spesifik olmayan bantlara rastlanmıŖ ve reaksiyondaki döngü sayısı 35'ten 30'a dŖrlerek, bu iki alt cinse ait tüm örneklerin PZR'leri tekrarlanmıŖtır. Elde edilen tüm bantlar, 200-300 b uzunluğunda olmakla beraber, *Adlerius sp.* alt cinsi ierisindeki örneklerin bant uzunluğu 200 ila 500 b bant ağırlığında deđiŖkenlik gstermiŖtir.

2.2.2. *cacophony* Geninin DNA Dizi Analizi

Amplifikasyonu gerekleŖtirilen *cac* geninin PZR pürifikasyonu ve DNA dizi analizi, BM Labosis tarafından hizmet alımı ile gerekleŖtirilmiŖtir. Reaksiyon, DNA'nın her iki kalıbı üzerinden, amplifikasyon sırasında kullanılan primerler ile tamamlanmıŖtır. Örneklere ait elde edilen ift yönlü diziler, Qiagen CLC Main Workbench 8 programı ile hizalanıp dzenlenmiŖ ve sonuta her bir örneğe ait bir adet DNA dizisi oluŖturulmuŖtur.

DNA dizi analizi sonucunda elde edilen kromatogram görüntüsünde her bir nükleotidin oluşturduğu ışımının ortaya çıkardığı pikin, bazı örneklerde belirli bir nükleotid bölgesinden başlayarak çift pikler şeklinde devam etmesi ile *cac* geninde heterozigot insersiyon/delesyonun gösterdiği düşünülen bireylerin varlığı tespit edilmiş; net bir kromatogram görüntüsü elde edilememesi nedeniyle, bu bireylerin DNA dizilerine sanger sekanslama ile ulaşılammıştır. Heterozigot bireylerin her iki kalıbından elde edilen kromatogram görüntüsü Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Heterozigot *P. tobbi* örneğine ait kromatogram görüntüsü. A. İleri, B. Geri yönde DNA dizi analizi sonuçları (Ok işareti insersiyon/delesyonun başladığı yeri göstermektedir).

2.2.3. Heterozigot İnsersiyon/Delesyon Görülen Bireylerin Klonlanması

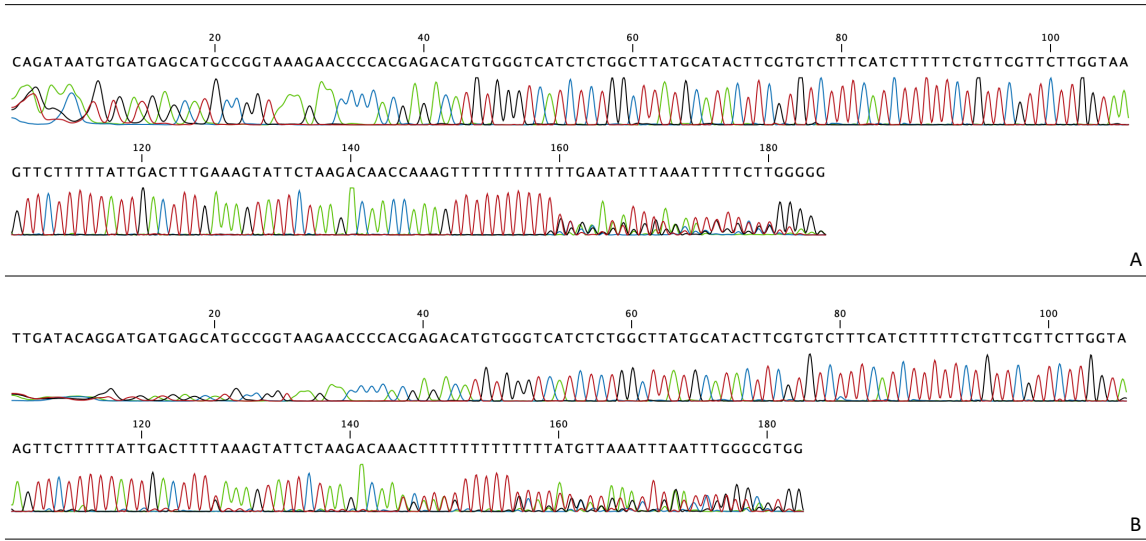
DNA dizi analizi sonucu heterozigot insersiyon veya delesyon içerdiği düşünülen bireylerin *cacophony* gen bölgeleri klonlanarak, bireylere ait her iki allelin ayrı ayrı dizilenebilmesinin sağlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla uygulanan basamaklar maddeler halinde belirtilmiştir:

1. Klonlanacak Bireylerin Seçilmesi

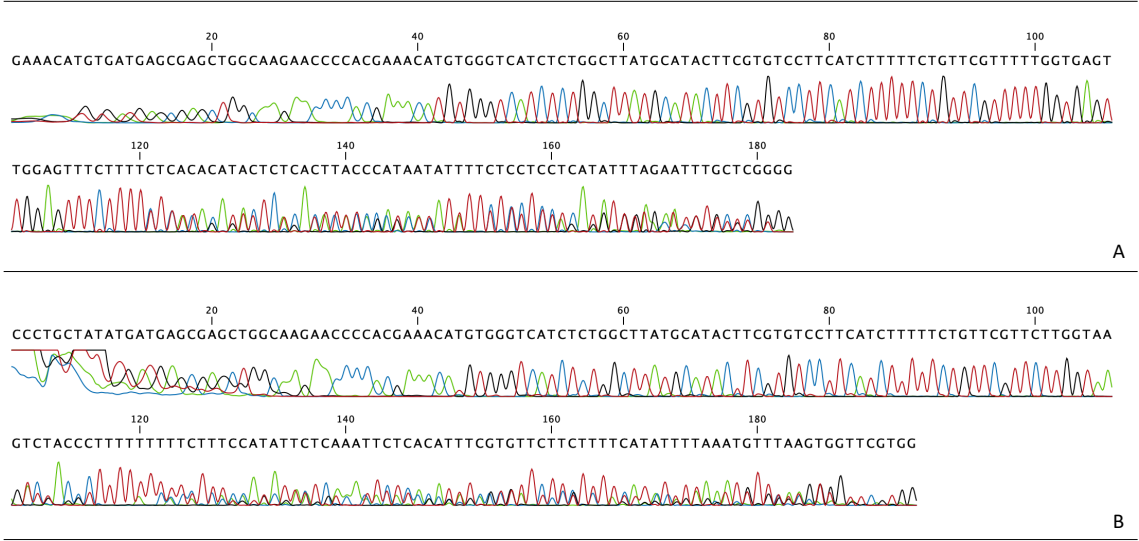
Heterozigot bireylerin sayısının görece fazla olması ve birden fazla türde benzer durumun görülmesi sebebi ile her tür kendi içerisinde değerlendirilmiştir.

Kromotogramda görülen çift piklerin başladığı yere ve hangi nükleotid çiftleri ile devam ettiğine bakılarak her türün kendi içerisindeki insersiyon/delesyon örüntüsü çıkarılmış ve analiz edilen türlere ait örnekler bu örüntü dikkate alınarak gruplandırılmıştır. Oluşturulan gruplar içerisinde her örüntüye ait bir adet örnek, klonlanacak örnek olarak seçilmiştir.

Tür içinde ve türler arasında görülen farklı örüntülere dair örnek görüntüler sırasıyla Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. *S. minuta* türüne ait iki farklı (A ve B) bireyden elde edilen farklı heterozigotluk örüntüsü (yalnızca ileri yönlü okumalar gösterilmiştir).



Şekil 2.4. *P. major* s.l. (A) ve *P. kandelakii* s.l. (B) türlerine ait farklı heterozigotluk örüntüsü (yalnızca ileri yönlü okumalar gösterilmiştir).

2. Klonlanacak Bireylerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Klonlanacak bireylerin her biri için PZR, yukarıda belirtilen koşullar altında tekrar edilmiş ve son hacim 100 µl olarak belirlenmiştir. Örneklerin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesinin ardından PZR ürünleri buza alınmış ve klonlama işlemi öncesinde örneklerin oda sıcaklığında veya -20°C'de 24 saatten fazla bekletilmemesine özen gösterilmiştir. Bu nedenle, PZR'den başlayıp dizilerin elde edilmesine kadar devam edecek işlem basamakları dikkate alınarak, dört örnekten oluşan setler halinde çalışma planı yapılmıştır.

3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünlerinin elde edilmesinden sonra yapılacak tüm işlemler, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarı Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi'nde, Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin'in yaptığı tasarım kendisinin gözetim ve denetiminde uygulanmıştır.

PZR ürünlerinin saflaştırılması için aşağıda yer alan protokol uygulanmıştır:

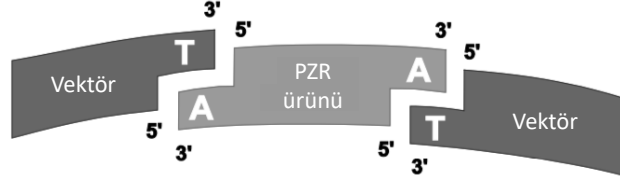
- Saflaştırılacak dört örnek için, örnek başına 24,2 µl H₂O, 312,5 µl 8M Guanidin-HCl ve 150 µl %100 2-propanol 15 ml'lik falconda birleştirilmiş; üzerine 10 µl 50X Bromtimol mavisi ve 3,4 µl 3000 mM Sodyum Asetat eklendikten sonra vortekslenmiştir.
- 100 µl'lik PZR ürünleri 2 ml'lik tüplere alınarak, her biri üzerine 500 µl'lik karışım eklenerek tüpler tekrar vortekslenmiştir.
- Yeni 2 ml'lik tüplerin kapakları kesilerek üzerine silika matrisli tüpler yerleştirilmiş ve PZR ürünü içeren karışımlar, silikalı tüplere aktarılmıştır.
- 4.000 rpm'de 30 sn santrifüj işleminin ardından altta kalan tüpler, tüm sıvı içeriği ile birlikte atılmış, her bir silika matrisli tüp yeni 2 ml'lik ependorf tüplerin üzerine alınmıştır.
- 600 µl %99 Ethanol 15 ml'lik tüplere alınarak üzerine 7,5 µl 1000 mM (pH 6.99) Tris-Cl eklenmiş, en son 142,5 µl H₂O koyulup ters-yüz yaparak hassas şekilde karıştırılmıştır.
- Oluşan 750 µl'lik karışım, silika matrisli tüpler üzerine koyularak 5.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Altta bulunan 2 ml'lik ependorf tüpe geçen alkol, üstteki silika matrisli tüplere değdirilmeden dikkatlice dökülmüş ve maksimum ivme ile 10 dk tekrar santrifüjlenmiştir.
- Altta bulunan 2 ml'lik ependorf tüpler yenileri ile değiştirildikten sonra silika matrisli tüplerin kapakları açık bırakılarak 37°C etüvde 15 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Etüvden çıkarılan tüpler, üzerine 60 µl 2,5 mM (pH 8.8-9) Tris-Cl koyularak maksimum ivme ile 1dk santrifüjlenmiş ve üstteki silikalı tüpler çıkarılarak 2 ml'lik ependorfta bulunan saflaştırılmış DNA örneklerinin saflığı Nanodrop'ta (Thermo Fisher) ölçülmüştür.

Saflaştırma protokolü tamamlanan PZR ürünleri, klonlama işlemi için hazır hale getirilmiştir.

4. PZR Ürünlerinin Klonlanması

PZR ürünlerinin klonlanması Invitrogen TA Cloning Kit (Thermo Fisher) ile gerçekleştirilmiştir. TA klonlama yöntemi, ticari Taq DNA polimeraz enziminin

PZR sonunda oluşan ürünün 3' ucuna bir adet deoksiadenozin eklemesi ve ticari lineer pCR 2.1 plazmidinin 3' ucunda deoksitimin rezidusu bulunması ile bu uçların birleşerek PZR ürününün vektör plazmide aktarılması prensibine dayanmaktadır. PZR ürününün vektöre bağlanma şeması Şekil 2.5.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. TA Klonlama yönteminin şeması (Invitrogen TA Cloning Kit protokolünden alınmıştır).

Ligasyon

Transformasyona hazırlık için örneklerin klonlanmaya başlamasından bir gün önce, -80°C'de stok olarak bulunan *Escherichia coli* (*E. coli*) K12D5α mutanlığı, temiz 2X YT besiyerine alınarak transformasyonun gerçekleşeceği kültürü oluşturmak üzere bir gece 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün inkübasyondan alınan bakterilerden 100 µl, balon joje içerisinde bulunan 20 ml 2X YT sıvı besiyerine aktararak, 37°C'de çalkalamalı etüvde yaklaşık iki saat tekrar inkübasyona alınmıştır.

PZR ürünlerinin vektörlere bağlanmasını sağlayacak olan ligasyon basamağı, Invitrogen TA Cloning Kit protokolünde yer alan basamaklar izlenerek gerçekleştirilmiştir. Ligasyon için kitin içerisinde yer alan lineer pCR 2.1 plazmid vektörü, T4 DNA ligaz enzimi ve 5X T4 ligaz tamponu kullanılmıştır. İlk olarak protokolü optimize edebilmek amacıyla kit içerisinde yer alan 1:1 Vektör:PZR ürünü oranı uygulanmış ve başarılı sonuç elde edilememiştir. Ardından 1:2, 1:3, 1:5 ve 1:10 Vektör:PZR ürünü oranları denenerek içlerinden yalnızca 1:3 oranının uygun olduğunun tespit edilmesi ile bütün hesaplar bu orana göre yapılmıştır. Reaksiyonların kurulduğu tüpler, ligasyonun gerçekleşmesi için 22°C'de yaklaşık 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Transformasyon

Transformasyon basamağı, aşağıdaki basamaklar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

- Çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılan *E. coli* K12D5α mutanını inkübasyondan alınarak, 2 ml'lik dört örnek tüpüne aktarılmış ve tüpler 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Oluşan bakteri pelletinin ters yönünden tüplerdeki sıvı boşaltılıp, tekrar kısa bir dönüşün ardından tüplerde kalan sıvı pipetle alınmıştır.
- Her örnek için 100 µl olacak şekilde "Transformation and Storage Solution (TSS)" (pH 6.2), 15 ml'lik tüpe alınmış, üzerine toplam hacmin %5'i kadar "Dimethyl Sulfoxide (DMSO)" eklenerek vortekslenmiştir.
- 2 ml'lik tüplerde bulunan bakteri pelletinin üzerine 100 µl TSS+DMSO karışımı eklenerek, bakteriler yavaşça süspansedilmiştir.
- 22°C'de inkübasyona bırakılan ligasyon tüpleri inkübasyondan alınmış ve süspansedilen bakteri tüplerine 5'er µl ligasyon ürünü eklenmiştir. Tüpler yavaşça vurularak karıştırılmıştır.
- Her bir bakteri+ligasyon ürünü içeren 2 ml'lik ependorf tüp, buz içerisinde 40 dk inkübasyona bırakılmış, ardından 42°C'de 90 sn su banyosuna alınmış ve son olarak tekrar 2 dk buzda bekletilerek bakterilerin plazmidleri alması için şok yaratılmıştır.
- Buzdan alınan her bir tüpün üzerine 900 µl 2X YT eklenip, tüplerin içeriği 15 ml'lik falcon tüplere aktarılmış ve 2 saat süresince çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresinin ardından tüplerdeki içerik tekrar kendi 2 ml'lik ependorlarına aktarılmış ve 10.000 rpm'de 90 sn santrifüj edilmiştir.
- Dipte oluşan bakteri pelletinin ters yönünden olacak şekilde sıvının neredeyse tamamı boşaltılmış, kalan sıvı ile bakteriler dikkatli şekilde süspansedilerek besiyerine ekilmeye hazır hale getirilmiştir.

Bakterilerin besiyerine aktarılması

Bakterilerin 50µg/ml kanamisin içeren katı besiyerine aktarılması için öncelikle cam özeler steril edilmiştir. Her örneğe ait transformasyon tüpü için bir petri kabı tayin edilmiş, üzerlerine örneğin kodu not edilmiştir. Transformasyon tüplerinin

içeriği, bek alevi yanında, kendi petri kabı içerisine rastgele şekilde damlatılmış, bakteriler “L” şeklindeki cam özenin geniş tarafıyla petriye yayılmıştır. Daha sonra öze, petriye dik açıyla tutularak önce içten dışa, sonra da dıştan içe doğru halkalar çizerek bakterilerin petriye iyice dağılması sağlanmıştır. Ekim işlemi biten petriler, etüvde 37°C’de iki gece inkübasyona bırakılmıştır.

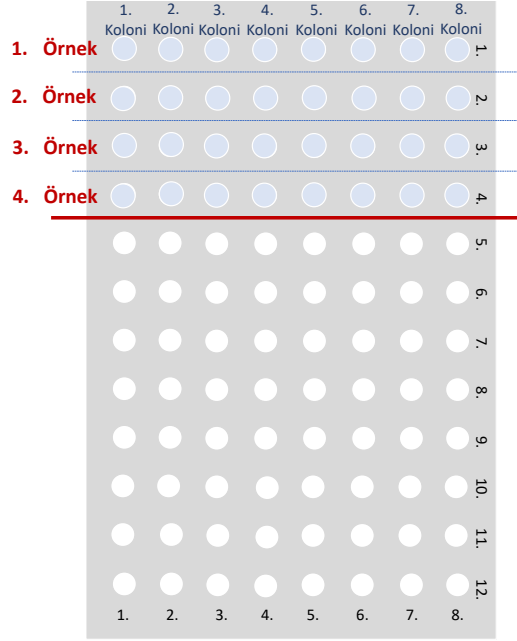
Kolonilerin oluşması ve koloni PZR

Ekimin ardından iki gece sonunda petriler etüvden alınmış ve bakterilerin koloni oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Koloni oluşmaması durumunda PZR basamağı da dahil olacak şekilde işlemler tekrarlanmıştır. Kolonilerin oluşmuş ise var olan kolonilerin her biri sayılarak petrinin üzerine numaraları yazılmıştır.

Numaralandırılan kolonilerden rastgele sekiz adet koloni seçilerek, hedef geni içine alan ve almayan bakterilerin ayrımını sağlamak amacı ile koloni PZR yapılmıştır. Her klonlama süreci dört kum sineği örneğinin *cac* geninin amplifikasyonu ile başlamış, petriye ekim süresince aynı sayı ile devam etmiş, koloni PZR sırasında her örneğe ait sekiz koloni seçilerek işlemler 32 koloni için uygulanmaya devam etmiştir. Her bir koloni PZR’si için reaksiyonlar 15 µl son hacimde oluşturulmuştur ve kullanılan bileşenler aşağıda yer almaktadır:

Reaktifler	Son Konsantrasyon	Reaktif Hacimleri (x1)
sdH ₂ O	-	6,62 µl
10X Tampon	1X	1,5 µl
10 mM dNTP	200 µM	0,3 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	0,9 µl
10 µM Primer (İleri)	0,2 µM	0,3 µl
10 µM Primer (Geri)	0,2 µM	0,3 µl
5U/µl Taq Polimeraz	0,4 U	0,08 µl
Kalıp DNA	-	5 µl

Reaksiyonun gerçekleşmesi için evrensel M13-20 ve M13-26 primerleri kullanılmıştır. Koloni PZR 96'luk plate'lerde yapılmış; plate dik tutularak ilk dört satır örnek sayısını, sekiz sütun ise örnek başına koloni sayısını ifade edecek şekilde deney planlanmıştır. Plate'in şematik görüntüsü Şekil 2.6.'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Koloni PZR'da örneklerin ve örneklere ait kolonilerin plate'te yerleşiminin şematik görüntüsü.

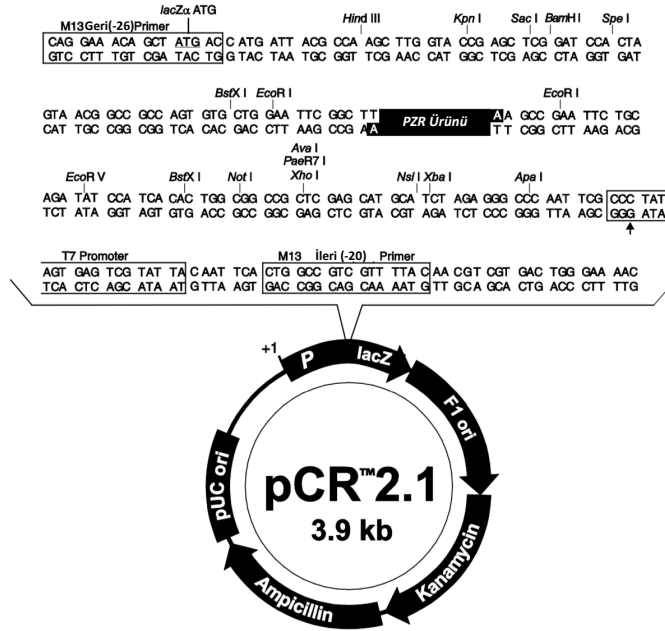
Her kuyuya belirtilen hacimde su koyulup, seçilen rastgele koloniler pipet ucuyla alınarak kuyulardaki suyun içinde süspansiyon edilmiştir. Her örnek için alınan yeni kanamisinli petri kabı sekiz hücreye bölünmüş, süspansiyon sonrasında aynı pipet ucu kendisi için ayrılan hücreye yalnızca birkaç kez dokundurularak tekrar ekim yapılmıştır. Böylelikle her örneğe ait bir tane ekim petrisi, bir tane de kendisine ait sekiz adet kolonisinin bulunduğu ve plate'teki sırasının aynısını yansıtan koloni PZR petrisi oluşturulmuştur.

Kolonilerin her biri kuyularda süspansiyon edilip kendisi için ayrılan hücreye ekildikten sonra yukarıda belirtilen reaktifler için PZR karışımı hazırlanarak kuyulara 10'ar µl olarak bölünmüş ve toplamda her kuyuda 15 µl olacak şekilde koloni PZR için belirtilen koşullarda reaksiyon başlatılmıştır.

94°C	2 dakika	
94°C	20 saniye	} X 40
50 °C	45 saniye	
72°C	60 saniye	
72°C	5 dakika	

Hedef gen bölgesinin aktarıldığı bakteri kolonilerinin seçilmesi

Reaksiyon sonunda bütün koloniler, %2'lik agaroz jelde yürütülmüş, ardından etidyum bromürlü tamponda bekletildikten sonra görüntülenmiştir. Koloni PZR sırasında kullanılan M13-20 ve M13-26 primerleri, plazmidin yaklaşık 200 bç'lik bir bölgesini çoğaltmaktadır. Hedef genin plazmide bağlanacağı bölge, bu iki primerin yerleşim yerinin ortasında bulunmaktadır. Primerlerin ve PZR ürününün plazmid içerisindeki yerleşimi Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. pCR 2.1 vektörün haritası (Invitrogen TA Cloning Kit protokolünden alınmıştır).

Geni alan plazmidleri içeren bakteriler, jel görüntülemesi sırasında hedef gen ile beraber yaklaşık 450-500 bp aralığında görülürken; kendi üzerine kapanarak geni alamayan plazmidleri içeren bakteriler 200 bp'e yakın bir ağırlıkta görülmektedir. Görüntüleme sonucu klonlama işlemi pozitif olduğu tespit edilen plaklar petride işaretlenmiştir.

Plazmid izolasyonu

Pozitif kolonilerin DNA dizi analizi öncesinde plazmid izolasyonunu gerçekleştirebilmek için, 50 ml "Luria-Bertani (LB)" içerisinde 50µg/ml kanamisin olacak şekilde karışım hazırlanarak, ters-yüz ile karıştırılmıştır. İzole edilmek üzere her örnek için üç adet pozitif koloni seçilmiş ve toplam koloni sayısı kadar 2 ml'lik ependorf ve 15 ml'lik falcon tüp, "örnek kodu-koloni sayısı" şeklinde isim verilerek hazırlanmıştır. İlk olarak 1 ml LB-kanamisin karışımı ependorf tüpe alınmış, ardından pozitif koloniler pipet ucu yardımı ile alınarak tüp içerisinde hassas şekilde süspanse edilmiştir. Daha sonra tüplerin içerikleri, aynı kodlu 15 ml'lik falcon tüpe aktarılmış ve üzerlerine 1 ml daha LB-kanamisin karışımı eklenerek 37°C'de bir gece çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün inkübasyondan alınan falcon tüpleri için Mini Prep Plazmid İzolasyon Protokolü uygulanmıştır.

DNA dizi analizi

Plazmid izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin DNA dizi analizi, BM Labosis tarafından hizmet alımı ile tamamlanmıştır. Her örnek için ilk aşamada üç adet pozitif koloni dizi analizine gönderilmiştir. İki farklı allel tespit edilmesi hedeflenerek gerçekleştirilen DNA dizi analizi sonucunda başarılı sonuç elde edilen diziler analizlere alınmış; henüz tek allel tespit edilmiş olan örnekler için pozitif kolonilerin belirlenmesinden sonra gerçekleşen plazmid izolasyonu basmağı yeni üç adet koloni için tekrarlanmıştır.

2.2.4. *period* Geninin Amplifikasyonu

Tez çalışmasına dahil edilen tüm örnekler için *period* geninin amplifikasyonu, literatürde yer alan bütün primerler ve PZR koşulları altında denenmiştir [36, 43]; ancak Yeni Dünya kum sineklerinin amplifikasyonunu gerçekleştiren bu koşullar, Türkiye’de örneklenen hiçbir Eski Dünya kum sineği türünün *period* genini amplifiye etmede başarılı sonuç vermemiştir. Çalışmaya dahil edilen her tür için ayrı optimizasyon çalışması gerekmiş, bu doğrultuda yedi tür ve dört tür kompleksine ait bireyler deneme çalışmalarına dahil edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları her basamak için ayrı değerlendirilmiş, tüm değerlendirmelerin ardından oldukça kapsamlı bir deney planı çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar, aşağıda sırası ile yer almaktadır:

- *Primerlerin optimizasyonu*

Yeni primer tasarımı: Literatürde yer alan primerlerin olumlu sonuç vermemesi nedeniyle Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hilal Özdağ’ın danışmanlığı ve gözetiminde dejenere primer tasarlanmıştır. Bunun için, *period* gen dizisi bilinen tek Eski Dünya kum sineği olan *Phlebotomus dubosqi*’nin DNA dizisi ile, içlerinde *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Mus musculus* gibi farklı organizasyon düzeyindeki canlı gruplarının DNA dizisinin olduğu bir hizalama yapılmış, analize alınan tüm canlılar için aynı olan nükleotidler olduğu gibi bırakılıp, değişken nükleotidlerin yerine mevcut değişimi karşılayan dejenere nükleotid yazılarak yeni bir primer oluşturulmuştur. Bu yeni dejenere tasarım, hedef geni en uzun şekilde amplifiye edecek olan ve türler arasında en iyi tasarlanmış primer olarak görülen, literatürdeki 5L1per2 (ileri) ve 3L1per2 (geri) primerleri üzerinden yapılmıştır. 3L1per2 (geri) primeri, tüm canlı grupları arasında %100 korunmuş görüldüğünden, değişim yalnızca 5L1per2 (ileri) primerinde yapılmış ve 5L1per2deg olarak isimlendirilmiştir. Primer çiftinin dizisi aşağıda yer almaktadır:

5L1per2deg (ileri)	5'-WGCRTCYTTTTGYAGYAAACC-3'
3L1per2 (geri)	5'-TCAGATGAACTCTTGCTGTC-3'

Var olan primerin modifikasyonu: Literatüdeki en uygun primer olarak görülen 5L1per2 (ileri) ve 3L1per2 (geri) primer çifti, çalışacağımız türlere görece en yakın tür olan *P. dubosqi*'nin DNA dizisi üzerine yerleştirilerek bağlanma başarısı kontrol edilmiş, ileri primerin bittiği noktadan sonra iki adet "sitozin" nükleotidinin bulunması nedeniyle, primerin diziye bağlanma şansını arttırmak için var olan diziye iki adet "c" bazı eklenerek ticari olarak temin edilmiş, adı 5L1per2_cc olarak değiştirilmiş ve 3L1per2 primerinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Primerlerin dizileri aşağıda gösterilmiştir:

5L1per2_cc (ileri)	5'-AGCATCCTTTTGTAGCAAACCC-3'
3L1per2 (geri)	5'-TCAGATGAACTCTTGCTGTC-3'

- *MgCl₂ konsantrasyonu*

Reaktiflerin son konsantrasyonlarının hesaplanması sırasında MgCl₂ için 1, 1,5 ve 2 mM'lık son konsantrasyon değerlendirmeye alınmış, denemelerde her üç konsantrasyon için de ayrı hesaplamalar yapılarak reaksiyonlar kurulmuştur.

- *Primerlerin bağlanma sıcaklığı*

Primerlerin bağlanma sıcaklığı, ilk aşamada T_m derecelerine göre ayarlanmış olsa da, olumlu sonuç alınamaması nedeniyle denemelere 50°C, 55°C ve 60°C olmak üzere üç sıcaklık ile devam edilmiş, gerektiği durumda ince ayarlarla sıcaklığın yükseltilmesi veya düşürülmesi planlanmıştır.

- *Taq DNA polimeraz*

Farklı ticari markalara ait *Taq DNA polimeraz* enzimlerinin reaksiyonun başarısını değiştirip değiştirmediğini gözlemlemek amacı ile farklı markalara ait enzimler kullanılmıştır. Bu markalara ait protokollerde farklı bir sıcaklık döngüsü olması durumunda deneme çalışmalarına protokolde yer alan bu sıcaklık döngüleri de eklenmiştir.

Değerlendirilen tüm bu parametreler doğrultusunda, kapsamlı ve sıralı bir deney planı oluşturularak Türkiye’den örneklenmiş yedi tür ve dört tür kompleksi bireyinin *per* geninin amplifikasyonu için toplamda yedi farklı primer (sonuçlara göre yukarıda bahsedilen iki farklı primer çifti ile denemelere devam edilmiştir), üç farklı MgCl₂ konsantrasyonu, üç farklı primer bağlanma sıcaklığı ve 14 farklı ticari marka ile farklı kombinasyonlarda 1000’i aşkın deneme yapılmıştır. Tüm denemelerin sonucunda BIORON Taq DNA Polimeraz, DFS / KCl tamponları, 50°C-52°C primer bağlanma sıcaklığı, 2 mM MgCl₂ konsantrasyonu ve yukarıda bahsedilen iki yeni primer çifti ile dört tür ve iki tür kompleksi için başarılı sonuç alınmıştır. Çizelge 2.4. Türe özgü optimizasyon çalışmasının sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 2.2. Türe özgü PZR koşulları.

TÜRLER	PRIMER ÇİFTİ	TAQ SETİ	PCR DÖNGÜLERİ	REAKTİF HACİMLERİ (x1)
<i>P. tobbi</i> <i>S. minuta</i> <i>P. perfiliewi</i> sl.	5L1per2_cc - 3L1per2	BIORON (DFS tampon)	94 °C 2 dk 94 °C 10 sn 52 °C 20 sn x 35 72 °C 1 dk 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl
<i>P. papatasi</i>	5L1per2deg - 3L1per2	BIORON (DFS tampon)	95 °C 5 dk 95 °C 30 sn 50 °C 30 sn x 30 72 °C 30 dk 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl

Çizelge 2.2. devam ediyor.

<i>P. halepensis</i>	5L1per2_cc - 3L1per2	BIORON (KCl tampon)	94 °C 2 dk 94 °C 10 sn 52 °C 20 sn x 35 72 °C 1 dk 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl
<i>Paraphlebotomus</i> sp. (Genel döngü)	5L1per2deg - 3L1per2	BIORON (KCl tampon)	94 °C 2 dk 94 °C 10 sn 52 °C 20 sn x 35 72 °C 45 sn 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl
<i>Paraphlebotomus</i> sp. (Silik bant veren veya bant vermeyen örnekler için)	5L1per2deg - 3L1per2	BIORON (KCl tampon)	94 °C 2 dk 94 °C 10 sn 52 °C 20 sn x 35 72 °C 1 dk 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl
<i>Paraphlebotomus</i> sp. (Çift bant veren örnekler için)	5L1per2deg - 3L1per2	BIORON (KCl tampon)	94 °C 2 dk 94 °C 10 sn 52 °C 20 sn x 30 72 °C 1 dk 72 °C 10 dk	sdH ₂ O : 15,85 µl 10x Tampon : 2,5 µl 2,5 mM dNTP : 2 µl 100 mM MgCl ₂ : 0,5 µl 10 µM İ. Primer : 1 µl 10 µM G. Primer : 1 µl Taq Polimeraz : 0,15 µl DNA : 2 µl Toplam : 25 µl

2.2.5. *period* Geninin DNA Dizi Analizi

Amplifikasyonu gerçekleştirilen *period* geninin pürifikasyonu ve DNA dizi analizi, BM Labosis tarafından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonda kullanılan iki farklı primer çifti ile dizileme reaksiyonu çift yönlü olarak tamamlanmıştır. Her örnek için elde edilen iki adet DNA dizi, Qiagen CLC Main Workbench 8 programı ile hizalanarak, örneklere ait tek bir DNA dizisi elde edilmiştir.

2.3. DNA Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

İki farklı gen için sonuçlar elde edilmiş, bu sonuçlar doğrultusunda gen bölgeleri aynı yol izlenerek kendi içlerinde analiz edilmiştir. Her iki gene ait DNA dizileri, MEGA 7 ve Unipro UGENE yazılımları kullanılarak hizalanmış ve düzenlenmiştir. Oluşturulan düzenlenmiş diziler kullanılarak filogenetik analizler ve populasyon genetiği analizleri gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında *cacophony* ve *period* gen bölgeleri için amplifikasyonu gerçekleştiren tüm örneklerin DnaSP v6 yazılımı kullanılarak haplotipleri elde edilmiştir. Her bir alt cins için MEGA 7 yazılımı kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli belirlenmiş, bu modeller altında filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Tüm bireyler kullanılarak tür içi ve türler arası genetik uzaklıklar hesaplanmıştır. Türkiye’de geniş bir alanda yayılım gösteren *Phlebotomus kandelakii* s.l. ve *Phlebotomus major* s.l. tür kompleksleri için *cacophony* geninin Arlequin v.3.1.1 yazılımı kullanılarak moleküler varyans analizleri (AMOVA) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda söz konusu türler içerisinde yüksek orada gözlenen varyasyonun kaynağı araştırılmıştır.

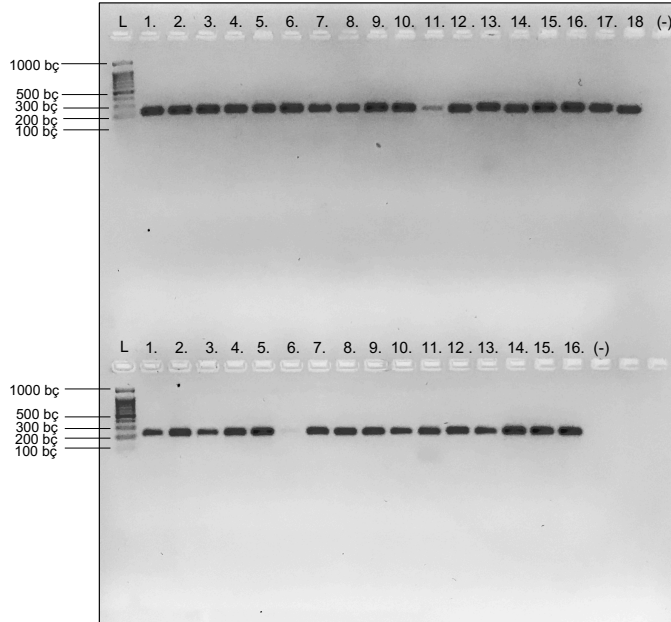
3. BULGULAR

3.1. *cacophony* Geni İçin Elde Edilen Bulgular

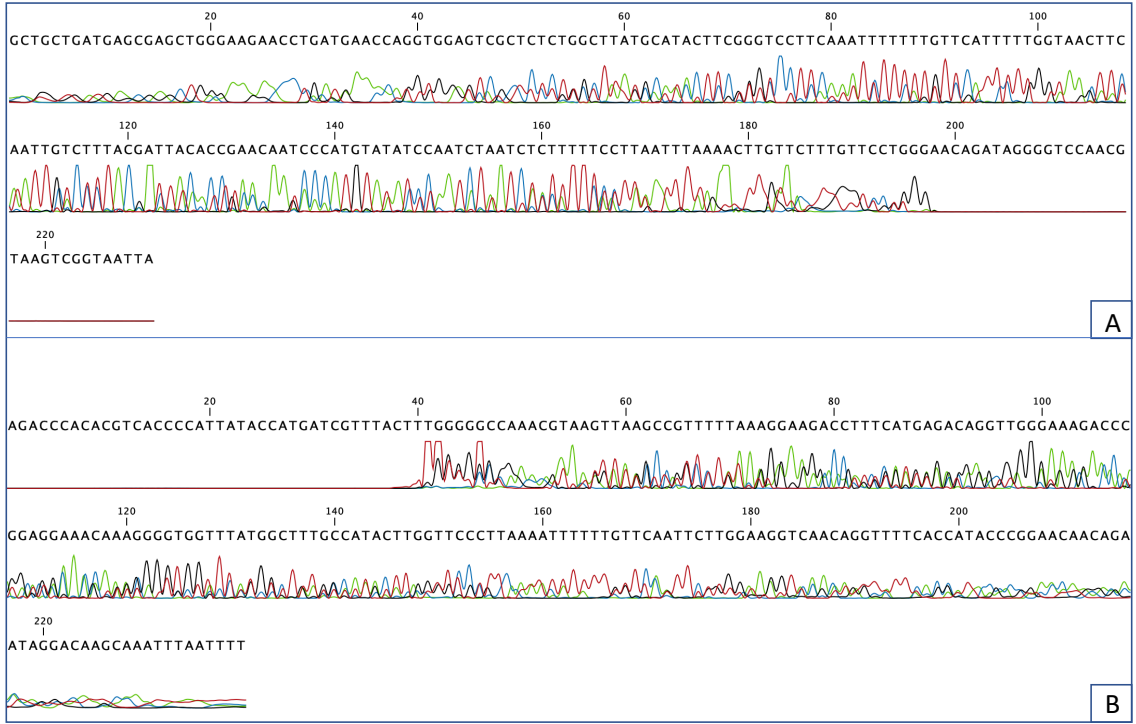
Morfolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisi gerçekleştirilen farklı alt cinslere ait 884 adet kum sineği örneğinin *cacophony* geni analiz edilmiş, elde edilen sonuçlar alt cinslere göre aşağıda verilmiştir:

3.1.1. *Phlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye’de *Phlebotomus* alt cinsine ait tek tür olan *Phlebotomus papatasi*’nin 14 farklı lokaliteden toplanan 69 örneği için PZR gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucunda jele yüklenen her bir örneğe ait bant ağırlığı beklenen aralıkta gözlenmiştir. Örneklerin hepsi için çift yönlü DNA dizi analizi gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar istisnasız tüm örneklerde indel olduğunu ortaya koymuştur. *P. papatasi* örneklerine ait agaroz jel elektroforezi Şekil 3.1.’de, dizi analizi sonucu elde edilen kromotogram görüntüsü ise Şekil 3.2.’de verilmiştir.



Şekil 3.1. *cacophony* geni amplifikasyonu gerçekleştirilen *P. papatasi* bireylerine ait örnek agaroz jel elektroforezi görüntüsü (L: DNA moleküler ağırlık belirteci, 1-18: Çalışılan örnekler, (-): Negatif kontrol).



Şekil 3.2. *Cacophony* geni DNA dizi analizi gerçekleştirilen *P. papatasi* bireyleri için örnek kromotogram görüntüsü (A. İleri okuma, B. Geri okuma görüntüsü).

P. papatasi örneklerinde var olduğu belirlenen indelin, diğer türlerin örneklerinde gözlenen indel örüntüsünün aksine amplifiye edilen yaklaşık 240 bç'lik bölgenin tamamında görülmesi nedeniyle, bu örneklere ait herhangi bir insersiyon / delesyon örüntüsü manuel olarak ortaya koyulamamıştır. Herhangi bir örüntü çıkarılamamasının yanı sıra, *P. papatasi* türünün yayılım alanı içerisindeki yerel popülasyonları arasında gen akışının devam ettiğini ve popülasyonlar arasında herhangi bir üreme izolasyonunun henüz bulunmadığını ileri süren araştırmalar göz önünde bulundurularak [44] bu türe ait klonlanacak temsilci birey veya bireyler seçilmemiş, bu nedenle *P. papatasi* örnekleri daha sonraki analizlere dahil edilmemiştir.

3.1.2. *Paraphlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Phlebotomus similis dışında Türkiye'de yayılım gösterdiği bilinen tüm *Paraphlebotomus* türleri çalışmaya dahil edilmiş ve 17 lokaliteden toplam 105

örneğin *cacophony* geni analiz edilmiştir. Ayrıca morfolojik karakterler kullanılarak tür düzeyinde hiçbir kategoriye dahil edilemeyen dört *Paraphlebotomus* sp. örneği de çalışmaya dahil edilmiştir. Alt cins içerisinde yer alan tüm türlerde heterozigot insersiyon / delesyon içeren bireylerin var olduğu, DNA dizi analizleri sonucunda tespit edilmiştir. Bu doğrultuda *P. alexandri* için 31, *P. caucasicus* için bir, *P. jacusieli* için altı ve *P. sergenti* için sekiz örneğin DNA dizisi başarılı şekilde elde edilmiş; *P. alexandri* ve *P. caucasicus* için birer, *P. jacusieli* için iki, *P. sergenti* için 53 ve *Paraphlebotomus* sp. için ise tüm örneklerde heterozigot insersiyon / delesyon olduğu tespit edilmiştir. *P. alexandri*, *P. caucasicus* ve *P. jacusieli*'nin tüm lokalitelere ait temsilcileri için *cacophony* geninin dizisine ulaşılmışken, *P. sergenti* s.l. sadece Bursa'dan örneklenen temsilciler ile bu genlere ait analizlere dahil edilmiştir. Her lokaliteden yeterli sayıda kum sineği örneğinin *cacophony* dizisine ulaşılması, yeterli sayıda temsilci bireyin bulunmaması durumunda ise sonuçların *period* geni ile desteklenmesi nedeni ile bu alt cinse ait hiçbir birey klonlanmamıştır.

Her türe ait örneğin *cacophony* geni hizalanıp düzenlenerek analizlere hazır hale getirilmiş ve bütün türlerin haplotipleri belirlenmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen yaklaşık 230 bç'lik gen bölgesi için yapılan değerlendirmeler sonucunda *P. alexandri*'ye ait beş, *P. caucasicus*'a ait bir, *P. jacusieli*'ye ait dört ve *P. sergenti*'ye ait iki adet olmak üzere *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde toplamda 12 adet haplotipin var olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her bir tür için haplotip çeşitliliği hesaplanmıştır. Analizlere tek birey ile katılan *P. caucasicus*'un haplotip çeşitliliği sıfır olarak bulunmuştur. En yüksek haplotip çeşitliliğini 0.80 değeri ile *P. jacusieli*, en düşük haplotip çeşitliliğini ise 0.24 değeri ile *P. alexandri* göstermiş, *P. sergenti* s.l.'nin haplotip çeşitliliği ise 0.46 olarak tespit edilmiştir.

Filogenetik analizler ve popülasyon genetiği analizleri klonlama gerekmeksizin DNA dizisine ulaşılan örnekler ile gerçekleştirilmiş, indel içeren bireyler herhangi bir analiz çerçevesinde değerlendirmeye alınmamıştır. *Cacophony* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, her bir türe ait haplotip sayısı ve haplotip çeşitlilik değerleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *cacophony* geni analiz edilen *Paraphlebotomus* türleri için DNA dizisi elde edilen ve heterozigot indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için tespit edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitlilik değerleri

	<i>P. alexandri</i>	<i>P. caucasicus</i>	<i>P. jacusieli</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>Paraphlebotomus</i> sp.
<i>cacophony</i> dizisi olan örnek sayısı	31	1	6	8	0
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	1	1	2	53	4
Haplotip sayısı	5	1	4	2	0
Haplotip çeşitliliği	0.24	0	0.8	0.46	-

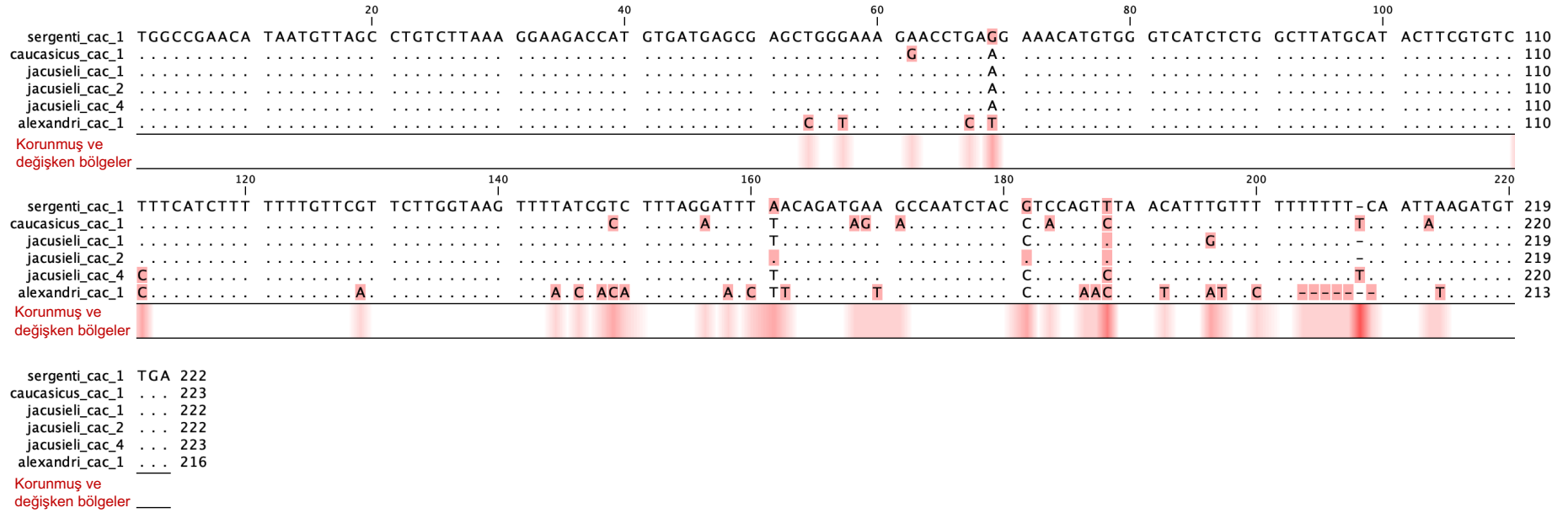
Paraphlebotomus türlerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, *cacophony* haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.2.'de, bu alt cinse ait türlerin *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. *Paraphlebotomus* türlerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. alexandri</i>	Mardin	DRI 11	alexandri_cac_1 / 2
	Mersin	PAL 2.48	alexandri_cac_1
		YLIM 2.46	alexandri_cac_1
		KDIS 2.36	alexandri_cac_1
		KDIS 2.58	alexandri_cac_1
		KDIS 2.59	alexandri_cac_1
		KDIS 2.61	alexandri_cac_1 / 2
	Artvin	TEK 2.48	alexandri_cac_1 / 5
	Aydın	AKB 63	alexandri_cac_1
		AKB 109	alexandri_cac_1
AKB 2.43		alexandri_cac_1	
AKB 2.44		alexandri_cac_1	
AKB 2.50		alexandri_cac_1	
AKB 2.59		alexandri_cac_1	
	AKB 2.66	alexandri_cac_4	

Çizelge 3.2. devam ediyor.

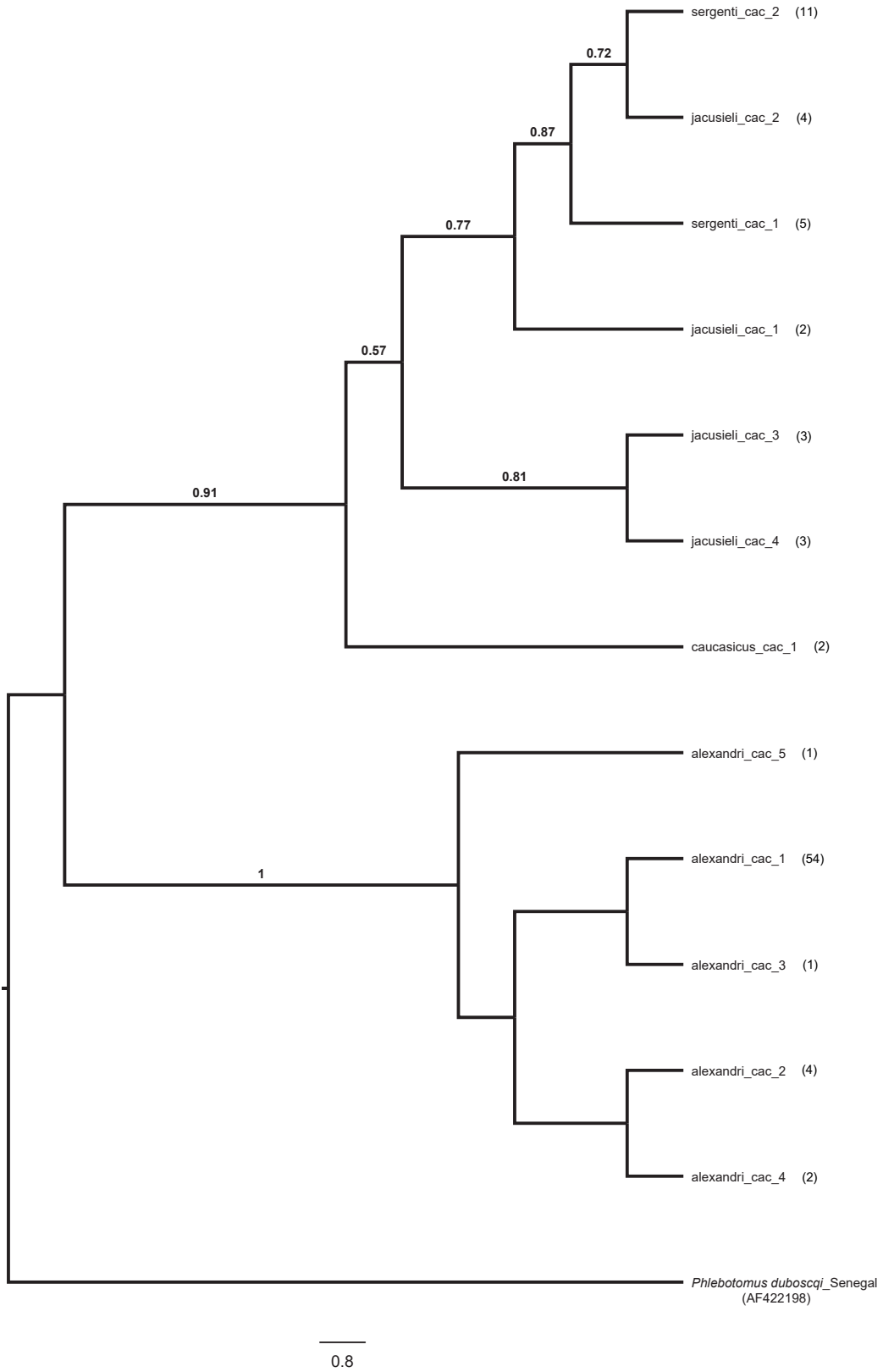
Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. alexandri</i>	İzmir	KRBRN 28	alexandri_cac_1
		KRBRN 29	alexandri_cac_1
		KRBRN 63	alexandri_cac_1
		SFR 32	alexandri_cac_1 / 2
		SFR 69	alexandri_cac_1
	Erzincan	BAG 1.10	alexandri_cac_1
	Antalya	BLD 3.36	alexandri_cac_1
		BLD 3.39	alexandri_cac_1
		BLD 3.67	alexandri_cac_1 / 2
		BLD 3.89	alexandri_cac_1
BLD 3.104		alexandri_cac_1	
BLD 3.127		alexandri_cac_1	
BLD 4.16		alexandri_cac_1	
BLD 66	alexandri_cac_1		
Malatya	BG 2.208	alexandri_cac_1	
<i>P. caucasicus</i>	Kars	TK 21-4.2	caucasicus_cac_1
<i>P. jacusieli</i>	Karabük	GS 2	jacusieli_cac_2
		GS 3	jacusieli_cac_2
	Erzincan	YUVA 2.76	jacusieli_cac_4
		YUVA 2.77	jacusieli_cac_3 / 4
	YUVA 2.83	jacusieli_cac_3	
Antalya	IS 2	jacusieli_cac_1	
<i>P. sergenti</i>	Bursa	CUM 1.9	sergenti_cac_2
		GEL 1.2	sergenti_cac_2
		GEL 2.2	sergenti_cac_1
		GEL 2.3	sergenti_cac_1 / 2
		DY 3.15	sergenti_cac_2
		DY 3.16	sergenti_cac_2
		DY 3.18	sergenti_cac_2
		YAG 3.2	sergenti_cac_1



Şekil 3.3. Paraphlebotomus alt cinsine ait türlerin cacophony haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

Paraphlebotomus alt cinsine ait türlerin *cacophony* haplotipleri ve dış grup olarak GenBank'tan alınan *Phlebotomus* alt cinsine ait *Phlebotomus duboscqi* (GenBank erişim numarası: AF422198)'nin *cacophony* dizisi kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, söz konusu veri seti için T92 (Tamura 3-parameter) en uygun model olarak bulunmuştur. Bu nükleotid substitüsyon modeli altında ML filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Elde edilen ağaca göre Türkiye'de var olduğu bilinen tüm *Paraphlebotomus* türleri, *cacophony* geni bakımından yüksek bootstrap değerleri ile birbirlerinden ayrılmıştır.

Paraphlebotomus alt cinsi için *cacophony* genine ait diziler kullanılarak elde edilen ağaca göre, bu alt cinsin temelde iki soya ayrıldığı belirlenmiştir. Türkiye'nin birçok farklı yerinden toplanan *P. alexandri* örnekleri, coğrafi bölgeden bağımsız tek bir grup olarak belirgin bir şekilde diğer tüm *Paraphlebotomus* türlerinden ayrılarak soylardan ilkinin oluştururken; %91 bootstrap değeri ile oldukça iyi desteklenmiş diğer soyu *P. caucasicus*, *P. jacusieli* ve *P. sergenti* haplotipleri oluşturmaktadır. İkinci soyu oluşturan türlerden *P. caucasicus* türüne ait tek haplotipin, bu soy içerisinde yer alan diğer türlerden belirgin şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir. İkinci soy içerisinde yer alan diğer bir tür olan *P. jacusieli*'ye ait örnekler iki farklı alt soya ayrılmış; Erzincan örneklerini oluşturan *jacusieli_cac_3* ve *jacusieli_cac_4* haplotipleri birlikte gruplanarak belirgin şekilde diğer haplotiplerden ayrılıp yeni bir grup oluşturmuştur. Karabük'ten örneklenen ve diğer bir *P. jacusieli* haplotipi olan *jacusieli_cac_2*, Bursa'dan toplanan *P. sergenti* örnekleri ile birlikte ayrı bir alt soyu oluşturmuş, Antalya'dan toplanan *jacusieli_cac_1* haplotipi ise bu gruptan ayrılmıştır. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Paraphlebotomus* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.4.'te verilmiştir.



Şekil 3.4. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Paraphlebotomus* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Paraphlebotomus alt cinsine ait tüm bireylerin *cacophony* genine ait diziler kullanılarak tür içi ve türler arası genetik uzaklıklar hesaplanmıştır. Genetik uzaklık hesaplamalarında ML analizlerinde olduğu gibi, en uygun nükleotid substitüsyon modeli dikkate alınmıştır. Veri setine dahil edilen tüm bireyler için en uygun model T92 (Tamura 3-parameter) olarak belirlenmiş ve genetik uzaklık hesaplamaları bu modele göre gerçekleştirilmiştir. Türler arası genetik uzaklığın %1 ve üzeri bir değer gösterdiği, tür içi genetik uzaklığın ise *P. jacusieli* dışındaki (%1) diğer tüm türler için %0.03 ile 0.16 arasında bir değer olduğu belirlenmiştir. Çizelge 3.4. *Paraphlebotomus* alt cinsi için elde edilen türler arası ve tür içi genetik uzaklık değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.3. *Paraphlebotomus* alt cinsinde yer alan türlerin *cacophony* geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.

	<i>P. sergenti</i>	<i>P. caucasicus</i>	<i>P. jacusieli</i>	<i>P. alexandri</i>
<i>P. sergenti</i>	0.0016	0.0148	0.0054	0.0255
<i>P. caucasicus</i>	0.0528	-	0.0131	0.0272
<i>P. jacusieli</i>	0.0134	0.0467	0.0131	0.0236
<i>P. alexandri</i>	0.1314	0.1436	0.1202	0.0003

Köşegen değerler (kırmızı font) : Tür içi genetik uzaklık değerleri
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font) : Türler arası genetik uzaklık değerleri
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font) : Türler arası standart sapma değerleri

Paraphlebotomus alt cinsi içerisinde iki ayrı takson olarak sınıflandırılan *P. jacusieli* ve *P. sergenti* s.l. arasında gözlenen %1'lik genetik uzaklığın, *P. jacusieli* için tür içi genetik uzaklık analizlerinde de aynı değerde olması sonucu, genetik uzaklık hesaplamaları tekrarlanmıştır. ML filogenetik ağacında *P. jacusieli* ve *P. sergenti* s.l. haplotiplerinin olduğu iki alt soy gruplara ayrılmıştır. Birinci grubu *jacusieli_cac_3* ve *jacusieli_cac_4* haplotipleri, ikinci grubu ise *jacusieli_cac_1*, *sergenti_cac_1*, *jacusieli_cac_2*, *sergenti_cac_2* haplotipleri oluşturmuş, tür içi ve türler arası genetik uzaklıklar bu gruplandırma dikkate alınarak hesaplanmıştır. Analiz sonucunda tür içi genetik uzaklık birinci grup için %0.15, ikinci grup için ise %0.38 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda tür içi genetik uzaklık, diğer türlerde olduğu gibi *P. jacusieli* için de %1'in altında bir değer olarak bulunmuştur. Daha detaylı analizler

gerçekleştirilerek, jacusieli_cac_3 ve jacusieli_cac_4 haplotiplerinde herhangi bir değişiklik yapılmadan birinci grup olarak değerlendirmeye alınmış; Antalya'dan toplanan jacusieli_cac_1 haplotipi ikinci grup, sergenti_cac_1, jacusieli_cac_2 ve sergenti_cac_2 haplotipleri ise üçüncü grup olarak analize dahil edilmiştir. Sonuçta tür içi genetik uzaklık birinci grup için %0.15, üçüncü grup için ise %0.14 olarak hesaplanmıştır. İkinci grubu oluşturan tek bir haplotipin olması sebebiyle, bu gruba ait tür içi genetik uzaklık değeri bulunmamıştır. Elde edilen yeni sonuçlar Çizelge 3.5.'te yer almaktadır.

Çizelge 3.4. *Paraphlebotomus* alt cinsinde yer alan grupların *cacophony* geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.

	Grup1	Grup2	Grup3	<i>P. caucasicus</i>	<i>P. alexandri</i>
Grup1	0.0015	0.0077	0.0090	0.0137	0.0229
Grup2	0.0152	-	0.0075	0.0142	0.0241
Grup3	0.0208	0.0146	0.0014	0.0151	0.0248
<i>P. caucasicus</i>	0.0435	0.0468	0.0525	-	0.0271
<i>P. alexandri</i>	0.1120	0.1212	0.1315	0.1436	0.0003

Köşegen değerler (kırmızı font) : Grup içi genetik uzaklık değerleri
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font) : Gruplar arası genetik uzaklık değerleri
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font) : Gruplar arası standart sapma değerleri

Tekrar edilen genetik uzaklık hesaplamaları ile tür içi genetik uzaklık oranı tüm türlerde %0.03 ile 0.15 arasında bulunmuştur. Yapılan ayrıntılı analizler sonucunda elde edilen genetik uzaklık değerleri, ikinci ana soy hattında temelde üç ana grubun varlığını ortaya koyarak ML filogenetik ağacındaki sonuçları desteklemektedir.

3.1.3. *Larroussius* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye'de yayılım gösterdiği bilinen *Larroussius* alt cinsine ait bütün tür ve tür kompleksleri çalışmaya dahil edilmiş, 30 lokaliteden 491 adet kum sineği örneğinin *cacophony* geninin analizleri gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi sonucu bütün türlerde heterozigot insersiyon / delesyon gösteren bireylerin var olduğu tespit edilmiştir. *Phlebotomus kandelakii* s.l. için 15, *Phlebotomus major*

s.l. için 122, *Phlebotomus perfiliewi* s.l. için 33 ve *Phlebotomus tobbi* için ise 57 örnekte heterozigot insersiyon / delesyon gözlenmiştir. Söz konusu indel durumunun *Larroussius* alt cinsi içerisinde oldukça fazla bir oranda bulunması ve bu alt cins içerisinde üç adet tür kompleksinin var olması nedeni ile her tür için bir indel örüntüsünün çıkarılması, yapılan analizlerin ilk basamağını oluşturmuştur. *P. kandelakii* s.l. ve *P. major* s.l. örneklerinin DNA dizi analizleri sonucunda elde edilen *cacophony* dizileri manuel olarak analiz edilmiş ve hem *P. kandelakii* s.l. için hem de *P. major* s.l. için dörder adet indel örüntüsü tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, *P. perfiliewi* s.l. örneklerinin Türkiye’de tek takson olarak bulunduğu ile ilgili çalışmalar [12] doğrultusunda bu türe ait bireyler için herhangi bir indel örüntüsü oluşturulmamış ve klonlama basamağına dahil edilmemiştir. Aynı zamanda *cacophony* dizisi elde edilmemiş *P. perfiliewi* s.l. örneklerine ait analizler *period* geni analizleri ile desteklenmiş, bu nedenle bu taksona ait *cacophony* analizleri, klonlama basamağına ihtiyaç duyulmaksızın DNA dizisine ulaşılan örnekler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen tüm yerel populasyonlarda bireyler arasında gen akışının devam ettiği ile ilgili çalışmalar bulunan [12] *P. tobbi* örnekleri için de indel örüntüsü oluşturulmamış; ancak bu türe ait rastgele seçilen iki adet örnek klonlanarak *cacophony* gen dizilerine ulaşılmıştır. *P. kandelakii* s.l. bireylerinin toplandığı her lokaliteden temsilci örnek çalışmaya alınmıştır. Buna ek olarak bazı lokalitelerden toplanan örneklerin tüm bireylerinde indel gözlenmesi nedeniyle *P. major* s.l. örnekleri için Edirne, Aydın ve Mardin’den; *P. perfiliewi* s.l. örnekleri için Erzincan’dan ve *P. tobbi* örnekleri için Ankara, Iğdır, Samsun ve Adana’dan temsilci birey / bireylere ait *cacophony* dizisi elde edilememiştir.

Larroussius alt cinsine ait tüm türler için elde edilen *cacophony* gen dizileri hizalanıp düzenlenmiş, haplotipleri belirlenmiştir. Haplotiplerin belirlenmesi sırasında klonlardan gelen DNA dizileri analizlere dahil edilmiştir. Ancak klonlama işlemini takiben seçilen koloniler ile gerçekleştirilen DNA dizi analizleri sonucunda, *P. kandelakii* s.l. ve *P. major* s.l. örneklerinde birey başına ikiden fazla farklı DNA dizisinin var olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu farklı diziler, haplotip analizlerine dahil edilmiştir; ancak bu işlem yalnızca farklı haplotipleri ortaya koymak için gerçekleştirilmiştir. Sonraki analizlere dahil edilecek DNA

dizileri, diğer örneklerden elde edilen diziler ile hizalanarak popülasyonda temsil edilip edilmeme durumlarına göre seçilmiştir. Hizalama sonucunda söz konusu türün herhangi bir popülasyonunda var olduğu kanıtlanamayan *cacophony* genine ait DNA dizisi, haplotip çeşitliliği de dahil olmak üzere hiçbir analize dahil edilmemiştir. Bu doğrultuda *P. kandelakii* s.l. için dokuz, *P. major* s.l. için 40, *P. perfiliewi* s.l. için 15 ve *P. tobbi* için 38 haplotipin var olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her bir tür için haplotip çeşitliliği hesaplanmıştır. *Larroussius* alt cinsi içerisinde toplamda 102 haplotipin varlığı belirlenmiştir. Türler arasında gözlenen en yüksek haplotip çeşitliliğini 0.94 değeri ile *P. major* s.l., ardından en yüksek çeşitliliği ise 0.92 değeri ile *P. tobbi* göstermiş; en düşük çeşitlilik 0.50 değeri ile *P. kandelakii* s.l.'de gözlenirken, *P. perfiliewi* s.l. için haplotip çeşitliliği 0.69 olarak hesaplanmıştır. *Larroussius* alt cinsi için *cacophony* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, her bire ait haplotip sayısı ve haplotip çeşitlilik değerleri Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. *Cacophony* geni analiz edilen *Larroussius* türleri için DNA dizisi elde edilen ve heterozigot indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için tespit edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitlilik değerleri

	<i>P. kandelakii</i> s.l.	<i>P. major</i> s.l.	<i>P. perfiliewi</i> sl.	<i>P. tobbi</i>
<i>cacophony</i> dizisi olan örnek sayısı	42	68	80	40
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	15	122	33	57
Klonlanan örnek sayısı	4	5	0	2
Haplotip sayısı	9	40	15	38
Haplotip çeşitliliği	0.50*	0.94*	0.69	0.92

* Haplotip çeşitliliği, analizlere dahil edilmeyen klonlar çıkarılarak hesaplanmıştır.

Birey sayısının fazla olması ve türlerin içerisinde klonlanan örneklerin varlığı sebebiyle *Larroussius* alt cinsinin *cacophony* geninin analizleri her bir tür / tür

kompleksi için ayrı ayrı gerçekleştirilmiş, her analizden önce en uygun substitüsyon modeli veri setleri için ayrı hesaplanmıştır.

- *P. kandelakii* s.l. için *cacophony* sonuçları

P. kandelakii s.l. bireylerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. kandelakii* s.l. örneklerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>cac</i> Haplotip
<i>P. kandelakii</i> s.l.	Samsun	KOS 3.2	kandelakii_cac_7
		CIC 2.1	kandelakii_cac_7
		CIC 2.8	kandelakii_cac_7
		CIC 3.3 (Klon 5)*	kandelakii_cac_6
		CIC 3.3 (Klon 3)	kandelakii_cac_7
		DURA 3.1	kandelakii_cac_7
		DURA 3.2	kandelakii_cac_7
		DURA 3.3	kandelakii_cac_7
	Sinop	AKC 1.21	kandelakii_cac_7
	İğdır	Pirli 2 (Klon 2)	kandelakii_cac_2
		Pirli 2 (Klon 7)	kandelakii_cac_1
	Rize	YNK 2.3	kandelakii_cac_7
		YNK 2.7	kandelakii_cac_7
		YNK 2.8	kandelakii_cac_7
		YNK 2.9	kandelakii_cac_7
		YNK 2.10	kandelakii_cac_7
		YNK 2.11	kandelakii_cac_7
		YNK 3.8	kandelakii_cac_7
		YNK 3.9	kandelakii_cac_7
	YNK 3.10	kandelakii_cac_7	
Karabük	BLN 14	kandelakii_cac_7	
	BLN 55	kandelakii_cac_7	
	NEB 31	kandelakii_cac_7	
	NEB 114	kandelakii_cac_7 / 8	
	NEB 124	kandelakii_cac_7	
	NEB 144	kandelakii_cac_7	
	NEB 2.216	kandelakii_cac_7	
	NEB 2.219	kandelakii_cac_7	
NEB 2.222	kandelakii_cac_7		

Çizelge 3.7. devam ediyor.

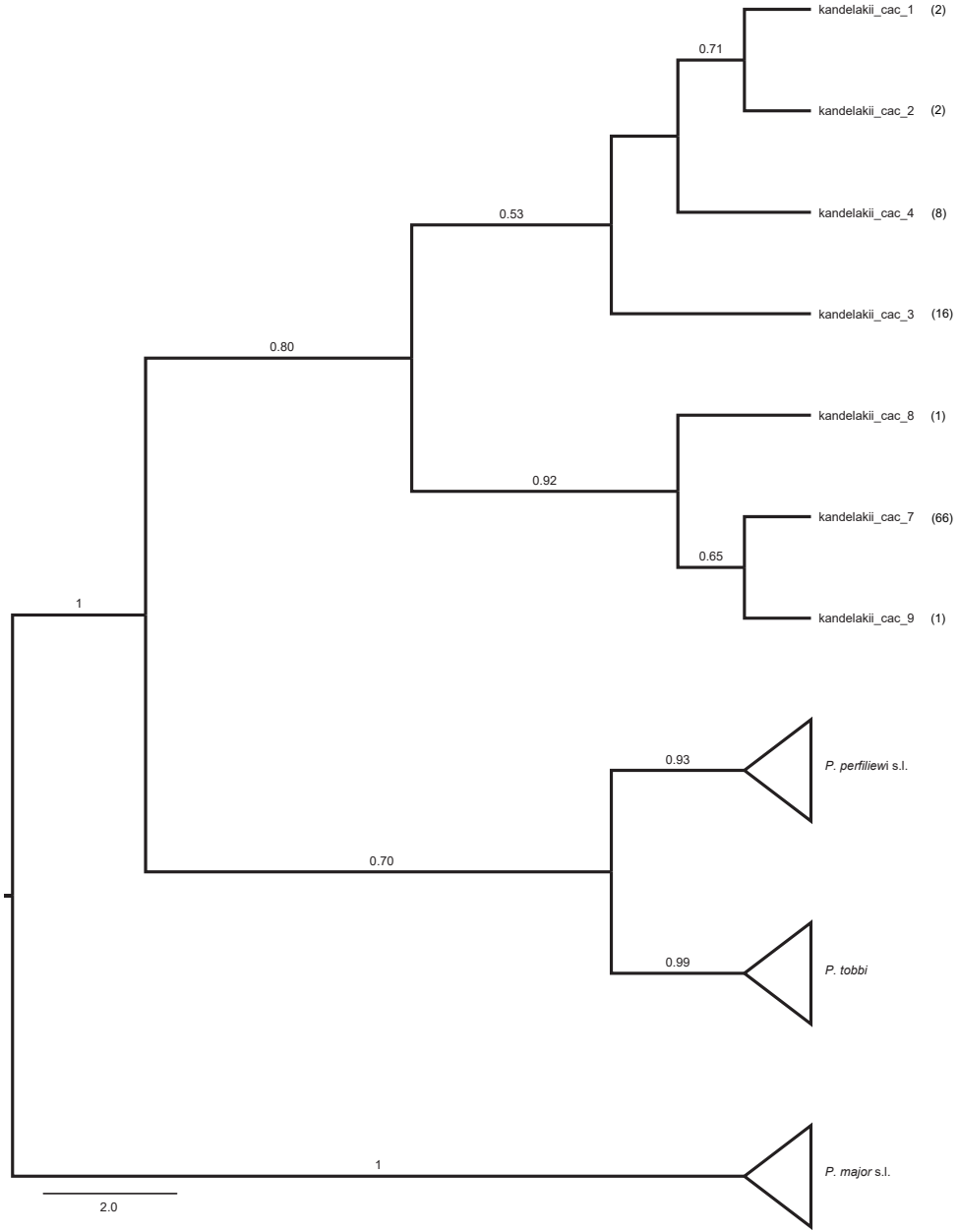
<i>P. kandelakii</i> s.l.	Antalya	BLD 11	kandelakii_cac_7
		BLD 100	kandelakii_cac_7
		BLD 140	kandelakii_cac_7
		BLD 2.3	kandelakii_cac_7
		BLD 3.99	kandelakii_cac_7
		BLD 3.102	kandelakii_cac_7
		BLD 3.161	kandelakii_cac_7
		BLD 4.10	kandelakii_cac_7 / 9
	Erzincan	YUVA 1.11	kandelakii_cac_3
		YUVA 1.16	kandelakii_cac_3
		KLM 1.21	kandelakii_cac_3
		KLM 1.22 (Klon 6)	kandelakii_cac_3
		KLM 1.22 (Klon 2)	kandelakii_cac_4
		KLM 1.24	kandelakii_cac_3
		KLM 1.28	kandelakii_cac_4
	Malatya	BG 1.20	kandelakii_cac_4
		DUM 1.7	kandelakii_cac_3
		DUM 1.8 (Klon 7)	kandelakii_cac_3
		DUM 1.8 (Klon 1)*	kandelakii_cac_5
		KKOY 1.10	kandelakii_cac_4
		KKOY 1.11	kandelakii_cac_3

* Populasyonda temsil edilmemesi nedeniyle hiçbir analize dahil edilmeyen klon haplotiplerini göstermektedir.

P. kandelakii s.l. örneklerinin analizleri için dış grup olarak *Larroussius* alt cinsine ait *P. major* s.l., *P. tobbi* ve *P. perfiliewi* s.l. örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, veri setine göre en uygun model K2+G (Kimura 2-parameter) olarak belirlenmiştir. Bu model altında ML filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Elde edilen *P. kandelakii* s.l. haplotipleri, temelde iki ana soya ayrılmıştır. İlk soyu Samsun, Rize, Karabük ve Antalya olmak üzere Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden toplanan kandelakii_cac_8, kandelakii_cac_7 ve kandelakii_cac_9 haplotipleri oluşturmaktadır. İkinci soyda ise kandelakii_cac_3, kandelakii_cac_4, kandelakii_cac_2 ve kandelakii_cac_1 haplotiplerinin yer aldığı Erzincan, Malatya ve Iğdır populasyonları bulunmaktadır. Birinci soyda bulunan kandelakii_cac_7 haplotipinin, Türkiye'de en çok bulunan *P. kandelakii* s.l. haplotipi olduğu bulunmuştur (haplotip frekansı 66). İkinci ana soyu oluşturan

haplotipler değerlendirildiğinde, Iğdır'dan örneklenen kandelakii_cac_1 ve kandelakii_cac_2 haplotiplerinin, %71 bootstrap değeri ile Erzincan ve Malatya popülasyonlarını temsil eden kandelakii_cac_3 ve kandelakii_cac_4 haplotiplerinden ayrıldığı görülmüştür. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *P. kandelakii* s.l. ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.5.'te verilmiştir.

P. kandelakii s.l. *cacophony* veri seti için tür içi genetik uzaklık hesaplamaları JC (Jukes-Cantor) modeli altında gerçekleştirilmiş, analize dahil edilen tüm popülasyonlar birlikte değerlendirildiğinde grup içi genetik uzaklık değerinin %1'den fazla olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak genetik uzaklık hesaplamaları, ML filogenetik ağacında belirgin şekilde ayrıldığı gözlenen iki ana soy hattı ayrı ayrı değerlendirilerek gerçekleştirildiğinde Samsun, Sinop, Rize, Karabük ve Antalya popülasyonlarının oluşturduğu ilk soy için grup içi genetik uzaklığın %0.00; Erzincan, Malatya ve Iğdır popülasyonlarının oluşturduğu ikinci soy için genetik uzaklığın ise %0.41 olduğu belirlenmiştir. Bu iki ana soy arası genetik uzaklık değeri ise %2.13 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.8.). Bu sonuçlar moleküler varyans analizi (AMOVA) ile de desteklenmiştir. Analiz edilen *P. kandelakii* s.l. örnekleri için gözlenen varyasyonun büyük bir kısmının filogenetik analizlerin işaret ettiği iki soy arasındaki varyasyondan (%92.75, $\Phi_{CT}=0.9275$, $p < 0.05$) kaynaklandığı, buna ek olarak bu soyları oluşturan popülasyonlar arası varyasyonun toplam varyasyonun %3.64'ünü oluşturduğu ($\Phi_{SC}=0.5022$, $p < 0.05$), popülasyon içi varyasyonun ise %3.61 ($\Phi_{SC}=0.9639$, $p<0.0001$) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. kandelakii* s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Çizelge 3.7. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. kandelakii* s.l. gruplarının *cacophony* geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.

	Grup 1	Grup 2
Grup 1	0.0000	0.0094
Grup 2	0.0213	0.0041
Köşegen değerler (kırmızı font) : Grup içi genetik uzaklık değerleri		
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font) : Gruplar arası genetik uzaklık değerleri		
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font) : Gruplar arası standart sapma değerleri		
Grup 1 : kandelakii_cac_7, 6, 8, 9		
Grup 2 : kandelakii_cac_3, 4, 5, 2, 1		

- *P. major* s.l. için *cacophony* sonuçları

P. major s.l. bireylerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.9.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. major* s.l. örneklerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. major</i> s.l.	Ankara	IM 1.7	major_cac_15 / 16
		YES 1.15	major_cac_15 / 16
		YES 2.8	major_cac_16 / 22
		YES 4.2	major_cac_15 / 16
	Rize	ISK 2.2	major_cac_16 / 22
		ISK 3.1	major_cac_16 / 22
		YYOL 5.2	major_cac_16 / 22
		YYOL 7.1	major_cac_16 / 22
		ZFR 2.3	major_cac_16 / 22
		DERE 2	major_cac_16 / 22
		ASL 5	major_cac_16 / 22
		YKOY 1.3	major_cac_16 / 22
		YKOY 1.33	major_cac_21
	Edirne	AL 3.12 (Klon 9)	major_cac_12
		AL 3.12 (Klon 5)	major_cac_13
AL 3.12 (Klon 8)*		major_cac_14	

Çizelge 3.8. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. major</i> s.l.	Tekirdağ	YM 1.4	major_cac_15 / 16
	Bursa	GEL 1.4 YAG 3.3	major_cac_19 / 20 major_cac_19 / 20
	Erzincan	BAG 1.21 YUVA 1.13	major_cac_19 / 20 major_cac_17 / 34
	Kırklareli	HAM 3	major_cac_23 / 26
	Sakarya	HIZ 6 HIZ 7 HIZ 10	major_cac_16 / 22 major_cac_16 / 22 major_cac_15 / 16
	Samsun	KOS 2.1 CIC 1.2 CIC 2.10 KAR 1	major_cac_12 / 21 major_cac_15 / 16 major_cac_16 / 22 major_cac_19 / 20
	Artvin	CML 3.2 CML 3.8 TEK 1.3 (Klon 8)* TEK 1.3 (Klon 7) TEK 1.3 (Klon 3) TEK 1.3 (Klon 2)* TEK 1.3 (Klon 1)* TEK 1.18	major_cac_6 major_cac_6 major_cac_5 major_cac_6 major_cac_7 major_cac_8 major_cac_9 major_cac_27 / 35
	İzmir	KRBRN 2 KRBRN 4 SFR 12 SFR 13 SFR 38 SFR 41	major_cac_16 / 22 major_cac_23 / 26 major_cac_15 / 16 major_cac_19 / 20 major_cac_16 / 22 major_cac_25 / 32
	Tokat	GK 4 GK 10	major_cac_15 / 16 major_cac_17 / 18
	Sinop	AKC 1.2 UC 2.1	major_cac_19 / 20 major_cac_15 / 16
	Çanakkale	IF 15.17	major_cac_21
	Kars	KARA 14.104 KARA 14.105 KOT 78.17	major_cac_28 major_cac_27 major_cac_27
	Karabük	BLN 2 BLN 3 NEB 2 NEB 3 YYL 2	major_cac_16 / 29 major_cac_23 / 26 major_cac_21 major_cac_12 major_cac_12

Çizelge 3.8. devam ediyor.

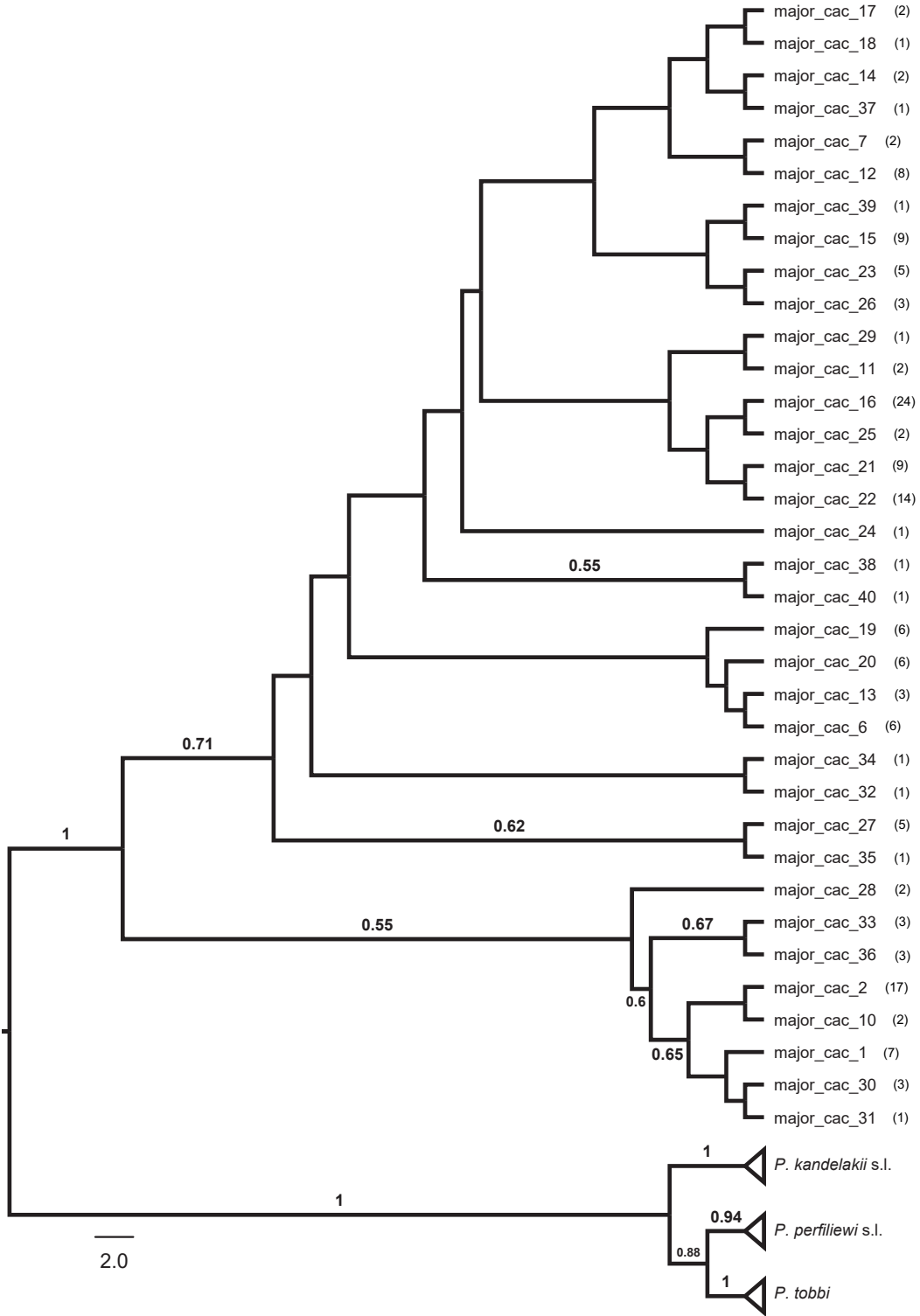
Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. major</i> s.l.	Antalya	BLD 4	major_cac_39 / 40
		BLD 6	major_cac_13 / 38
		BLD 7	major_cac_12 / 37
		GKC 2	major_cac_36
		GKC 3	major_cac_33 / 36
	Adana	OT 68	major_cac_2
		OT 99	major_cac_1 / 2
		SOF 95	major_cac_1 / 2
		DUT 16	major_cac_1 / 2
		DUT 42 (Klon 6)	major_cac_10
		CEL 12	major_cac_2
		TEP 3.97	major_cac_2
		ZER 264 (Klon 8)	major_cac_1
		ZER 264 (Klon 6)	major_cac_2
	ZER 264 (Klon 5)*	major_cac_3	
	ZER 264 (Klon 4)*	major_cac_4	
	Mersin	KDIS 4	major_cac_23 / 25
		KDIS 2.55	major_cac_23 / 24
SARI 2		major_cac_21	
Hatay	SEB 5	major_cac_2	
	SEB 19	major_cac_33	
K. Maraş	CUH 6	major_cac_30	
	CUH 10 (Klon 2)	major_cac_1	
	CUH 10 (Klon 8)	major_cac_11	
	CUH 12	major_cac_30 / 31	

* Populasyonda temsil edilmemesi nedeniyle hiçbir analize dahil edilmeyen klon haplotiplerini göstermektedir.

P. major s.l. haplotiplerinin ML filogenetik ağacını oluşturmak için dış grup olarak *Larrousius* alt cinsine ait *P. kandelakii* s.l., *P. perfiliewi* s.l. ve *P. tobbi* türlerine ait örnekler kullanılmıştır. Bu veri seti için hesaplanan ve en uygun nükleotid substitüsyon modeli olarak bulunan K2+G (Kimura 2-pameter + Gamma distributed) modeli altında filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Diğer analizlerde olduğu gibi, filogenetik analizler için de klonlama işlemi sonunda, tek bir örneğe

ait ikiden fazla *cacophony* geni dizisi elde edilen örnekler, gene ait diğer diziler ile hizalanmış, her birey için popülasyonda var olduğu bilinen iki adet DNA dizisi analizlere alınmış, diğer diziler analizlerin dışında tutulmuştur.

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan *P. major* s.l. örnekleri için oluşturulan ML filogenetik ağacı temelde iki ana soya ayrılmıştır. İlk ana soy hattını %55 bootstrap değeri ile major_cac_28, 33, 36, 2, 10, 1, 30 ve 31 haplotipleri; ikinci ana soy hattını ise, Türkiye’de var olduğu bilinen diğer *P. major* s.l. örneklerinden elde edilen haplotipler oluşturmuştur. Birinci soy hattı, kendi içerisinde üç alt soya ayrılmıştır: Bunlardan ilkinin Türkiye’de Adana, Hatay ve Kahramanmaraş’tan toplanan major_cac_2, 10, 1, 30 ve 31 haplotipleri oluşturmuştur. Bu alt soy, %65 bootstrap değeri ile desteklenerek, birinci soy içerisindeki diğer gruplardan ayrılmıştır. İkinci alt soyu major_cac_33 ve 36 haplotipleri oluşturmuş; Antalya ve Hatay’dan toplanan örnekler ait bu haplotiplerin bulunduğu alt soy, %67 bootstrap değeri ile desteklenmiştir. SEB 19 Hatay örneği, birinci alt soyda bulunan tüm Hatay örneklerinden; GKC2 ve GKC 3 Antalya örnekleri ise ikinci ana soyda bulunan diğer Antalya örneklerinden ayrılarak, birlikte farklı bir alt soyu oluşturmuştur. Üçüncü alt soyda ise tek bir Kars örneğinden elde edilen major_cac_28 haplotipinin yer aldığı görülmüştür. Hatay ve Antalya örneklerinde olduğu gibi KARA 14.104 Kars örneği (major_cac_28), diğer Kars örneklerinden ayrılarak farklı bir grup oluşturmuştur. Kahramanmaraş’tan toplanan ve heterozigot insersiyon / delesyon göstermesi nedeni ile klonlanan CUH 10 bireyine ait elde edilen iki adet allel, tüm *P. major* s.l. örnekleri için oluşturulan filogenetik ML ağacında farklı soylarda yer almış, allellerden biri (major_cac_1) birinci ana soy hattında bulunurken diğer allel (major_cac_11) ikinci ana soy hattında yer almıştır. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsine ait *P. major* s.l. örneklerinin ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.6.’da verilmiştir.



Şekil 3.6. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. major* s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

P. major s.l. bireylerine ait *cacophony* veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modelinin JC+G (Jukes-Cantor + Gamma distributed) olduğu tespit edilmiştir. Genetik uzaklık hesaplamaları bu model dikkate alınarak gerçekleştirilmiş ve *P. major* s.l. için tür içi genetik uzaklık değeri %1 olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar, ML filogenetik ağacında gözlemlenen ana ve alt soyların işaret ettiği dört grup dikkate alınarak tekrar gerçekleştirildiğinde, grup içi genetik uzaklık değerlerinin %0.16-%0.34 arasında değişiklik gösterdiği, buna ek olarak söz konusu gruplar arası genetik uzaklık değerinin ise %0.83-%2.75 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3.10.). *P. major* s.l. örneklerinin *cacophony* geni için gerçekleştirilen AMOVA sonuçları da bu sonuçları destekler niteliktedir. Dört grup arasında gözlemlenen varyasyonun (%83.40, $\Phi_{CT}=0.8340$, $p<0.0001$), grupları oluşturan populasyonlar arasında gözlemlenen varyasyondan (%6.14, $\Phi_{SC}=0.3700$, $p<0.001$) ve populasyon içi varyasyondan (%10.46, $\Phi_{SC}=0.8954$, $p<0.0001$) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.9. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. major* s.l. gruplarının *cacophony* geni bakımından grup içi ve gruplar arası genetik uzaklık değerleri.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 1	0,0027	0,0052	0,0086	0,0106
Grup 2	0,0083	0,0016	0,0070	0,0099
Grup 3	0,0168	0,0116	-	0,0112
Grup 4	0,0275	0,0236	0,0266	0,0034
Köşegen değerler (kırmızı font)			: Tür içi genetik uzaklık değerleri	
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font)			: Türler arası genetik uzaklık değerleri	
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font)			: Türler arası standart sapma değerleri	
Grup 1 : major_cac_2, 10, 1, 30, 31				
Grup 2 : major_cac_33, 36				
Grup 3 : major_cac_28				
Grup 4 : Kalan bütün major haplotipleri				

- *P. perfilewi* s.l. için *cacophony* sonuçları

P. perfilewi s.l. bireylerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. perfilewi* s.l. örneklerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. perfilewi</i> s.l.	Bursa	YAG 2.4 YAG 2.6 YAG 2.7 YAG 2.11 YAG 2.12 YAG 3.10	perfilewi_cac_4 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3
	Tekirdağ	YM 1.9 YM 2.4 IZ 1.2 IZ 1.4 IZ 1.375 IZ 1.376 IZ 1.377	perfilewi_cac_4 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3
	Edirne	AL 3.17 BOS 1.10 SARI 3.2 HAM 3.10	perfilewi_cac_4 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3
	Şanlıurfa	PAM 8 PAM 11 PAM 12 PAM 30 HIS 2 HIS 4 HIS 7 HIS 8 HIS 9	perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1 / 7 perfilewi_cac_1 / 2 perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1 / 8 perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1
	İğdır	Pirli 3 Pirli 4	perfilewi_cac_1 perfilewi_cac_1 / 10
	Karabük	YYL 3 YYL 4 YYL 5 YYL 9 BLN 15 BLN 18	perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 / 9 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3 perfilewi_cac_3
	Kars	KOT 1	perfilewi_cac_1

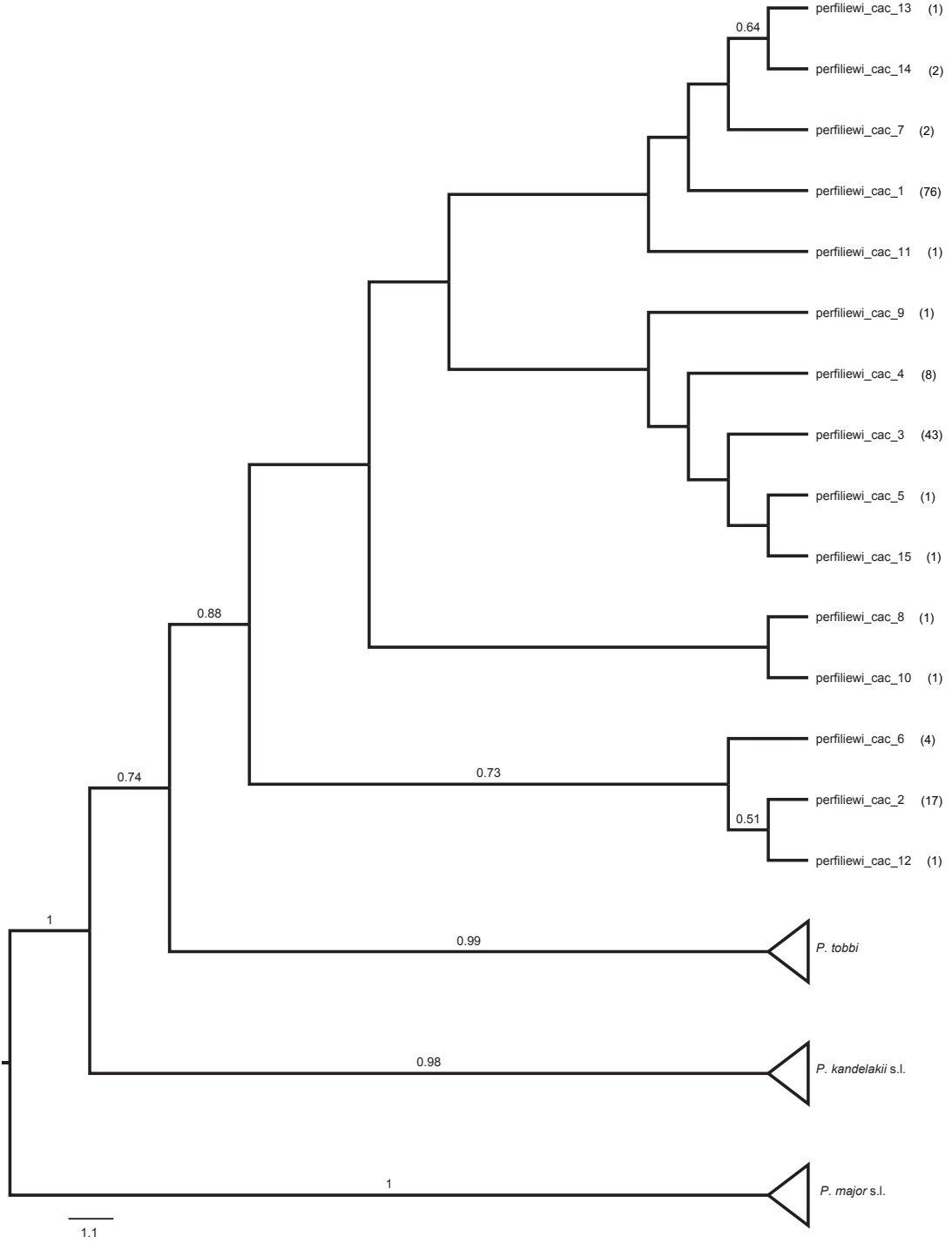
Çizelge 3.10. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. perfliewi</i> s.l.	Çankırı	HCL 1	perfliewi_cac_1
		HCL 2	perfliewi_cac_1 / 2
		HCL 3	perfliewi_cac_1
		HCL 5	perfliewi_cac_1
	Yozgat	KDL 3	perfliewi_cac_1 / 2
		KDL 8	perfliewi_cac_1 / 2
		KDL 9	perfliewi_cac_1
		KDL 12	perfliewi_cac_1 / 2
		KDL 18	perfliewi_cac_1 / 2
		KDL 31	perfliewi_cac_4 / 5
		KDL 32	perfliewi_cac_1 / 4
		KDL 34	perfliewi_cac_1 / 2
	KDL 35	perfliewi_cac_3	
	KDL 36	perfliewi_cac_1	
Sivas	MK 1	perfliewi_cac_1 / 2	
	MK 2	perfliewi_cac_1 / 2	
Malatya	BG 2.15	perfliewi_cac_1	
	BG 2.34	perfliewi_cac_1 / 6	
	BG 2.39	perfliewi_cac_1 / 6	
	BG 1.288	perfliewi_cac_1 / 2	
	BG 1.262	perfliewi_cac_1 / 6	
Adana	DAM 4.29	perfliewi_cac_13 / 14	
	CAM 5.81	perfliewi_cac_14 / 15	
Tokat	BAK 1.3	perfliewi_cac_1 / 6	
	BAK 1.5	perfliewi_cac_1 / 2	
	BAK 1.42	perfliewi_cac_3	
	BAK 1.44	perfliewi_cac_1 / 2	
Ankara	OVA 5.1	perfliewi_cac_1 / 2	
	VET 2.1	perfliewi_cac_1 / 2	
	VET 3.3	perfliewi_cac_1 / 2	
	VET 3.4	perfliewi_cac_1	
	VET 3.4.2	perfliewi_cac_1 / 2	
	VET 3.5	perfliewi_cac_1 / 12	
	VET 3.6	perfliewi_cac_1	
	VET 3.7	perfliewi_cac_1 / 2	
	VET 3.8	perfliewi_cac_1	
VET 3.9	perfliewi_cac_1		
Artvin	BOY 4.1	perfliewi_cac_1	
	BOY 4.2	perfliewi_cac_1	
	BOY 4.3	perfliewi_cac_1 / 7	
	BOY 4.4	perfliewi_cac_1	
	BOY 4.5	perfliewi_cac_1	
	BOY 4.7	perfliewi_cac_1 / 11	
	BOY 4.8	perfliewi_cac_1	
	BOY 4.10	perfliewi_cac_1	

P. perfiliewi s.l. haplotipleri için ML ağacının oluşturulması, K2+G (Kimura 2-parameter + Gamma distributed) nükleotid substitüsyon modeli altında gerçekleştirilmiş, dış grup olarak *Larroussius* alt cinsine ait *P. tobbi*, *P. kandelakii* s.l. ve *P. major* s.l. örnekleri kullanılmıştır.

P. perfiliewi s.l. haplotipleri kullanılarak oluşturulan ML filogenetik ağacı incelendiğinde, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden toplanan tüm haplotiplerin belirgin bir farklılaşma göstermeksizin tek bir ana soy içinde gruplandığı tespit edilmiştir. En yüksek frekansa sahip (76) *perfiliewi_cac_1* haplotipinin coğrafi bölge fark etmeksizin *P. perfiliewi* s.l. bireylerinin Türkiye'de yayılım gösterdiği neredeyse bütün lokalitelerinden örneklediği belirlenmiştir. Benzer şekilde en yüksek frekans gösteren ikinci ve üçüncü haplotipler olan *perfiliewi_cac_3* ve *perfiliewi_cac_2* (sırasıyla haplotip frekansları 43 ve 17) de herhangi bir coğrafi sınır gözlenmeksizin farklı coğrafyalardan örneklenmiştir. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsine ait *P. perfiliewi* s.l. örneklerinin ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.7.'de verilmiştir.

Tüm *P. perfiliewi* s.l. örnekleri kullanılarak hesaplanan en uygun nükleotid substitüsyon modeli, bu veri seti için JC (Jukes-Cantor) olarak bulunmuş, genetik uzaklık hesaplamaları JC modeli altında gerçekleştirilmiştir. *P. perfiliewi* s.l. örnekleri için yapılan tür içi genetik uzaklık hesaplamaları sonucunda bulunan %0.37 değeri, ML ağacında gözlenen durumu destekler nitelikte sonuç vermiştir.



Şekil 3.7. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larrousius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. perfiliewi* s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

- *P. tobbi* için *cacophony* sonuçları

P. tobbi bireylerinin örneklandıkları lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. tobbi* örneklerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

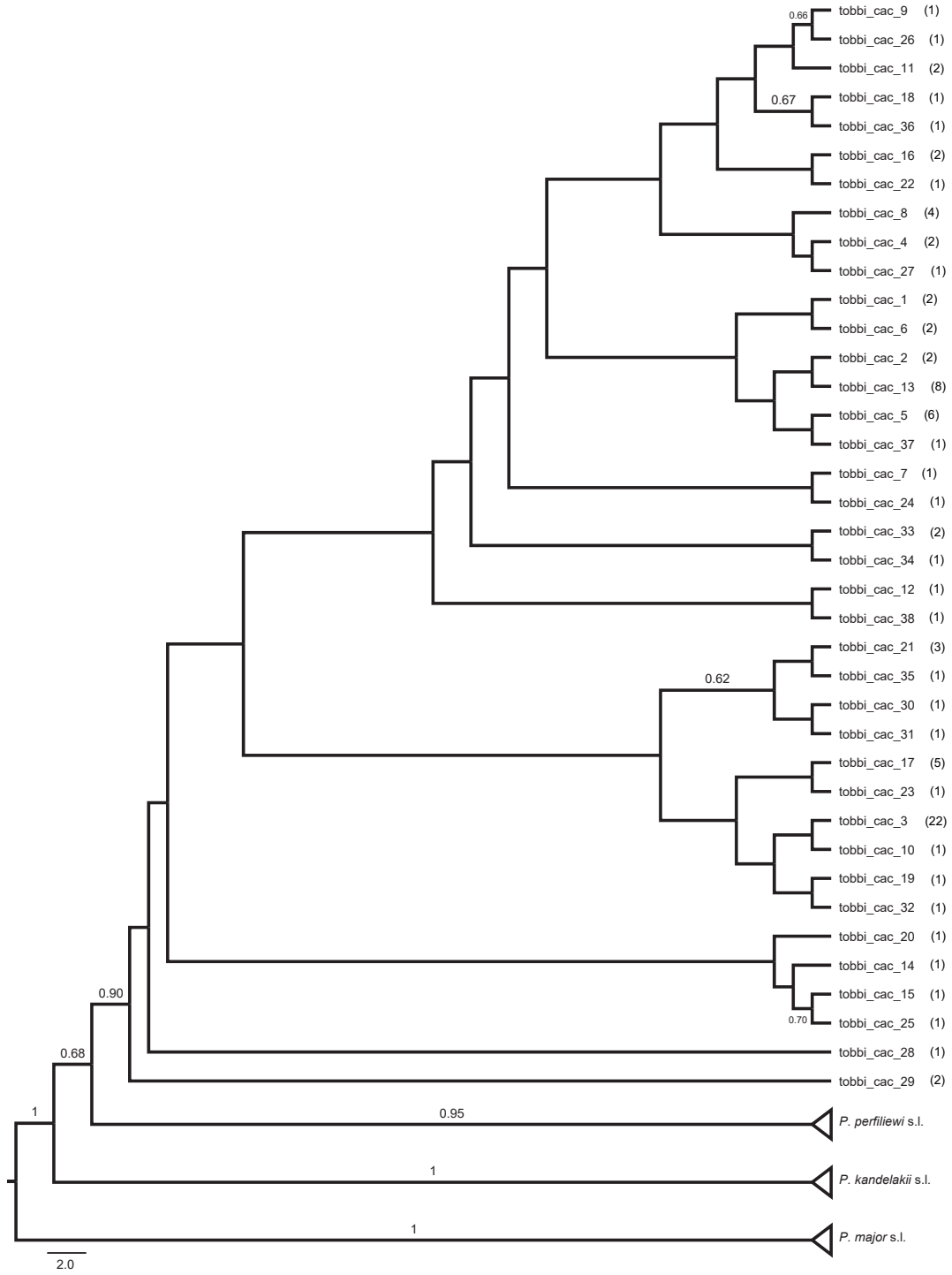
Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. tobbi</i>	Aydın	DEN 1.10	tobbi_cac_3
		DEN 1.19	tobbi_cac_3 / 33
		AKB 5.7	tobbi_cac_8
		AKB 5.8	tobbi_cac_5 / 16
	Bursa	GUN 1.5	tobbi_cac_3 / 32
	Tekirdağ	IZ 1.3	tobbi_cac_3 / 16
	Edirne	HAM 1.2	tobbi_cac_3
	Antalya	BLD 4.14	tobbi_cac_8
		BLD 5.37	tobbi_cac_21 / 38
	Rize	YKOY 1.27	tobbi_cac_6 / 7
		ASL 9	tobbi_cac_20 / 21
		YYOL 3.46	tobbi_cac_17 / 19
	Artvin	TEK 1.4	tobbi_cac_35 / 36
		TEK 1.7	tobbi_cac_33 / 34
		TEK 1.28	tobbi_cac_21 / 37
Sinop	AKC 2.20	tobbi_cac_3	
	AKC 2.25	tobbi_cac_3 / 18	
	AKC 3.23 (Klon 6)	tobbi_cac_1	
	AKC 3.23 (Klon 2)	tobbi_cac_2	
Malatya	KKOY 1.8	tobbi_cac_9 / 10	
	KKOY 1.9	tobbi_cac_5 / 26	
Hatay	SEB 4	tobbi_cac_6 / 12	
	SEB 9	tobbi_cac_22 / 23	
	SEB 16 (Klon 7)	tobbi_cac_3	
	SEB 16 (Klon 2)	tobbi_cac_4	
K. Maraş	CUH 5	tobbi_cac_27 / 28	
	CUH 11	tobbi_cac_11	
Tokat	BAK 1.43	tobbi_cac_13	
	BAK 1.79	tobbi_cac_3	
Erzincan	YUVA 1.3	tobbi_cac_13	
	YUVA 2.19	tobbi_cac_13	
	YUVA 2.116	tobbi_cac_14 / 15	

Çizelge 3.11. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. tobbi</i>	Sivas	MK 3	tobbi_cac_3
	Mardin	DRI 15	tobbi_cac_3
		DRI 21	tobbi_cac_24 / 25
	Yozgat	KDL 2	tobbi_cac_13
		KDL 4	tobbi_cac_17
		KDL 30	tobbi_cac_3
		KDL 39	tobbi_cac_17
	Mersin	SARI 10	tobbi_cac_3 / 5
	İzmir	KRBRN 49	tobbi_cac_30 / 31
		SFR 3	tobbi_cac_5
SFR 37		tobbi_cac_29	
SFR 44		tobbi_cac_3 / 5	

P. tobbi haplotipleri için dış grup olarak *Larroussius* alt cinsine ait *P. perfilliewi* s.l., *P. kandelakii* s.l. ve *P. major* s.l. örnekleri kullanılmış, söz konusu veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmıştır. JC+G (Jukes-Cantor + Gamma distributed) modeli, en uygun model olarak belirlenmiş, *P. tobbi* için ML filogenetik ağacı bu model altında oluşturulmuştur. Tüm *P. tobbi* örnekleri içerisinde rastgele seçilen AKC 3.23 ve SEB 16 örnekleri klonlanmış, DNA dizi analizi sonucu klonlarda elde edilen diziler analizlere dahil edilmiştir.

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan *P. tobbi* için oluşturulan ML filogenetik ağacı, oldukça yüksek (%90) bir bootstrap değeri ile *Larroussius* alt cinsi içerisindeki diğer türlerden belirgin şekilde ayrılmıştır. Klonlanan örneklere ait diziler, popülasyonda yer alan diğer örneklerin DNA dizileri ile uyumlu olarak gruplanmış, herhangi bir coğrafi ayırım olmaksızın *P. tobbi*'nin tüm Türkiye'de tek bir soy olarak bulunduğu görülmüştür. En yüksek haplotip frekansını gösteren (22) tobbi_cac_3 haplotipi, *P. tobbi*'nin Türkiye'de yayılım gösterdiği bilinen tüm yerel popülasyonlarında paylaşılmıştır. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsine ait *P. tobbi* örneklerinin ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.8.'da verilmiştir.



Şekil 3.8. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larrousius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. tobbi* için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Tüm *P. tobbi* bireyleri kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli tekrar hesaplanmış, JC (Jukes-Cantor) modeli en uygun model olarak belirlenmiştir. *P. tobbi* için tür içi genetik uzaklık hesaplaması, bu model altında gerçekleştirilmiş ve %0.68 olarak bulunmuştur.

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan tüm türlere ait sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, bu alt cinse ait türlerin *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri Şekil 3.9'da özetlenmiştir.

	20	40	60	80	100							
kandelakii_cac_2	TGGCCGAACA	TAATGTTAGC	CTGTCTTAAG	GGAAGACCAT	GTGATGAGCG	AGCTGGCAAA	GAACCCACG	AAACATGTGG	GTCATCTCTG	GCTTATGCAT	ACTTCGTGTC	110
kandelakii_cac_7	110
major_cac_1	110
major_cac_33	110
major_cac_28	110
major_cac_19	110
major_cac_27	110
major_cac_38	110
perfiliewi_cac_2	110
perfiliewi_cac_3	110
tobbi_cac_27	110
tobbi_cac_35	110
Korunmuş ve değişken bölgeler												
	120	140	160	180	200							
kandelakii_cac_2	CTTCATCTTT	TTCTGTTTCGT	TCTTGGTAAG	TCGACGCTTT	T---TT--TT	CAT-CTTAAG	AGATTCCAA	ACTTACCGAT	CGCGTTTTCT	TC	196	
kandelakii_cac_7	198	
major_cac_1	191	
major_cac_33	193	
major_cac_28	197	
major_cac_19	197	
major_cac_27	199	
major_cac_38	198	
perfiliewi_cac_2	201	
perfiliewi_cac_3	202	
tobbi_cac_27	201	
tobbi_cac_35	202	
Korunmuş ve değişken bölgeler												

Şekil 3.9. *Larroussius* alt cinsine ait türlerin *cacophony* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri

Bütün *Larrousius* örnekleri *cacophony* geni bakımından birlikte değerlendirildiğinde, tüm örnekler için en uygun nükleotid substitüsyon modeli GTR+G (General Time Reversible + Gamma distributed) olarak bulunmuş ve tür (tür kompleksi) içi ve türler (tür kompleksleri) arası genetik uzaklık hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Türler arası genetik uzaklık değerlerinin %4.23-%10.34, tür içi genetik uzaklık değerlerinin ise %0.19-%1.27 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 3.12.).

Çizelge 3.12. *Larrousius* alt cinsinde yer alan türlerin *cacophony* geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.

	<i>P. kandelakii</i> s.l.	<i>P. major</i> s.l.	<i>P. perfiliewi</i> s.l.	<i>P. tobbi</i>
<i>P. kandelakii</i> s.l.	0.0094	0.0207	0.0172	0.0185
<i>P. major</i> s.l.	0.0874	0.0127	0.0218	0.0237
<i>P. perfiliewi</i> s.l.	0.0619	0.0921	0.0019	0.0133
<i>P. tobbi</i>	0.0687	0.1034	0.0423	0.0072
Köşegen değerler (kırmızı font)	: Tür içi genetik uzaklık değerleri			
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font)	: Türler arası genetik uzaklık değerleri			
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font)	: Türler arası standart sapma değerleri			

3.1.4. *Adlerius* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan tüm türler çalışmaya dahil edilmiş, 12 lokaliteden toplam 115 örneğin *cacophony* geni analiz edilmiştir. Ayrıca morfolojik karakterler kullanılarak tür seviyesine kadar teşhis edilemeyen 18 adet *Adlerius* sp. örneği de çalışmaya dahil edilmiştir. Toplamda yedi adet *Phlebotomus balcanicus*, iki adet *Phlebotomus brevis*, 35 adet *Phlebotomus halepensis*, dört adet *Phlebotomus kyreniae*, 35 adet *Phlebotomus simici* ve 16 adet *Adlerius* sp. örneğinin *cacophony* dizisi elde edilmiştir. Ayrıca *P. brevis* ve *P. halepensis* için birer, *P. simici* ve *Adlerius* sp. için ikişer ve *P. kyreniae* için ise beş bireyde heterozigot insersiyon / delesyonun varlığı tespit edilmiştir. Yeterli sayıda örneğin *cacophony* gen dizisine sorunsuz şekilde ulaşılması nedeniyle, söz konusu alt cins içerisinde yer alan hiçbir örnek klonlama işlemine dahil edilmemiştir. *P. brevis* için Antalya, *P. balcanicus* için Kars ve *P.*

kyreniae için Erzincan lokalitelerinden toplanan tüm bireylerde heterozigot indel gözlenmesi nedeniyle söz konusu türler için belirtilen lokalitelerden temsilci bireyler çalışmaya katılmamıştır. Buna ek olarak *P. simici* için Kahramanmaraş'tan hiçbir örneğin amplifikasyonu başarılı sonuç vermemiş ve bu lokaliteden hiçbir birey çalışmaya dahil edilememiştir. Morfolojik karakterler kullanılarak tür seviyesine kadar teşhis edilemeyen *Adlerius* sp. örnekleri ise, toplandıkları tüm lokalitelerden temsilci bireylerle analizlere alınmıştır.

Elde edilen tüm türlere ait *cacophony* dizileri hizalanıp düzenlenerek analizlere hazır hale getirilmiş ve *Adlerius* alt cinsinde yer alan bütün türlerin haplotipleri belirlenmiştir. *P. balcanicus* ve *P. brevis*'e ait ikişer, *P. halepensis*'e ait sekiz, *P. kyreniae*'e ait beş, *P. simici*'ye ait 28 ve *Adlerius* sp.'ye ait üç adet olmak üzere, *Adlerius* alt cinsi içerisinde toplamda 48 adet haplotipin var olduğu tespit edilmiştir. Tüm türler için haplotip çeşitliliği hesaplanmış ve en yüksek haplotip çeşitliliğini 0.90 değeri ile *P. simici* gösterirken, en düşük haplotip çeşitliliği 0.48 değeri ile *Adlerius* sp. için bulunmuştur. Diğer türlere ait haplotip çeşitliliği değerleri ise *P. balcanicus* için 0.49, *P. brevis* için 0.50, *P. halepensis* için 0.84 ve *P. kyreniae* için 0.86 olarak hesaplanmıştır. *Cacophony* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.13.'te yer almaktadır.

Çizelge 3.13. *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan türlerin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

	<i>P. balcanicus</i>	<i>P. brevis</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>P. kyreniae</i>	<i>P. simici</i>	<i>Adlerius</i> sp.
<i>cacophony</i> dizisi olan örnek sayısı	7	2	35	4	35	16
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	0	1	1	5	2	2
Haplotip sayısı	2	2	8	5	28	3
Haplotip çeşitliliği	0.49	0.50	0.84	0.86	0.90	0.48

Adlerius alt cinsi içerisinde yer alan türlerin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.14.'te; bu alt cinse ait türlerin *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.10.'da özetlenmiştir.

Çizelge 3.14. *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan türlerin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. balcanicus</i>	Bursa	CUM 1.2	balcanicus_cac_1 / 2
		CUM 1.3	balcanicus_cac_2
		CUM 1.4	balcanicus_cac_2
		CUM 1.10	balcanicus_cac_1
		CUM 2.3	balcanicus_cac_2
		HAM 2.1	balcanicus_cac_1
		DAV 1.28	balcanicus_cac_2
<i>P. brevis</i>	İzmir	SFR 48	brevis_cac_2
		SFR 54	brevis_cac_1 / 2
<i>P. halepensis</i>	Samsun	KOS 1.1	halepensis_cac_4
		KOS 1.2	halepensis_cac_4
		KOS 1.3	halepensis_cac_4
	Sivas	KA 2	halepensis_cac_3
		MK 4	halepensis_cac_3
	Rize	YKOY 1.2	halepensis_cac_4
		AK 1.2	halepensis_cac_1 / 5
		ISK 1.2	halepensis_cac_1 / 5
	Artvin	ASL 10	halepensis_cac_4
		CML 1.4	halepensis_cac_1 / 5
		CML 1.7	halepensis_cac_1
	Yozgat	TEK 1.12	halepensis_cac_1 / 5
		KDL 5	halepensis_cac_1 / 2
	Konya	AYK 7	halepensis_cac_2
BAD 2.3		halepensis_cac_1 / 3	
BAD 28		halepensis_cac_3	
BAD 29		halepensis_cac_3	
Erzincan	YUVA 1.36	halepensis_cac_2	
	YUVA 1.37	halepensis_cac_2 / 3	
	YUVA 2.2	halepensis_cac_3 / 6	
	YUVA 2.3	halepensis_cac_2	
	YUVA 2.4	halepensis_cac_2	
	KLM 1.18	halepensis_cac_2 / 6	
Malatya	BG 1.4	halepensis_cac_2	
	BG 1.21	halepensis_cac_2	
	DUM 1.1	halepensis_cac_2	

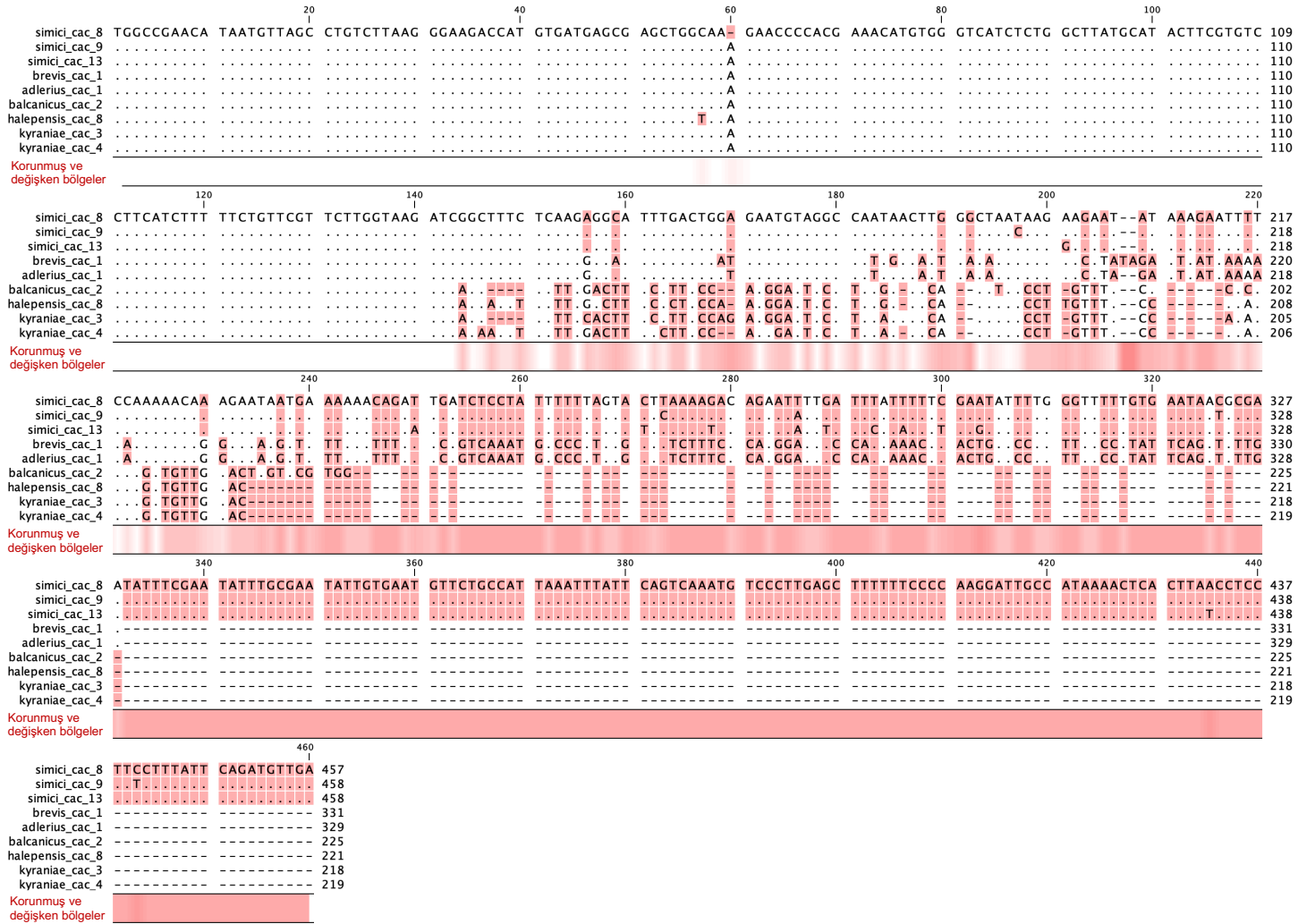
Çizelge 3.14.

devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. halepensis</i>	Kars	KOT 2 KOT 7 TK 18-2.1 TK 20-2.1	halepensis_cac_1 / 5 halepensis_cac_1 / 3 halepensis_cac_3 / 5 halepensis_cac_4
	Mardin	PNR 1 PNR 2 PNR 17 SRG 1 SRG 6	halepensis_cac_6 / 8 halepensis_cac_3 / 7 halepensis_cac_6 / 7 halepensis_cac_6 / 7 halepensis_cac_2 / 6
<i>P. kyreniae</i>	Mardin	DRI 4 DRI 5 DRI 7 DRI 43	kyreniae_cac_4 / 5 kyreniae_cac_2 / 3 kyreniae_cac_1 kyreniae_cac_2
<i>P. simici</i>	Ankara	YES 1.12	simici_cac_2
		YES 1.13	simici_cac_2 / 18
		YES 2.7	simici_cac_18 / 27
		YES 2.9	simici_cac_2 / 18
		YES 3.16	simici_cac_27 / 28
		YES 3.17	simici_cac_2 / 27
		YES 4.24	simici_cac_2
		YES 4.25	simici_cac_1 / 2
YES 5.7		simici_cac_18	
YES 5.9	simici_cac_1 / 2		
Aydın	DEN 2.12	simici_cac_2 / 17	
	DEN 2.44	simici_cac_1	
	DEN 2.50	simici_cac_15 / 16	
	AKB 1.4	simici_cac_15 / 18	
İzmir	SFR 29	simici_cac_2 / 9	
	SFR 59	simici_cac_7 / 8	
Antalya	BLD 2.6	simici_cac_24 / 25	
	BLD 3.110	simici_cac_17	
	BLD 3.117	simici_cac_17 / 20	
	BLD 3.164	simici_cac_18 / 23	
	BLD 4.17	simici_cac_21 / 22	
	BLD 5.39	simici_cac_19 / 20	
	BLD 55	simici_cac_2 / 10	
	BLD 120	simici_cac_18 / 26	
Konya	BAD 6	simici_cac_2 / 6	

Çizelge 3.14. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>P. simici</i>	Erzincan	BAG 1.1	simici_cac_2 / 5
		BAG 1.6	simici_cac_5 / 10
		BAG 1.13	simici_cac_13 / 14
		BAG 1.14	simici_cac_11 / 12
		BAG 1.15	simici_cac_2 / 5
	Malatya	KKOY 1.2	simici_cac_3 / 4
		KKOY 1.18	simici_cac_5
	Yozgat	KDL 63	simici_cac_2
		KDL 75	simici_cac_2
KDL 84		simici_cac_1 / 2	
<i>Adlerius sp.</i>	Erzincan	BAG 1.17	adlerius_cac_1
		KLM 1.29	adlerius_cac_2 / 3
		KLM 1.33	adlerius_cac_1 / 2
		KLM 1.35	adlerius_cac_1 / 2
	Malatya	KKOY 1.13	adlerius_cac_1
		KKOY 1.15	adlerius_cac_1
		KKOY 1.16	adlerius_cac_1
		KKOY 2.19	adlerius_cac_1
		KKOY 2.20	adlerius_cac_1
		KKOY 2.22	adlerius_cac_1 / 2
		KKOY 3.10	adlerius_cac_2 / 3
		KKOY 3.12	adlerius_cac_2
		DUM 1.12	adlerius_cac_1 / 2
		DUM 1.13	adlerius_cac_1
		DUM 1.14	adlerius_cac_1
		DUM 1.16	adlerius_cac_1



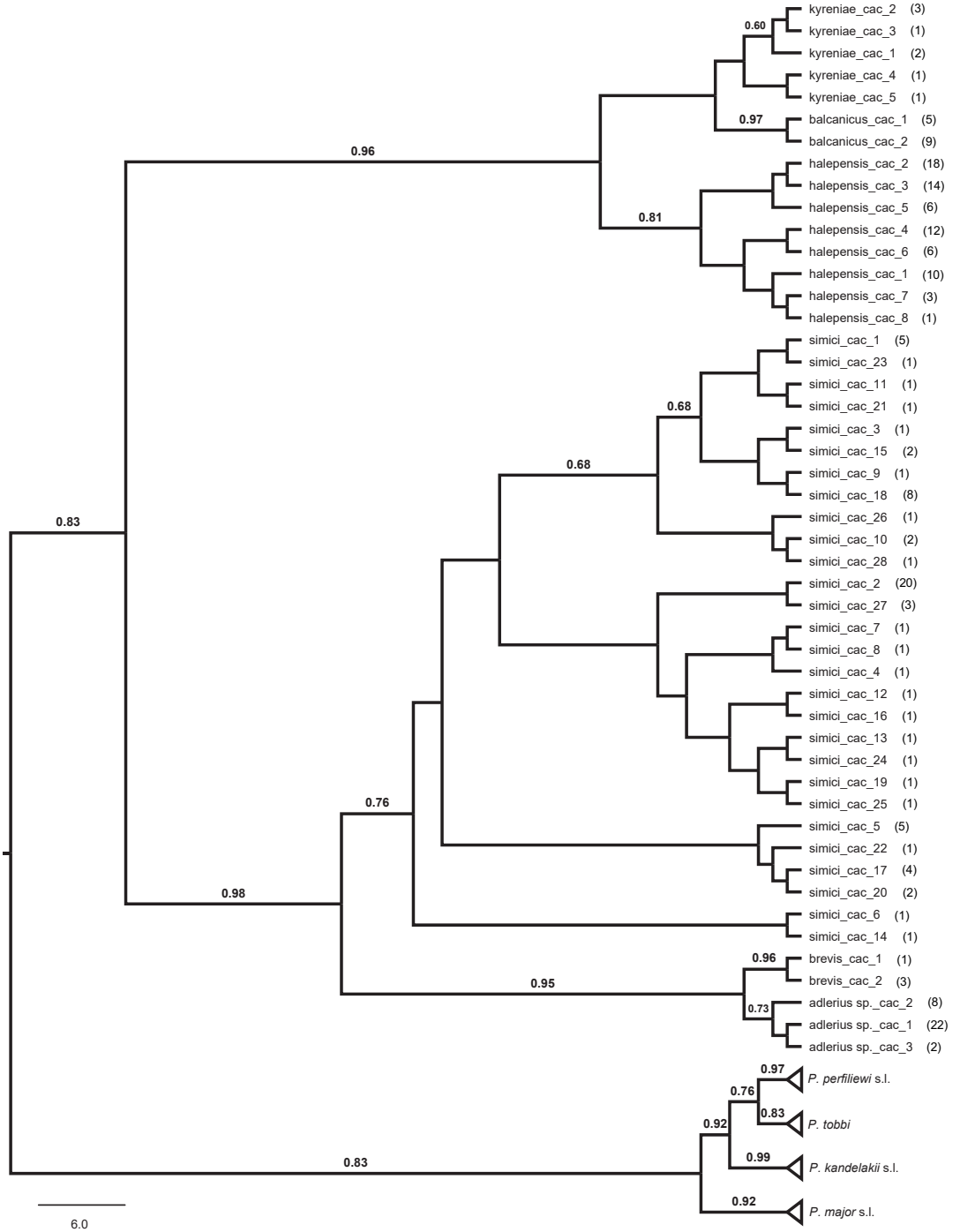
Şekil 3.10. *Adlerius* alt cinsine ait türlerin *cacophony* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

Adlerius alt cinsi içerisinde yer alan tüm haplotipler ile dış grup olarak kullanılan *Larroussius* alt cinsi içerisindeki *P. perfiliewi* s.l., *P. tobbi*, *P. kandelakii* s.l. ve *P. major* s.l. türlerinde oluşan veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli K2+G (Kimura 2-parameter + Gamma distributed) olarak bulunmuş, ML filogenetik ağacı söz konusu model kullanılarak oluşturulmuştur. Elde edilen ağaca göre *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan tüm türler belirgin şekilde birbirlerinden ayrılmıştır (Şekil 3.11.).

Adlerius alt cinsi için *cacophony* genine ait haplotipler kullanılarak elde edilen ML filogenetik ağacına göre temelde iki ana soyun var olduğu tespit edilmiştir. Birinci ana soy hattı *Adlerius* sp., *P. brevis* ve *P. simici* türlerinden oluşmuş ve %98 bootstrap değeri ile desteklenmiştir. *P. halepensis*, *P. balcanicus* ve *P. kyreniae* türlerinin bir arada bulunduğu ve %96 bootstrap değeri ile desteklendiği grup ise ikinci ana soy hattını oluşturmuştur. Birinci ana soy hattı, kendi içerisinde üç alt soya ayrılmıştır. Bunlardan ilkini %73 bootstrap değeri ile ayrılan *Adlerius* sp. haplotipleri, ikincisini ise %96 bootstrap değeri ile ayrılan *P. brevis* haplotipleri oluşturmuştur. Erzincan ve Malatya popülasyonlarından toplanan bireylere ait haplotipler arasında herhangi bir ayrım gözlenmeyen *Adlerius* sp. örnekleri ile bu alt soy ile yakın ilişkili olarak gruplanan ve İzmir'den örneklenen *P. brevis* haplotipleri, üçüncü alt soyu oluşturan *P. simici* örneklerinden %95 bootstrap değeri ile ayrılmıştır. Oldukça geniş bir coğrafi yayılıma sahip olan *P. simici*'nin Türkiye'de tek bir soy hattı ile temsil edildiği, en yüksek haplotip frekansına (20) sahip olan *simici_cac_2* haplotipinin, herhangi bir coğrafi ayrıma bağlı olmaksızın Türkiye'de örneklendiği Malatya hariç bütün lokalitelerde bulunduğu belirlenmiştir. İkinci ana soy hattı içerisinde ise, birinci ana soy hattında olduğu gibi üç adet alt soy oluşmuştur. Birinci alt soyu yüksek bir bootstrap (%81) değeri ile desteklenen *P. halepensis* haplotiplerinin oluşturduğu grup temsil ederken; *P. balcanicus* ve *P. kyreniae* haplotipleri sırasıyla ikinci ve üçüncü alt soyları oluşturmuştur. *P. simici* örneklerinde gözlemlendiği gibi, *P. kyreniae* haplotiplerinin kendi içerisinde %60 bootstrap değeri ile ayrı bir dal oluşturduğu görülmüş (*kyreniae_cac_1*, 2 ve 3 haplotipleri), bu ayrımın yalnızca Mardin'den toplanan örnekler içerisinde belirgin şekilde görülmesi nedeni ile genetik uzaklık hesaplamaları *P. kyreniae* örnekleri için iki grup şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Cacophony haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Adlerius* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.11.'de verilmiştir.

Tüm *Adlerius* bireyleri kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış ve bu veri seti için JC+G (Jukes-Cantor + Gamma distributed) olarak bulunmuştur. Tür içi ve türler arası genetik uzaklık hesaplamaları söz konusu model kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türler arası genetik uzaklığın %1 ve üzeri bir değer gösterdiği, tür içi genetik uzaklığın ise *P. kyreniae* dışındaki (%1) diğer tüm türler için %0.02 ile 0.45 arasında bir değer olduğu belirlenmiştir. ML filogenetik ağacından elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak *P. kyreniae* örnekleri iki farklı gruba ayrılarak genetik uzaklık hesaplamaları tekrarlanmıştır. Birinci grubu *kyreniae_cac_1*, 2 ve 3 haplotiplerinin örnekleri, ikinci grubu ise *kyreniae_cac_4* ve 5 haplotiplerinin tek örneği olan DRI 4 oluşturmuştur. *Adlerius* alt cinsi içerisinde sınıflandırılan taksonlar için *cacophony* geni bakımından elde edilen türler arası genetik uzaklık değerlerinin %0.93-%33.30, söz konusu taksonlara ait tür içi genetik uzaklık değerlerinin ise %0.00-%0.45 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.).



Şekil 3.11. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Adlerius* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Çizelge 3.15. *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan türlerin *cacophony* geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.

	<i>P. balcanicus</i>	<i>P. brevis</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>P. kyreniae</i> 1	<i>P. kyreniae</i> 2	<i>P. simici</i>	<i>Adlerius</i> sp.
<i>P. balcanicus</i>	0.0018	0.0555	0.0120	0.0105	0.0152	0.0535	0.0555
<i>P. brevis</i>	0.3006	0.0000	0.0544	0.0556	0.0509	0.0194	0.0062
<i>P. halepensis</i>	0.0333	0.2977	0.0045	0.0090	0.0132	0.0558	0.0550
<i>P. kyreniae</i> 1	0.0252	0.3032	0.0222	0.0031	0.0114	0.0547	0.0554
<i>P. kyreniae</i> 2	0.0441	0.2797	0.0379	0.0260	-	0.0531	0.0508
<i>P. simici</i>	0.3002	0.0729	0.3186	0.3105	0.3015	0.0025	0.0170
<i>Adlerius</i> sp.	0.2990	0.0093	0.2977	0.3016	0.2780	0.0572	0.0000

Köşegen değerler (kırmızı font) : Tür içi genetik uzaklık değerleri
 Köşegenin altında kalan değerler (siyah font) : Türler arası genetik uzaklık değerleri
 Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font) : Türler arası standart sapma değerleri

3.1.5. *Transphlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Transphlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan ve Türkiye’de yayılım gösterdiği kaydedilen *P. mascittii* hariç bütün türlerin *cacophony* gen bölgeleri elde edilerek çalışmaya dahil edilmiş, iki farklı lokaliteden toplam 15 birey analiz edilmiştir. *Phlebotomus anatolicus* türüne ait tek birey dışında, analize alınan hiçbir örnekte heterozigot insersiyon / delesyon gözlenmemiş, *cacophony* genine ait diziler başarılı şekilde elde edilmiştir. *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus anatolicus* için üç, *Phlebotomus economidesi* için bir ve *Phlebotomus killicki* için ise dokuz adet örneğin DNA dizisine ulaşılmış, her tür için elde edilen *cacophony* genine ait DNA dizileri hizalanıp düzenlenerek türlerin örneklendikleri tüm lokalitelerden temsilci birey / bireyler analizlere hazır hale getirilmiştir.

Her tür için haplotipler belirlenmiş; *P. anatolicus* için dört, *P. economidesi* ve *P. killicki* için ise birer olmak üzere, *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde toplamda altı adet haplotipin var olduğu tespit edilmiştir. Her bir türe ait haplotip çeşitliliği hesaplanmıştır ve birer haplotipe sahip *P. economidesi* ve *P. killicki* için 0.00 bulunan haplotip çeşitliliği, *P. anatolicus* için 0.80 olarak bulunmuştur. *Cacophony*

genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.16.'da yer almaktadır.

Çizelge 3.16. *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan türlerin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

	<i>P. anatolicus</i>	<i>P. economidesi</i>	<i>P. killicki</i>
<i>cacophony</i> dizisi olan örnek sayısı	3	1	9
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	1	0	0
Haplotip sayısı	4	1	1
Haplotip çeşitliliği	0.80	0.00	0.00

Transphlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan türlerin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.17.'de, bu alt cinse ait türlerin *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.12.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.17. *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan türlerin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

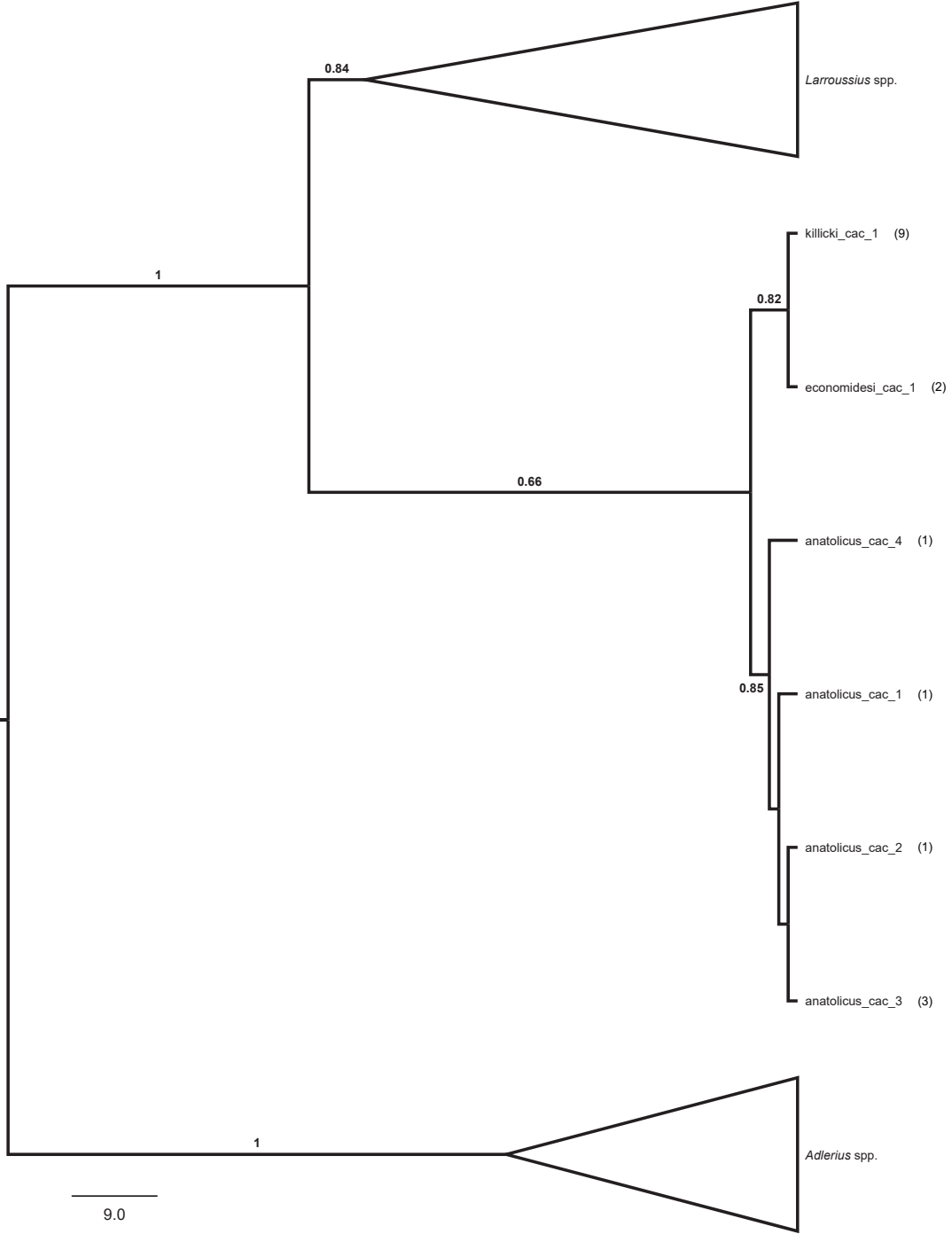
Tür	Lokalite	Örnek No	<i>cac</i> Haplotip
<i>P. anatolicus</i>	Antalya	BLD 4.6	anatolicus_cac_3 / 4
		BLD 4.31	anatolicus_cac_3
		BLD 5.56	anatolicus_cac_1 / 2
<i>P. economidesi</i>	Antalya	BLD 5.49	economidesi_cac_1
<i>P. killicki</i>	Antalya	BLD	killicki_cac_1
		BLD 3.73	killicki_cac_1
		BLD 3.133	killicki_cac_1
		BLD 5.53	killicki_cac_1
		BLD 28	killicki_cac_1
		BLD 61	killicki_cac_1
		BLD 63	killicki_cac_1
	DIK 3	killicki_cac_1	
Mersin	KOP 17	killicki_cac_1	

		20		40		60		80		100		
killicki_cac_1	TGGCCGAACA	TAATGTTAGC	CTGTCTTAAG	GGAAGACCAT	GTGATGAGCG	AGCTGGTAAA	GAACCCACG	AAACATGTGG	GTCATCTCTG	GCTTATGCAT	ACTTCGTGTC	110
economidesi_cac_1	C.....	110
anatolicus_cac_1	C.....	110
anatolicus_cac_2	C.....	110
anatolicus_cac_3	C.....	110
<hr/>												
Korunmuş ve												
değişken bölgeler												
	120		140		160		180		200			
killicki_cac_1	CTTCATCTTT	TTCTGTTTCGT	TCTTGGTGAG	ATCCACTTTC	CTT--TCCC	AGAGATTGTC	TCACA---C	TGATCCTGTT	TTCTTTCTCC	AGATGTTGA		202
economidesi_cac_1	A.....	GG.A..	---..	A.A.....	A..GTCA.	..	A...T.		205
anatolicus_cac_1	A.....	GG...T	CCCC..	TA.....	A.A.CTCA.	AAG...A	..T-----		203
anatolicus_cac_2	A.....	GG...T	GCCC..	TA.....	A.A.CTCA.	A.G.....	..T-----		203
anatolicus_cac_3	A.....	GG...T	---CCC..	TA.....	A.A.CTCA.	A.G.....	..T-----		202
<hr/>												
Korunmuş ve												
değişken bölgeler												

Şekil 3.12. *Transphlebotomus* alt cinsine ait türlerin *cacophony* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

En uygun nükleotid substitüsyon modeli, tüm haplotipler ile *Larroussius* ve *Adlerius* alt cinslerine ait dış grup örnekleri kullanılarak hesaplanmıştır. Söz konusu veri seti için en uygun model T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distributed) olarak belirlenerek ML filogenetik ağacı bu model doğrultusunda oluşturulmuştur. Elde edilen ağaca göre Türkiye’de var olduğu bilinen ve analizlere dahil edilen *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan tüm türler belirgin şekilde birbirinden ayrılmıştır.

Transphlebotomus içerisindeki türler ile birlikte iki farklı dış grup kullanılarak oluşturulan ML filogenetik ağacına göre analize alınan türler *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan türler ile birlikte ayrı bir dal oluşturmuş, bu doğrultuda *cacophony* geni kullanılarak elde edilen ağaçta *Larroussius* ve *Transphlebotomus* alt cinslerinin daha yakın ilişki ile birlikte gruplanarak *Adlerius* alt cinsinden ayrıldığı tespit edilmiştir. %66 bootstrap değeri ile ayrılan *Transphlebotomus* soyu, temelde iki ayrı alt soya ayrılmış ve söz konusu alt soylar yüksek bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. %85 ile desteklenen ve tüm haplotiplerin bir arada tek bir grubu oluşturduğu *P. anatolicus*, %82 değeri ile desteklenen ve ayrı bir grup oluşturan *P. killicki* ve *P. economidesi* türlerinden belirgin şekilde ayrılmıştır. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Transphlebotomus* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.13.’te verilmiştir.



Şekil 3.13. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Transphlebotomus* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Transphlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan tüm bireyler için en uygun nükleotid substitüsyon modeli dikkate alınarak tür içi ve türler arası genetik uzaklık hesaplamaları yapılmıştır. ML filogenetik ağacı, bu veri seti için en uygun model olarak belirlenen T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distributed) modeli altında gerçekleştirilmiştir. Tür içi genetik uzaklık tüm türler için %0 olarak belirlenirken; türler arası genetik uzaklığın %5.22-%7.55 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çizelge 3.18. *Transphlebotomus* alt cinsi için elde edilen türler arası ve tür içi genetik uzaklık değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.18. *Transphlebotomus* alt cinsinde yer alan türlerin *cacophony* geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.

	<i>P. killicki</i>	<i>P. economidesi</i>	<i>P. anaticus</i>
<i>P. killicki</i>	0.0000	0.0166	0.0203
<i>P. economidesi</i>	0.0515	0.0000	0.0166
<i>P. anaticus</i>	0.0755	0.0522	0.0000
Köşegen değerler	: Tür içi genetik uzaklık değerleri		
Köşegenin altında kalan değerler	: Türler arası genetik uzaklık değerleri		
Köşegenin üstünde kalan değerler	: Türler arası standart sapma değerleri		

3.1.6. *Sergentomyia* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Sergentomyia alt cinsi içerisinde bulunan *Sergentomyia antennata* ve *Sergentomyia theodori* dışında Türkiye’de var olduğu bilinen türlerin *cacophony* gen dizileri çalışmaya dahil edilmiştir. Toplamda yedi lokaliteden 67 kum sineği örneğinin DNA dizi analizi yapılmış, çalışmaya dahil edilen *Sergentomyia dentata* türü içerisinde hiçbir bireyde heterozigot insersiyon / delesyon gözlenmemiş; bunun aksine *Sergentomyia minuta* türünün neredeyse bütün bireylerinde söz konusu durumun varlığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda *S. dentata*’ya ait 29, *S. minuta*’ya ait ise yalnızca dokuz örneğin *cacophony* gen dizisine ulaşılmıştır. *S. minuta* içerisinde heterozigot indel gözlenen toplam 23 adet örnek için manuel olarak bir insersiyon / delesyon örüntüsü çıkarılmış, bu doğrultuda tür içerisinde

üç farklı örüntünün olduğu tespit edilmiştir. İlk aşamada örüntülere ait birer birey ve örüntüden bağımsız rastgele iki birey klonlama çalışmaları için seçilmiştir. Elde edilen klonların DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiş, tek birey için beklenen aksine iki adet DNA dizisinden fazla dizi elde edilmiştir. Analize dahil edilecek dizilerin seçimi, söz konusu gen dizisinin popülasyonda temsil edilip edilmeme durumuna göre gerçekleştirilmiştir. Bu durumda bazı örnekler için tek allel (DIK 2, DIK 11), bazı örnekler için ise iki allel (BLD 4.34) analizlere alınmış, her türlü hesaplama bu klonların da dahil edildiği veri seti üzerinden gerçekleştirilmiştir. Gen bölgesine ait popülasyonda temsil edilmeyen diğer diziler haplotip analizine katılmış; fakat haplotip çeşitliliği hesaplamaları dahil sonraki analizlerden hiçbirine alınmamıştır. Türkiye’de *S. dentata*’nın örneklediği tüm popülasyonlara ait temsilci örneğin *cacophony* gen dizisine ulaşılmışken, *S. minuta*’nın İzmir’den analize katılan hiçbir örneği bulunmamaktadır. *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan türler için yapılan haplotip analizleri sonucunda, *S. dentata* için altı, *S. minuta* için ise 13 adet haplotipin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca her iki tür için haplotip çeşitliliği hesaplanmış, *S. dentata* ve *S. minuta* için sırasıyla 0.64 ve 0.72 olarak bulunmuştur. *Cacophony* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.19.’de yer almaktadır.

Çizelge 3.19. *Sergentomyia* türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

	<i>S. dentata</i>	<i>S. minuta</i>
<i>cacophony</i> dizisi olan örnek sayısı	29	6
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	0	23
Klonlanan örnek sayısı	0	5
Haplotip sayısı	6	13
Haplotip çeşitliliği	0.64*	0.72*

* Haplotip çeşitliliği, analizlere dahil edilmeyen klonlar çıkarılarak hesaplanmıştır.

Sergentomyia türlerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.20.'de, bu alt cinse ait türlerin *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.14'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.20. *Sergentomyia* türlerinin *cacophony* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
S. dentata	Tekirdağ	IZ 2.149	dentata_cac_1
		IZ 2.157	dentata_cac_2 / 3
		IZ 2.168	dentata_cac_2 / 3
		IZ 2.173	dentata_cac_1 / 2
		IZ 3.5	dentata_cac_1
	Edirne	TURP 4.3	dentata_cac_1
		AL 1.2	dentata_cac_1 / 2
		TURK 1.14	dentata_cac_1
		BOS 2.11	dentata_cac_1
		HAM 1.5	dentata_cac_1 / 3
	Antalya	BLD 4.21	dentata_cac_1
		BLD 4.40	dentata_cac_1
		BLD 5.51	dentata_cac_1
		BLD 5.52	dentata_cac_1
		BLD 5.57	dentata_cac_1 / 3
	İzmir	KRBRN 65	dentata_cac_1 / 2
		SFR 52	dentata_cac_1
		SFR 68	dentata_cac_1 / 2
	Mersin	KDIS 39	dentata_cac_1 / 4
		KDIS 2.42	dentata_cac_1
		KDIS 2.49	dentata_cac_1 / 2
KDIS 2.64		dentata_cac_1	
Adana	DAM 4.312	dentata_cac_4	
	DAM 4.375	dentata_cac_2	
	ZER 2.210	dentata_cac_2 / 4	
	ZER 2.211	dentata_cac_2 / 4	
	ZER 2.212	dentata_cac_2 / 4	
	ZER 2.167	dentata_cac_2 / 4	
	ZER 2.195	dentata_cac_5 / 6	

Çizelge 3.20.

devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	cac Haplotip
<i>S. minuta</i>	Antalya	BLD 4.34 (Klon 3)	minuta_cac_3
		BLD 4.34 (Klon 7)	minuta_cac_4
		BLD 4.34 (Klon 5)	minuta_cac_6
		BLD 4.34 (Klon 4)	minuta_cac_7
		BLD 5.59	minuta_cac_3 / 11
		DIK 2 (Klon 1)	minuta_cac_3
		DIK 11 (Klon 5)	minuta_cac_4
		DIK 11 (Klon 3)	minuta_cac_5
	DIK 23	minuta_cac_4	
	Aydın	AKB 2.76 (Klon 6)	minuta_cac_8
		AKB 2.76 (Klon 5)	minuta_cac_9
		AKB 2.76 (Klon 1)	minuta_cac_10
AKB 5.9		minuta_cac_13	
Mersin	KDIS 40 (Klon 4)	minuta_cac_1	
	KDIS 40 (Klon 1)	minuta_cac_2	
	KDIS 44	minuta_cac_4 / 12	
	KDIS 46	minuta_cac_3 / 11	
	KDIS 63	minuta_cac_4	

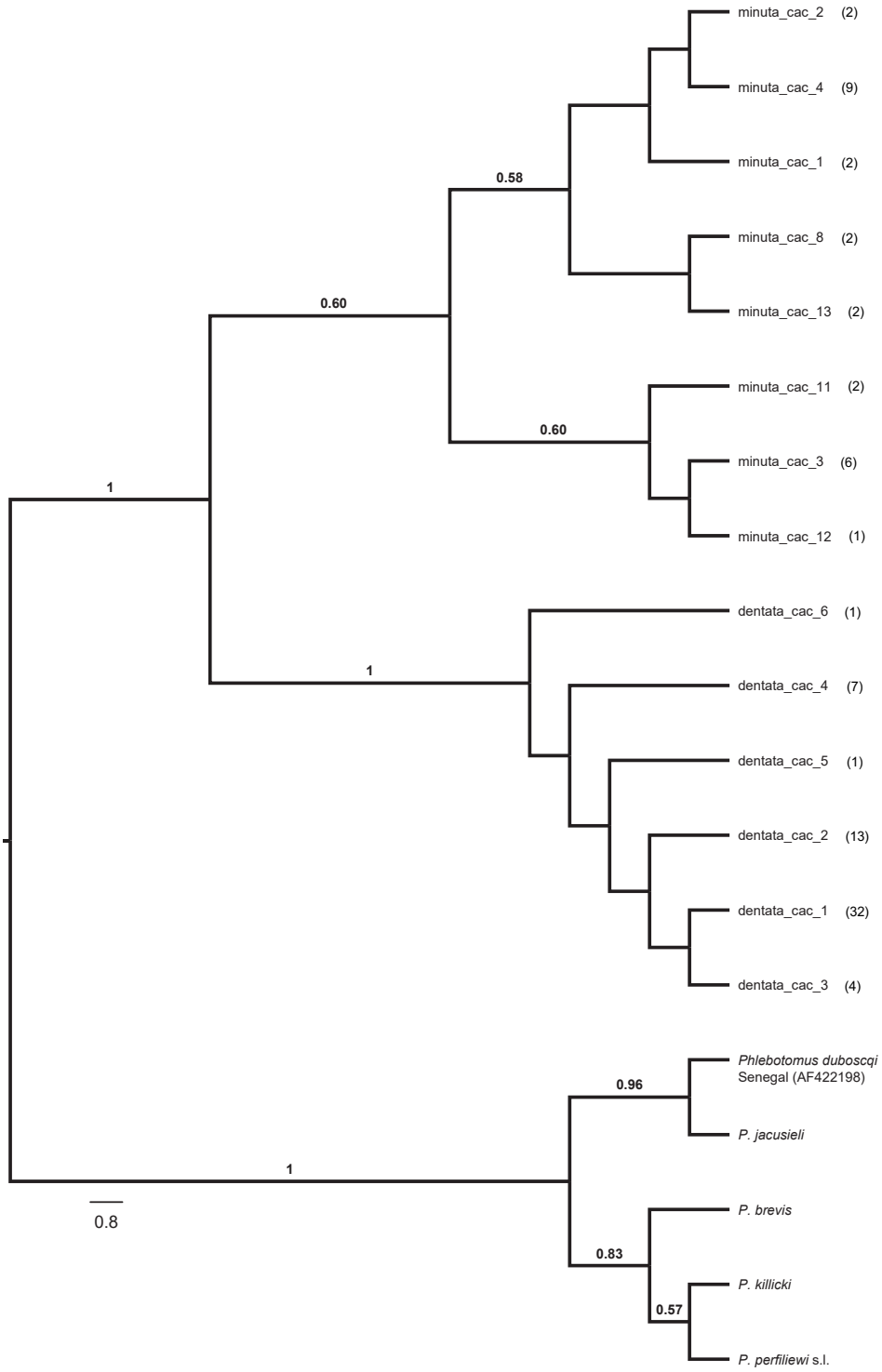
* Populasyonda temsil edilmemesi nedeniyle hiçbir analize dahil edilmeyen klon haplotiplerini göstermektedir.

		20		40		60		80		100	
dentata_cac_1	TGGCCGAACA	TAATGTTAGC	CTGTCTTAAA	GGAAGGCCAT	GTGATGAGCA	TGCCGGTAAA	GAACCCACG	AGACATGTGG	GTCATCTTTG	GCTTATGCAT	ACTTCGTGTC 110
dentata_cac_2	110
minuta_cac_3	110
minuta_cac_4	110
minuta_cac_13	110
Korunmuş ve değişken bölgeler											
		120		140		160		180		200	
dentata_cac_1	TTTCATATTT	TCTGTTTCGT	TCTTGGTAAG	ACTATAAAAA	TCTTAAATCA	TTTTAAATT	TATTCTAATC	CAATTGACT	CTATTACAGA	TGTTGA	206
dentata_cac_2	206
minuta_cac_3	197
minuta_cac_4	202
minuta_cac_13	203
Korunmuş ve değişken bölgeler											

Şekil 3.14. *Sergentomyia* alt cinsine ait türlerin *cacophony* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

Sergentomyia alt cinsine ait örneklerin *cacophony* haplotiplerinden oluşan veri seti için dış grup olarak, GenBank'tan alınan *Phlebotomus* alt cinsine ait *P. duboscqi* (Erişim numarası: AF422198), *Paraphlebotomus* alt cinsine ait *P. jacusieli*, *Adlerius* alt cinsine ait *P. brevis*, *Transphlebotomus* alt cinsine ait *P. killicki* ve *Larroussius* alt cinsine ait *P. perfilliewi* s.l. örnekleri kullanılmıştır. Söz konusu veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distributed) en uygun model olarak bulunmuştur. ML filogenetik ağacı bu model altında oluşturulmuştur. *Cacophony* geninden elde edilen haplotipler kullanılarak oluşturulan ML filogenetik ağacında *S. dentata* ve *S. minuta* haplotipleri, yüksek bootstrap değerleri altında belirgin şekilde birbirlerinden ayrılmıştır. Türkiye'den örneklendiği tüm lokalitelerden gelen bireyler tek grup halinde bir soyu oluşturmuş, böylelikle *S. dentata* bireyleri *S. minuta* bireylerinden %100 bootstrap değeri ile ayrılmıştır. %60 bootstrap değeri ile desteklenen diğer soy hattı, *S. minuta* örneklerinin oluşturduğu bir soy olmakla beraber, kendi içerisinde görece yüksek bootstrap değeri ile desteklenmiş iki alt soya ayrılmıştır. Birinci alt soyu *minuta_cac_12*, 3 ve 11 haplotipleri, ikinci alt soyu ise *minuta_cac_13*, 8, 1, 4 ve 2 haplotipleri oluşturmuştur. Ancak elde edilen ağaç dikkate alındığında bu ayrımın *S. minuta* örneklerinin toplandığı lokalitelere bağlı olmaksızın ortaya çıktığı görülmüştür. *Cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Sergentomyia* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.15.'te verilmiştir.

Sergentomyia alt cinsi içerisindeki türlere ait bireylerin tamamı kullanılarak tür içi ve türler arası genetik uzaklık hesaplamaları yapılmıştır. Söz konusu veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, belirlenen T92 (Tamura 3-parameter) modeli dikkate alınarak genetik uzaklık hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. *S. dentata* ve *S. minuta* arasındaki genetik uzaklık değeri %18 olarak hesaplanmıştır. Farklı lokalitelerden örneklenen *S. dentata* için tür içi genetik uzaklığın %0.45; ML filogenetik ağacında iki ayrı alt soy şeklinde temsil edilmesine rağmen *S. minuta* için tür içi genetik uzaklığın ise %0.28 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.15. *cacophony* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Sergentomyia* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

3.2. *period* Geni için Elde Edilen Bulgular

Morfolojik ve moleküler teşhisi gerçekleştirilen farklı alt cinslere ait 884 adet kum sineği örneğinin *period* genine ait yaklaşık 500 bç'lik bölgesi için amplifikasyon çalışmaları yapılmış, *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde dört, *Larroussius* alt cinsinden iki, *Adlerius* alt cinsinden iki ve *Sergentomyia* alt cinsinden bir adet tür olmak üzere toplamda dokuz türün *period* gen dizisine ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar alt cinslere göre aşağıda verilmiştir:

3.2.1. *Phlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye'de var olduğu bilinen ve *Phlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan tek tür olan *Phlebotomus papatasi*, 14 farklı lokaliteden toplamda 69 birey ile çalışmaya dahil edilmiş, neredeyse bütün örneklerin *period* geninin amplifikasyonu başarılı şekilde gerçekleşmiş olmasına rağmen DNA dizi analizleri sonucunda oldukça fazla sayıda bireyde heterozigot insersiyon / delesyon görülmesi nedeniyle söz konusu türü temsil edecek sayıda bireyin DNA dizisine ulaşılamamıştır. Ayrıca *P. papatasi*'nin yayılım gösterdiği yerel popülasyonları arasında gen akışının devam ettiğini ve popülasyonlar arasında herhangi bir üreme izolasyonunun henüz bulunmadığını gösteren çalışmalar [44] dikkate alındığında, bu türe ait hiçbir birey için klonlama işlemi gerçekleştirilmemiş, sonraki analizlere dahil edilmemiştir.

3.2.2. *Paraphlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

P. similis dışında Türkiye'de yayılım gösterdiği bilinen tüm *Paraphlebotomus* türleri çalışmaya dahil edilmiş, toplamda 17 lokaliteden 105 bireyin *period* genine ait DNA dizisi analiz edilmiştir. DNA dizi analizleri sonucunda *Phlebotomus sergenti* s.l.'ye ait bir örnek dışında hiçbir örnekte heterozigot insersiyon / delesyon görülmezsizin tüm türlerin *period* gen dizisine ulaşılmıştır. Ayrıca *P. sergenti* s.l.'nin Antalya'dan toplanan iki örneği için başarılı amplifikasyon gerçekleştirilemezken; diğer bütün türlerin örnekledikleri lokalitelerden yeterli sayıda temsilci bireye ait gen dizisi elde edilmiştir. Bu doğrultuda *Phlebotomus alexandri* için 29, *Phlebotomus caucasicus* için iki, *Phlebotomus jacusieli* için yedi ve *Phlebotomus sergenti* s.l. için 55 adet örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Buna

ek olarak morfolojik karakterler kullanılarak hiçbir kategoriye dahil edilemeyen dört adet *Paraphlebotomus* sp.örneği de diğer türler ile birlikte analizlere alınmıştır.

Her türe ait örneğin *period* geni kullanılarak haplotipleri belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda *P. alexandri*'ye ait 18, *P. caucasicus*'a ait üç, *P. jacusieli*'ye ait dört, *P. sergenti* s.l.'ye ait 38 ve *Paraphlebotomus* sp.'ye ait dört adet haplotipin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca her bir tür için haplotip çeşitliliği hesaplanmış, en yüksek haplotip çeşitliliğini 0.96 değeri ile *P. sergenti* s.l. gösterirken, en düşük haplotip çeşitliliğinin 0.69 değeri ile *P. jacusieli*'de bulunduğu görülmüştür. Diğer türler için haplotip çeşitliliği ise *P. alexandri* için 0.79, *P. caucasicus* için 0.83 ve *Paraphlebotomus* sp. için 0.75 olarak hesaplanmıştır. *Period* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.21.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.21. *Paraphlebotomus* türlerinin *period* geni için analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

	<i>P. alexandri</i>	<i>P. caucasicus</i>	<i>P. jacusieli</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>Paraphlebotomus</i> sp.
<i>period</i> dizisi olan örnek sayısı	29	2	7	55	4
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	0	0	0	1	0
Haplotip sayısı	18	3	4	38	4
Haplotip çeşitliliği	0.79	0.83	0.69	0.96	0.75

Paraphlebotomus türlerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.22.'te; bu alt cinse ait türlerin *period* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.16.'da özetlenmiştir.

Çizelge 3.22. *Paraphlebotomus* türlerinin *period* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. alexandri</i>	Mardin	DRI 11	alexandri_per_1 / 7
	Mersin	PAL 2.48	alexandri_per_3 / 6
		YLIM 2.46	alexandri_per_1 / 2
		BATI 7	alexandri_per_1 / 2
		KDIS 2.36	alexandri_per_1 / 5
		KDIS 2.58	alexandri_per_1 / 4
		KDIS 2.59	alexandri_per_2 / 3
	CAK 37	alexandri_per_1 / 2	
	Artvin	TEK 2.48	alexandri_per_11 / 13
	Aydın	AKB 109	alexandri_per_1 / 2
AKB 2.43		alexandri_per_1 / 11	
AKB 2.44		alexandri_per_1 / 12	
AKB 2.50		alexandri_per_1 / 2	
AKB 2.59		alexandri_per_1 / 2	
AKB 2.66	alexandri_per_1 / 2		
İzmir	KRBRN 28	alexandri_per_10 / 11	
	KRBRN 29	alexandri_per_1 / 2	
	SFR 32	alexandri_per_2 / 9	
	SFR 69	alexandri_per_1 / 2	
Erzincan	BAG 1.10	alexandri_per_1 / 2	
Antalya	BLD 3.36	alexandri_per_1 / 17	
	BLD 3.39	alexandri_per_1 / 2	
	BLD 3.67	alexandri_per_1 / 2	
	BLD 3.89	alexandri_per_1 / 16	
	BLD 3.104	alexandri_per_1 / 18	
	BLD 3.127	alexandri_per_1 / 2	
	BLD 4.16	alexandri_per_14 / 15	
	BLD 66	alexandri_per_1 / 17	
Malatya	BG 2.208	alexandri_per_4 / 8	
<i>P. caucasicus</i>	Kars	Kötek 15	caucasicus_per_2 / 3
		TK 21-4.2	caucasicus_per_1 / 2

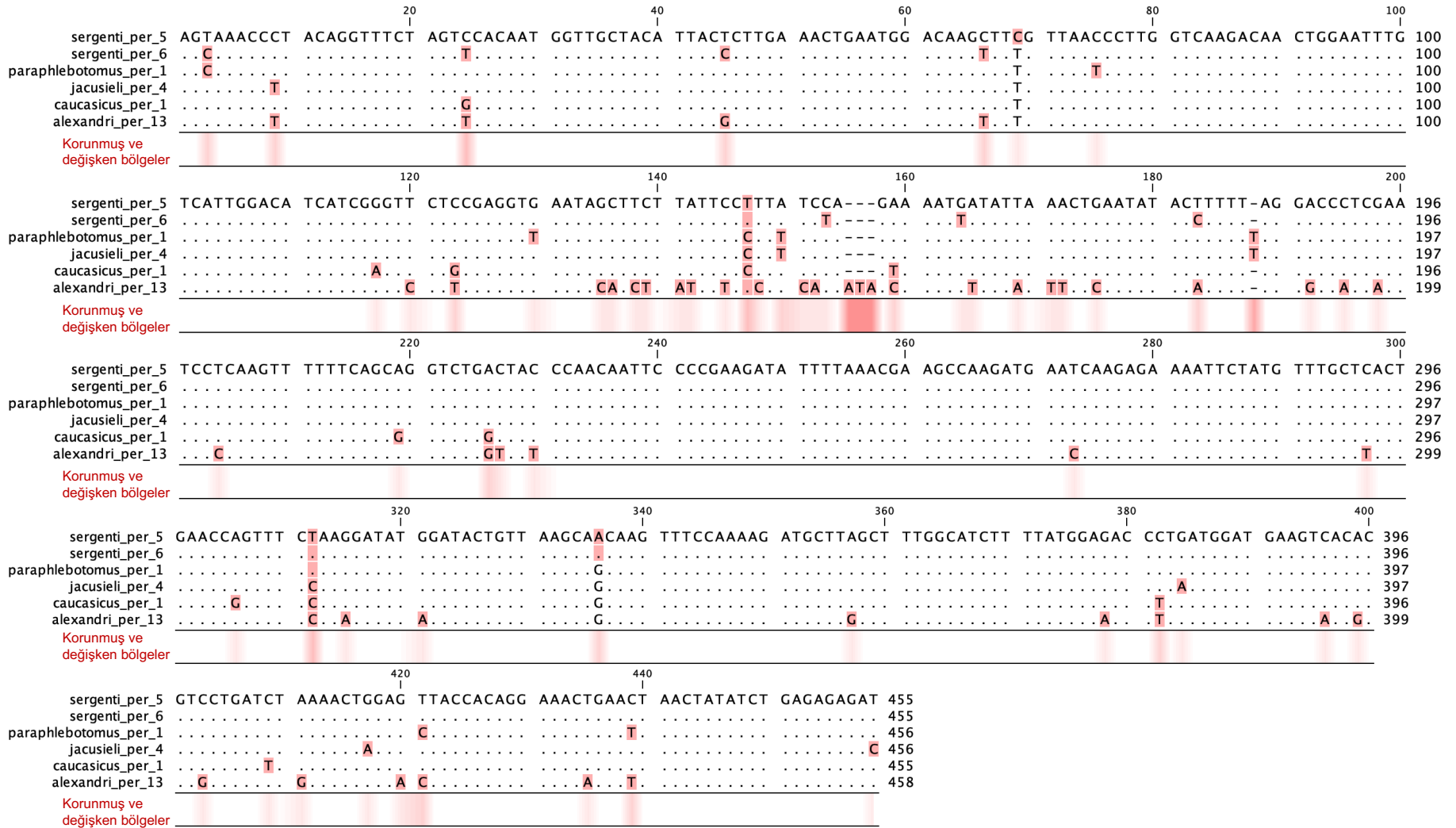
Çizelge 3.22. devam ediyor

Tür	Lokalite	Örnek No	per Haplotip
<i>P. jacusieli</i>	Karabük	GS 2	jacusieli_per_1
		GS 3	jacusieli_per_1
	Erzincan	YUVA 2.76	jacusieli_per_2
		YUVA 2.77	jacusieli_per_2 / 3
YUVA 2.81		jacusieli_per_2	
YUVA 2.83		jacusieli_per_2	
Antalya	IS 2	jacusieli_per_4	
<i>P. sergenti</i>	Mardin	BKVK 1	sergenti_per_4 / 16
		BKVK 5	sergenti_per_4 / 13
		BKVK 6	sergenti_per_14 / 15
		PNR 14	sergenti_per_13
		PNR 15	sergenti_per_4
		DRI 23	sergenti_per_9 / 14
		SRG 3	sergenti_per_6 / 12
	İğdır	Pirli 5	sergenti_per_29 / 30
		Pirli 9	sergenti_per_27 / 28
		Pirli 10	sergenti_per_9 / 31
	Konya	AYK 17	sergenti_per_24
		ES 1	sergenti_per_8 / 17
ES 2		sergenti_per_8 / 23	
Mersin	PAL 1.13	sergenti_per_3 / 8	
	PAL 1.21	sergenti_per_1 / 7	
	PAL 2.56	sergenti_per_5 / 6	
	KEL2	sergenti_per_2 / 8	
	KEL 3	sergenti_per_1 / 9	
	YLIM 8	sergenti_per_1 / 2	
	CAK 10	sergenti_per_3	
	SARI 63	sergenti_per_3 / 4	
	KOP 18	sergenti_per_3 / 6	
	HS 1	sergenti_per_8 / 11	
HS 2	sergenti_per_8 / 10		
Adana	ZER 2.628	sergenti_per_1 / 4	
	ZER 2.688	sergenti_per_1 / 9	
	ZER 2.751	sergenti_per_4 / 6	
	ZER 3.369	sergenti_per_37 / 38	
Hatay	AS 3	sergenti_per_21 / 32	
Maraş	CS 1	sergenti_per_26	
	CS 2.2	sergenti_per_13 / 25	
Rize	YKOY 1.26	sergenti_per_1	
Erzincan	GAZİ 1.4	sergenti_per_21	
	GAZİ 1.5	sergenti_per_9 / 11	
	BAG 1.11	sergenti_per_21 / 33	
	BAG 1.12	sergenti_per_7 / 11	

Çizelge 3.22.

devam ediyor.

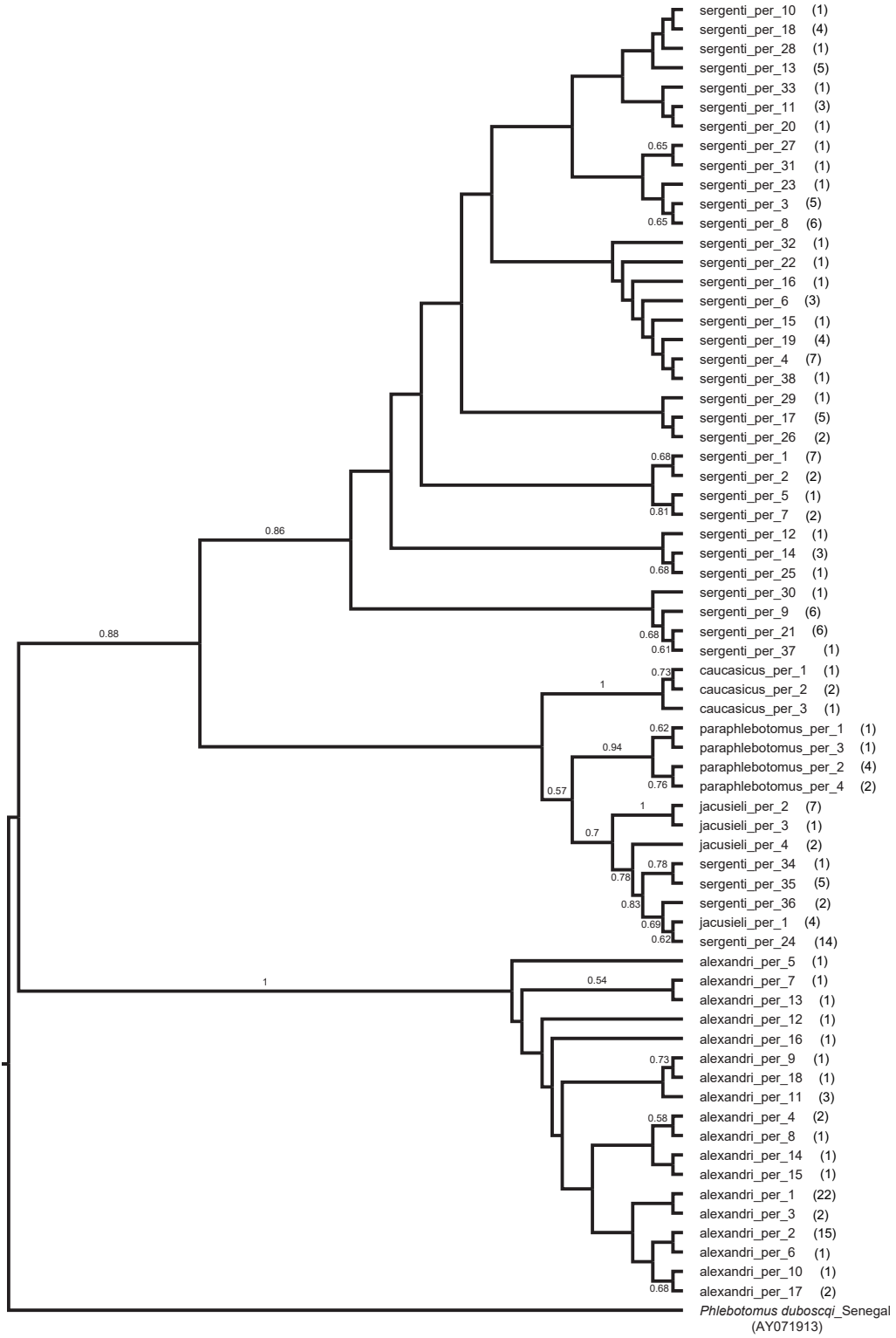
Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. sergenti</i> s.l.	Malatya	DUM 1.11	sergenti_per_19
		DUM 2.16	sergenti_per_9 / 18
		DUM 2.17	sergenti_per_17 / 22
		DUM 2.18	sergenti_per_19 / 21
		DUM 2.19	sergenti_per_13 / 20
		DUM 2.20	sergenti_per_14 / 19
		DUM 2.21	sergenti_per_17 / 18
		DUM 2.22	sergenti_per_17 / 18
		DUM 2.23	sergenti_per_17 / 18
	Bursa	CUM 1.9	sergenti_per_35 / 36
		GEL 1.2	sergenti_per_35
		GEL 2.2	sergenti_per_24
		GEL 2.3	sergenti_per_24 / 35
		DAV 1.1	sergenti_per_24
		DAV 1.10	sergenti_per_24
		DY 3.15	sergenti_per_24
		DY 3.16	sergenti_per_24 / 35
		DY 3.18	sergenti_per_24 / 36
		YAG 3.2	sergenti_per_24 / 34
<i>Paraphlebotomus</i> sp.	Artvin	TEK 1.34	paraphlebotomus_per_2 / 4
		TEK 4.4	paraphlebotomus_per_2 / 4
		TEK 4.5	paraphlebotomus_per_2 / 3
		TEK 4.9	paraphlebotomus_per_1 / 2



Şekil 3.16. *Paraphlebotomus* alt cinsine ait türlerin *period* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

Paraphlebotomus alt cinsine ait örneklerin *period* haplotiplerinden oluşan veri seti için dış grup olarak, *Phlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus duboscqi* (GenBank erişim numarası: AY071913) kullanılmış, en uygun nükleotid substitüsyon modeli T92+G (Tamura 3-parameter) olarak bulunmuştur. ML filogenetik ağacı bu model dikkate alınarak oluşturulmuştur. *Period* geni kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaca göre, analizlere dahil edilen *Paraphlebotomus* türleri birbirlerinden belirgin şekilde ayrılmıştır.

Elde edilen ML filogenetik ağacına göre *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde temelde iki ana soyun varlığı gözlenmiştir. Türkiye'nin birçok farklı bölgesinden toplanan *P. alexandri* haplotiplerinin hepsi birlikte gruplanarak birinci soya oluşturmuştur. Söz konusu alt cins içerisindeki diğer türler olan *P. sergenti* s.l., *P. caucasicus*, *Paraphlebotomus* sp. ve *P. jacusieli* haplotipleri ise ikinci ana soyda birlikte gruplanmıştır. Birinci alt soyda, Bursa'dan toplanan örnekler hariç, diğer bütün lokalitelerden toplanan *P. sergenti* s.l.'ye ait haplotiplerin yer aldığı belirlenmiştir. İkinci alt soyda ise, *P. caucasicus* haplotipleri %100 bootstrap değeri ile diğer türlerden ayrılmış; Artvin'den toplanan ve morfolojik karakterler bakımından hiçbir kategoriye dahil edilemeyen *Paraphlebotomus* sp. haplotipleri diğer türlerden ayrı bir grup oluşturmuştur. *Paraphlebotomus* sp. haplotiplerine kardeş bir grup olarak ise *P. jacusieli* ve Bursa'dan örneklenen *P. sergenti* s.l. haplotipleri belirlenmiş; Erzincan haplotipleri olan *jacusieli_2* ve *3*'ün %100 bootstrap değeri ile ayrılarak farklı bir grup oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu gruba kardeş grup olarak, *P. jacusieli*'nin Karabük ve Antalya haplotipleri (*jacusieli_1* ve *4*) ile Bursa'dan örneklenen tüm *P. sergenti* s.l. haplotiplerinin yer aldığı tespit edilmiştir. *Period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Paraphlebotomus* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.17.'de verilmiştir.



2.0

Şekil 3.17. *period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Paraphlebotomus* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

Paraphlebotomus alt cinsi içerisindeki tüm bireyler kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distributed) modeli, tür içi ve türler arası genetik uzaklık karşılaştırmaları için en uygun model olarak belirlenmiştir. Genetik uzaklık hesaplamaları bu model altında hesaplanmış, *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan türler için tür içi genetik uzaklığın *P. jacusieli* ve *P. sergenti* s.l. dışında %0.00 ile %0.03 arasında değiştiği görülmüştür. Türler arası genetik uzaklıklar ise %2 ve üzerinde değerler göstermiştir. *P. jacusieli* ve *P. sergenti* s.l.'nin her ikisi için de gözlenen tür içi genetik uzaklık değerinin %1 olması nedeni ile söz konusu iki tür için ML filogenetik ağacının da desteklediği şekilde bir gruplandırma yapılarak, genetik uzaklık hesaplamaları tekrarlanmıştır. Bu doğrultuda, *P. alexandri*, *P. caucasicus* ve *Paraphlebotomus* sp. örnekleri herhangi bir grup ayrımı yapılmaksızın analize dahil edilirken; Bursa dışındaki tüm lokalitelerden toplanan *P. sergenti* s.l. örnekleri "*P. sergenti* s.l.". olarak, Erzincan *P. jacusieli* örnekleri "*P. jacusieli*" olarak, Antalya ve Karabük'ten toplanan *P. jacusieli* ve Bursa'dan toplanan *P. sergenti* s.l. örnekleri ise tek grup altında "*P.jacusieli-P. sergenti* s.l." olarak analize alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her bir tür ve tür grubu için tür içi genetik uzaklık değerinin %0.00 ile %0,29 arasında olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 3.23. *Paraphlebotomus* alt cinsi için elde edilen türler arası ve tür içi genetik uzaklık değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.23. *Paraphlebotomus* alt cinsinde yer alan türlerin *period* geni bakımından tür içi ve türler arası genetik uzaklık değerleri.

	<i>P. alexandri</i>	<i>P. sergenti</i> s.l.	<i>P. caucasicus</i>	<i>Paraphlebotomus</i> sp.	<i>P. jacusieli</i>	<i>P. jacusieli- P. sergenti</i> s.l.
<i>P. alexandri</i>	0.0003	0.0193	0.0203	0.0198	0.0200	0.0201
<i>P. sergenti</i> s.l.	0.1194	0.0029	0.0086	0.0066	0.0074	0.0068
<i>P. caucasicus</i>	0.1257	0.0319	0.0000	0.0091	0.0104	0.0085
<i>Paraphlebotomus</i> sp.	0.1222	0.0228	0.0324	0.0000	0.0076	0.0063
<i>P. jacusieli</i>	0.1277	0.0297	0.0398	0.0253	0.0000	0.0067
<i>P. jacusieli- P. sergenti</i> s.l.	0.1248	0.0250	0.0302	0.0194	0.0218	0.0017
Köşegen değerler (kırmızı font)			: Tür içi genetik uzaklık değerleri			
Köşegenin altında kalan değerler (siyah font)			: Türler arası genetik uzaklık değerleri			
Köşegenin üstünde kalan değerler (koyu siyah font)			: Türler arası standart sapma değerleri			

3.2.3. *Larroussius* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen tüm *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan türler çalışmaya dahil edilmiş, 30 lokaliteden 491 adet kum sineği örneğinin *period* genine ait yaklaşık 500 bç analiz edilmiştir. Tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen, *Phlebotomus kandelakii* s.l. ve *Phlebotomus major* s.l. bireylerinin *period* gen dizisi amplifiye edilememiş, analizler yalnızca gen dizisine ulaşılan *Phlebotomus perfiliewi* s.l. ve *Phlebotomus tobbi* bireyleri için gerçekleştirilmiştir. Toplamda *P. perfiliewi* s.l.’ye ait 98, *P. tobbi*’ye ait ise 100 adet bireyin *period* gen dizisine ulaşılmıştır. Ayrıca DNA dizi analizi sonucunda *P. perfiliewi* s.l. için 17, *P. tobbi* için ise iki örnekte heterozigot insersiyon / delesyonun var olduğu tespit edilmiştir ve bu bireyler sonraki analizlere dahil edilmemiştir.

Her bir türe ait bireylerin tamamı için haplotip analizleri gerçekleştirilmiş, *P. perfiliewi* s.l. için haplotip sayısı 48, haplotip çeşitliliği 0.93; *P. tobbi* için ise haplotip sayısı 65, haplotip çeşitliliği 0.94 olarak hesaplanmıştır. *Larroussius* alt cinsi için toplamda 113 adet haplotipin var olduğu ve bu iki tür arasındaki haplotip

çeşitliliğinin neredeyse aynı değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. *Larroussius* alt cinsi için *period* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.24.'da yer almaktadır.

Çizelge 3.24. *Larroussius* türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

	<i>P. perfiliewi</i> s.l.	<i>P. tobbi</i>
<i>period</i> dizisi olan örnek sayısı	98	100
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	17	2
Klonlanan örnek sayısı	0	0
Haplotip sayısı	48	65
Haplotip çeşitliliği	0.93	0.94

Birey sayısının fazla olması nedeniyle *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan türlere ait analizler her bir tür için ayrı gerçekleştirilmiştir.

- *P. perfiliewi* s.l. için *period* sonuçları

P. perfiliewi s.l. bireylerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.25.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.25.

Larrousius alt cinsinde yer alan *P.perfiliewi* s.l. örneklerinin *period* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. perfiliewi</i> s.l.	Bursa	YAG 2.4	perfiliewi_per_9
		YAG 2.6	perfiliewi_per_6 / 9
		YAG 2.7	perfiliewi_per_9 / 38
		YAG 2.11	perfiliewi_per_6 / 9
		YAG 2.12	perfiliewi_per_6 / 9
		YAG 3.4	perfiliewi_per_6 / 9
		YAG 3.5	perfiliewi_per_6
		YAG 3.6	perfiliewi_per_36 / 37
		YAG 3.10	perfiliewi_per_6 / 19
		YAG 3.11	perfiliewi_per_6 / 9
	Tekirdağ	YM 1.5	perfiliewi_per_22 / 23
		YM 1.9	perfiliewi_per_6 / 22
		YM 1.10	perfiliewi_per_9 / 22
		YM 2.4	perfiliewi_per_9 / 22
		IZ 1.4	perfiliewi_per_9 / 22
		IZ 1.5	perfiliewi_per_22 / 24
		IZ 1.375	perfiliewi_per_6 / 26
		IZ 1.376	perfiliewi_per_22
		IZ 1.377	perfiliewi_per_9 / 25
	Edirne	AL 3.8	perfiliewi_per_6 / 22
		AL 3.17	perfiliewi_per_22 / 34
		COP 4.5	perfiliewi_per_6 / 22
		GAZI 3.4	perfiliewi_per_9 / 22
		BOS 1.3	perfiliewi_per_6 / 22
		BOS 1.10	perfiliewi_per_9 / 22
		SARI 3.2	perfiliewi_per_9 / 22
		HAM 3.10	perfiliewi_per_22
		HAM 3.14	perfiliewi_per_9 / 26
	Antalya	BLD 5.29	perfiliewi_per_9 / 44
		BLD 5.65	perfiliewi_per_42 / 43
		BLD 5.66	perfiliewi_per_41

Çizelge 3.25.

devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. perfilewi</i> s.l.	Şanlıurfa	PAM 8	perfilewi_per_4 / 11
		PAM 11	perfilewi_per_15 / 16
		PAM 12	perfilewi_per_7 / 14
		PAM 30	perfilewi_per_12 / 13
		HIS 2	perfilewi_per_4 / 7
		HIS 4	perfilewi_per_18 / 19
		HIS 7	perfilewi_per_4 / 7
		HIS 8	perfilewi_per_18 / 19
		HIS 9	perfilewi_per_12 / 17
	İğdır	Pirli 3	perfilewi_per_4 / 7
	Karabük	YYL 3	perfilewi_per_6 / 9
		YYL 4	perfilewi_per_6 / 19
		YYL 5	perfilewi_per_6
		YYL 6	perfilewi_per_6 / 25
		YYL 8	perfilewi_per_9
		YYL 9	perfilewi_per_6
		YYL 10	perfilewi_per_6 / 9
		BLN 15	perfilewi_per_6 / 9
	BLN 18	perfilewi_per_6 / 9	
Kars	KOT 1	perfilewi_per_7	
	KOT 6	perfilewi_per_4 / 13	
Çankırı	HCL 1	perfilewi_per_7 / 35	
	HCL 5	perfilewi_per_7	
Yozgat	KDL 8	perfilewi_per_3 / 4	
	KDL 9	perfilewi_per_1 / 2	
	KDL 12	perfilewi_per_6 / 10	
	KDL 31	perfilewi_per_6 / 9	
	KDL 32	perfilewi_per_6 / 8	
	KDL 34	perfilewi_per_4 / 7	
	KDL 35	perfilewi_per_6	
KDL 36	perfilewi_per_4 / 5		
Erzincan	KLM 2.7	perfilewi_per_32 / 33	
Sivas	MK 2	perfilewi_per_10 / 21	
Malatya	BG 2.15	perfilewi_per_17 / 30	
	BG 2.33	perfilewi_per_28 / 29	
	BG 2.39	perfilewi_per_17 / 27	
	BG 1.288	perfilewi_per_4 / 31	
	BG 1.262	perfilewi_per_4 / 27	

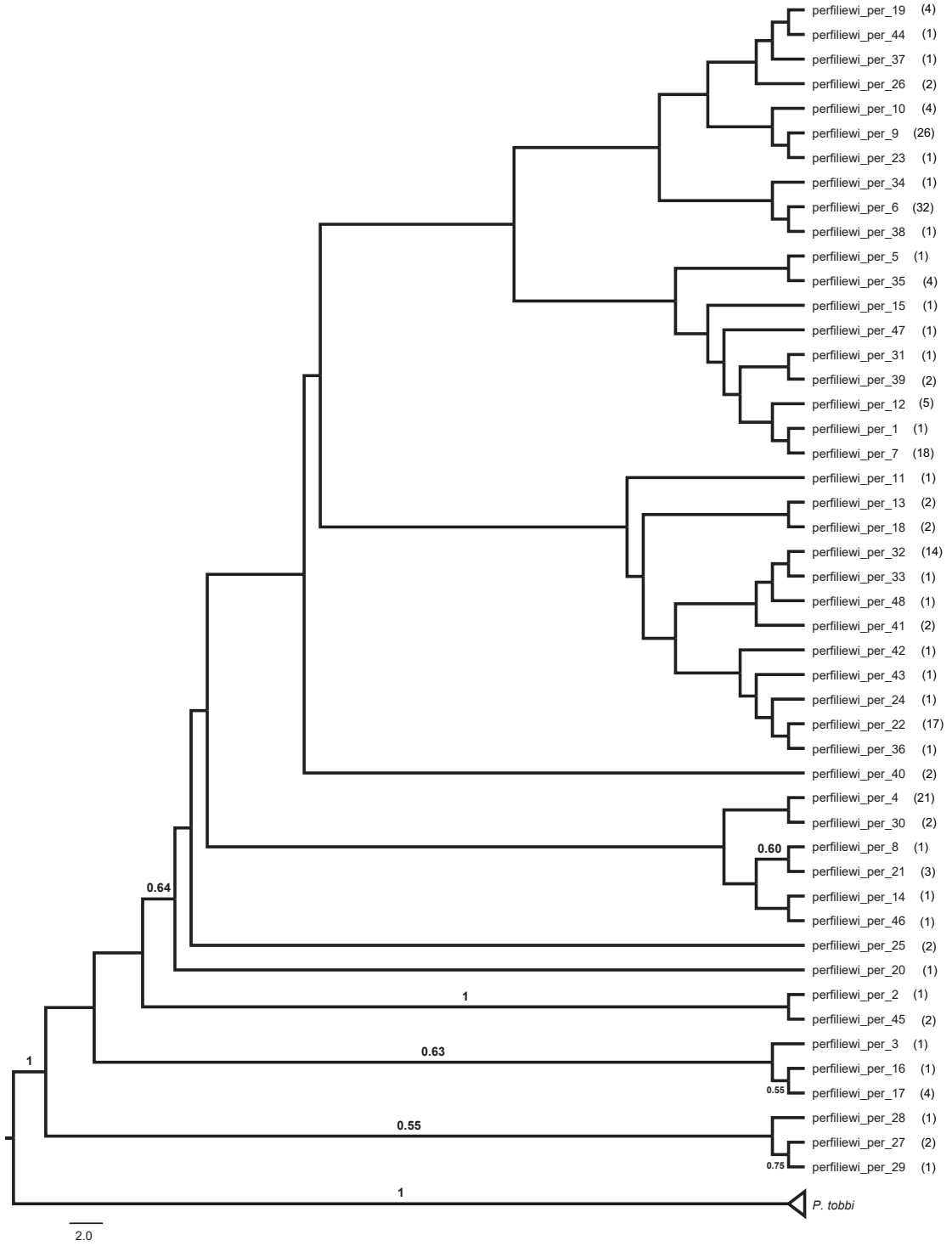
Çizelge 3.25. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. perfiliewi</i> s.l.	Adana	DAM 4.29	perfiliewi_per_32
		DAM 4.27	perfiliewi_per_32
		CAM 2.63	perfiliewi_per_32
		CAM 2.68	perfiliewi_per_32 / 48
		CAM 2.59	perfiliewi_per_32
		CAM 5.80	perfiliewi_per_32
	Tokat	BAK 1.4	perfiliewi_per_4 / 7
		BAK 1.5	perfiliewi_per_7 / 20
		BAK 1.42	perfiliewi_per_6 / 9
		BAK 1.44	perfiliewi_per_21
	Ankara	YES 1.8	perfiliewi_per_6
		YES 3.4	perfiliewi_per_32
		VET 2.1	perfiliewi_per_7 / 17
		VET 3.3	perfiliewi_per_45 / 47
		VET 3.4	perfiliewi_per_4 / 12
		VET 3.6	perfiliewi_per_7 / 10
		VET 3.7	perfiliewi_per_10 / 46
		VET 3.8	perfiliewi_per_7 / 45
		VET 3.9	perfiliewi_per_4 / 12
	Artvin	BOY 4.1	perfiliewi_per_7 / 39
		BOY 4.2	perfiliewi_per_4
		BOY 4.3	perfiliewi_per_4 / 35
		BOY 4.4	perfiliewi_per_4
		BOY 4.5	perfiliewi_per_35
		BOY 4.6	perfiliewi_per_7 / 40
		BOY 4.7	perfiliewi_per_4 / 12
		BOY 4.8	perfiliewi_per_4
		BOY 4.9	perfiliewi_per_30 / 39
		BOY 4.10	perfiliewi_per_7 / 40

P. perfiliewi s.l. örneklerinin ML filogenetik ağacını oluşturmak üzere, haplotipler üzerinden hesaplanan en uygun nükleotid substitüsyon modeli K2+I (Kimura 2-parameter + Invariable) olarak bulunmuştur. Dış grup olarak *Larrousius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. tobbi* kullanılmıştır ve Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden toplanan *P. perfiliewi* s.l. örneklerinin tek grup halinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Period haplotipleri kullanılarak oluşturulan *P. perfiliewi* s.l. ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.18.'de verilmiştir.

Tüm bireyler kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, en uygun model JC (Jukes-Cantor) olarak belirlenmiş ve *P. perfiliewi* s.l. için tür içi genetik uzaklık hesaplamaları bu model altında gerçekleştirilmiştir. Hesaplama sonucunda elde edilen %0.38 değeri, ML filogenetik ağacında da görüldüğü şekilde, analize alınan bireyler arasında belirgin bir grup bulunmadığını desteklemiştir.



Şekil 3.18. *period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larrousius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. perfiliewi* s.l. için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

- *P. tobbi* için *period* sonuçları

P. tobbi bireylerinin örneklandıkları lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.26.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.26. *Larrousius* alt cinsinde yer alan *P. tobbi* örneklerinin *period* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. tobbi</i>	Ankara	IM 3.3 IM 1.64	tobbi_per_14 / 33 tobbi_per_6 / 7
	Aydın	DEN 1.10 DEN 1.11 DEN 1.12 AKB 2.57 AKB 5.7 AKB 5.8	tobbi_per_7 / 60 tobbi_per_45 / 59 tobbi_per_5 tobbi_per_13 / 62 tobbi_per_59 / 61 tobbi_per_12 / 24
	Bursa	GUN 1.5 GUN 1.6	tobbi_per_29 / 58 tobbi_per_7 / 57
	Tekirdağ	YM 1.6 YM 1.11 IZ 1.3 IZ 1.360 IZ 1.382	tobbi_per_6 / 7 tobbi_per_6 / 10 tobbi_per_5 / 7 tobbi_per_12 / 13 tobbi_per_7 / 11
	Edirne	COP 1.2 BAS 1.2 TURP 4.2 HAM 1.2	tobbi_per_6 / 12 tobbi_per_13 / 56 tobbi_per_1 / 47 tobbi_per_3 / 7
	Antalya	BLD 2.2 BLD 3.18 BLD 4.20 BLD 5.37 BLD 5.38 BLD 5.42 BLD 5.45	tobbi_per_45 / 65 tobbi_per_13 / 47 tobbi_per_1 / 27 tobbi_per_23 / 64 tobbi_per_45 / 63 tobbi_per_7 / 12 tobbi_per_24 / 27
	Rize	YKOY 1.27 ASL 9 YYOL 3.46 YYOL 4.19	tobbi_per_17 tobbi_per_7 / 18 tobbi_per_14 / 16 tobbi_per_14 / 15

Çizelge 3.26. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. tobbi</i>	Artvin	TEK 1.4	tobbi_per_1 / 7
		TEK 1.7	tobbi_per_7 / 32
		TEK 1.8	tobbi_per_1 / 32
		TEK 1.23	tobbi_per_1 / 7
	Samsun	KOS 3.3	tobbi_per_7
	Sinop	AKC 2.25	tobbi_per_6
		AKC 3.24	tobbi_per_7
	Malatya	KKOY 1.8	tobbi_per_7 / 21
		KKOY 1.9	tobbi_per_14 / 19
		DUM 1.6	tobbi_per_7
	Hatay	SEB 4	tobbi_per_32 / 52
		SEB 7	tobbi_per_33 / 51
		SEB 8	tobbi_per_37 / 50
		SEB 9	tobbi_per_48 / 49
K. Maras	CUH 3	tobbi_per_33 / 41	
	CUH 4	tobbi_per_30 / 40	
	CUH 5	tobbi_per_38 / 39	
Iğdır	Iğdır 1	tobbi_per_46 / 47	
Tokat	GK 7	tobbi_per_1 / 2	
	BAK 1.23	tobbi_per_6 / 7	
	BAK 1.31	tobbi_per_1 / 7	
	BAK 1.43	tobbi_per_1	
	BAK 1.79	tobbi_per_2 / 7	
	BAK 1.80	tobbi_per_2 / 7	
Erzincan	YUVA 1.3	tobbi_per_7 / 34	
	YUVA 1.24	tobbi_per_14 / 19	
	YUVA 2.19	tobbi_per_1 / 53	
	YUVA 2.116	tobbi_per_7	
	GAZİ 2.2	tobbi_per_14 / 53	
	BAG 1.24	tobbi_per_53 / 54	
	KLM 1.49	tobbi_per_24 / 55	
	KLM 1.50	tobbi_per_14 / 53	
	KLM 2.3	tobbi_per_14 / 54	
	KLM 2.4	tobbi_per_7 / 14	
Sivas	MK 3	tobbi_per_1 / 7	

Çizelge 3.26.

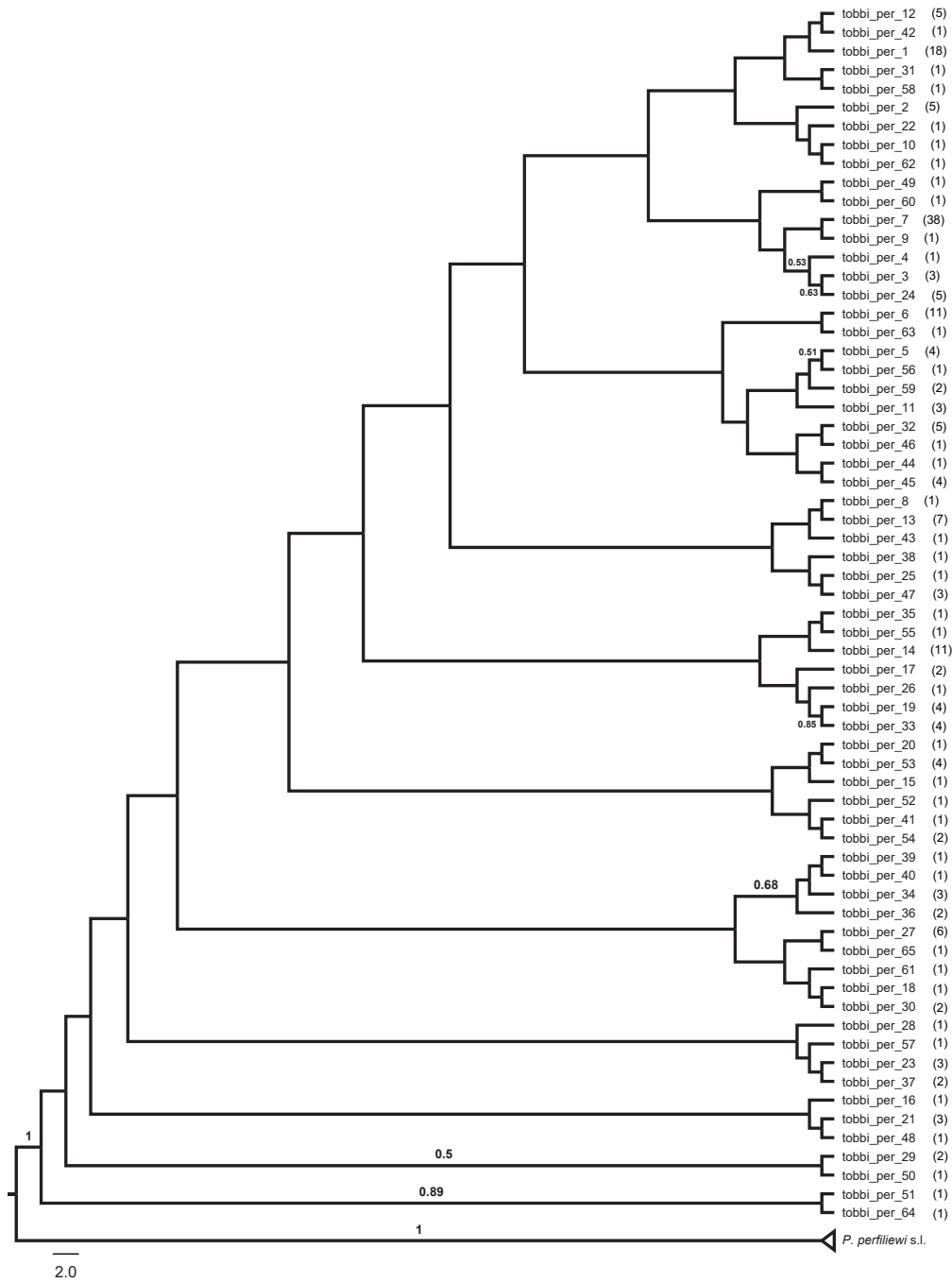
devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	per Haplotip
<i>P. tobbi</i>	Mardin	DRI 3	tobbi_per_7 / 33
		DRI 4	tobbi_per_14 / 32
		DRI 15	tobbi_per_19 / 32
		DRI 16	tobbi_per_7 / 23
		DRI 17	tobbi_per_34 / 36
		DRI 20	tobbi_per_36 / 37
		DRI 22	tobbi_per_6 / 35
		DRI 24	tobbi_per_7 / 34
	Yozgat	KDL 2	tobbi_per_6 / 7
		KDL 4	tobbi_per_6 / 7
		KDL 6	tobbi_per_3 / 4
		KDL 7	tobbi_per_1 / 2
		KDL 10	tobbi_per_1 / 9
		KDL 29	tobbi_per_1 / 8
		KDL 30	tobbi_per_1
		KDL 39	tobbi_per_1 / 6
		KDL 42	tobbi_per_2 / 5
		Mersin	YLIM 2
	YLIM 3		tobbi_per_19 / 20
	SARI 9		tobbi_per_23 / 24
	SARI 10		tobbi_per_12 / 25
	KDIS 2		tobbi_per_13 / 28
	CAK 27		tobbi_per_30 / 31
	CAK 28		tobbi_per_21 / 27
	CAK 31		tobbi_per_24 / 29
	PAL 27		tobbi_per_26 / 27
	İzmir	KRBRN 13	tobbi_per_13 / 27
		KRBRN 17	tobbi_per_1 / 7
		KRBRN 19	tobbi_per_7 / 45
		KRBRN 49	tobbi_per_7 / 14
		KRBRN 55	tobbi_per_11 / 44
		SFR 3	tobbi_per_7 / 43
		SFR 18	tobbi_per_3 / 7
		SFR 37	tobbi_per_7 / 42
		SFR 44	tobbi_per_11 / 27

P. tobbi haplotiplerinin ML filogenetik ağacını oluşturmak için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış ve elde edilen K2+G+I (Kimura 2-parameter + Gamma distributed + Invariable) modeli kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Dış grup olarak *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. perfiliewi* s.l. haplotipleri kullanılmış ve Türkiye'den örneklenen tüm *P. tobbi* örneklerinin tek bir soy altında toplandığı tespit edilmiştir. %89 ve %50 bootstrap değeri görülen dallar, veri setinde yer alan çok sayıdaki heterozigot bireyin birer allelinden oluşan grupları temsil etmiştir. *Period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsine ait *P. tobbi* örneklerinin ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.19.'da; *cacophony* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.20.'de özetlenmiştir.

Tüm *P. tobbi* bireyleri kullanılarak en uygun nükleotid substitüsyon modeli tekrar hesaplanmış, elde edilen JC+G (Jukes-Cantor) modeli altında tür içi genetik uzaklık hesaplamaları yapılmıştır. *P. tobbi* içerisindeki tür içi genetik uzaklık %0.11 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer, ML filogenetik ağacının da gösterdiği gibi, söz konusu tür içerisinde belirgin bir gruplanma bulunmadığını desteklemiştir.

Ayrıca her *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan ve *period* geni başarılı şekilde elde edilen söz konusu iki türe ait tüm bireyler için en uygun nükleotid substitüsyon modeli K2+G (Kimura 2-parameter) olarak bulunmuş ve iki tür arası genetik uzaklık %6 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.19. *period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. tobbi* için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

		20		40		60		80		100		
tobbi_per_4	AGCAAACCCT	A	T	A	G	A	T	T	C	C	T	110
tobbi_per_5	110
perfilewi_per_1	C	.	T	110
perfilewi_per_28	C	110
Korunmuş ve değişken bölgeler												
		120		140		160		180		200		220
tobbi_per_4	CCATCGGGTA	C	T	A	C	G	A	G	G	T	A	213
tobbi_per_5	213
perfilewi_per_1	G	.	T	.	G	.	A	T	T	A	215
perfilewi_per_28	G	.	T	.	A	T	T	A	.	A	220
Korunmuş ve değişken bölgeler												
		240		260		280		300		320		
tobbi_per_4	TGCTGGTCTG	G	T	A	A	C	A	C	A	G	C	323
tobbi_per_5	323
perfilewi_per_1	T	G	.	A	T	325
perfilewi_per_28	C	.	.	A	.	.	G	.	T	.	330
Korunmuş ve değişken bölgeler												
		340		360		380		400		420		440
tobbi_per_4	CGGTGAAGCA	G	C	A	A	G	T	T	T	C	C	433
tobbi_per_5	433
perfilewi_per_1	A	435
perfilewi_per_28	A	.	G	440
Korunmuş ve değişken bölgeler												
		460		480		500						
tobbi_per_4	GAGATGACAA	T	T	T	C	C	G	A	A	A	G	506
tobbi_per_5	506
perfilewi_per_1	C	.	C	508
perfilewi_per_28	C	513
Korunmuş ve değişken bölgeler												

Şekil 3.20. *Larrousius* alt cinsine ait türlerin *period* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

3.2.4. *Adlerius* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen *Adlerius* alt cinsi içerisindeki tüm türler çalışmaya dahil edilmiş, 12 lokaliteden toplam 115 örneğin *period* geni analiz edilmiştir. Ayrıca morfolojik olarak hiçbir kategoriye dahil edilemeyen 18 adet *Adlerius* sp. örneği de çalışmaya katılmıştır. Tüm optimizasyon çalışmalarında rağmen *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus halepensis*’e ait 28, *Phlebotomus simici*’ye ait ise bir adet örneğin *period* gen dizisine ulaşılmış, diğer türlerin ise amplifikasyonundan başarılı sonuç elde edilememiştir. *P. halepensis* için Yozgat dışında Türkiye’den toplanan tüm lokalitelerden temsilci birey analizlere alınmış; *P. simici*’ye ait ise tek temsilci birey Yozgat’tan örneklenmiştir. DNA dizi analizleri sonucunda *P. halepensis*’in hiçbir bireyinde heterozigot insersiyon /delesyon gözlenmemiştir. Yapılan haplotip analizleri sonucunda *P. halepensis*’e ait dokuz adet haplotipin varlığı tespit edilmiş; haplotip çeşitliliği ise 0.62 olarak bulunmuştur. Tek örnek ile analizlere katılan *P. simici*’nin ise bir adet haplotipe sahip olduğu belirlenmiştir. *Period* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.27.’de yer almaktadır.

Çizelge 3.27. *Adlerius* türlerinin analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

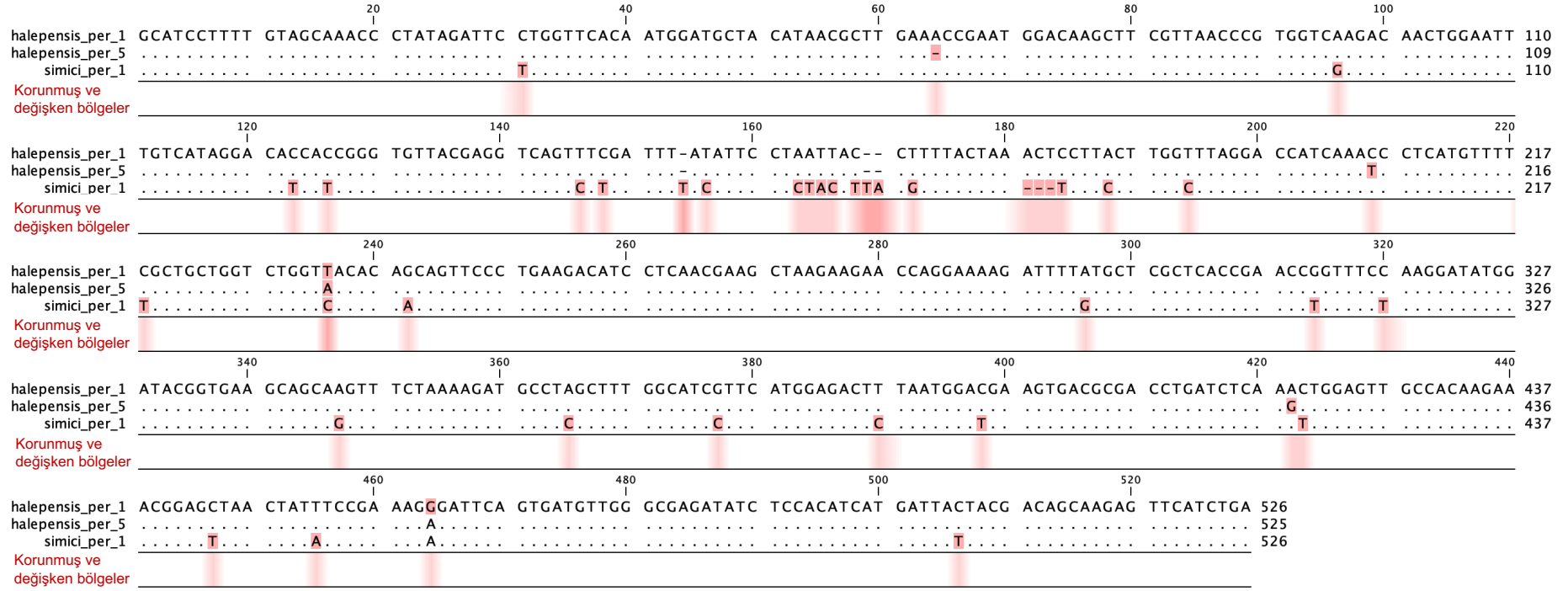
	<i>P. halepensis</i>	<i>P. simici</i>
<i>period</i> dizisi olan örnek sayısı	28	1
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	0	0
Haplotip sayısı	9	1
Haplotip çeşitliliği	0.62	0

Adlerius türlerinin örnekledikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.28.’de; bu alt cinse ait türlerin *period* geni bakımından gösterdikleri nükleotid değişimleri ise Şekil 3.21.’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.28.

Adlerius türlerinin *period* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

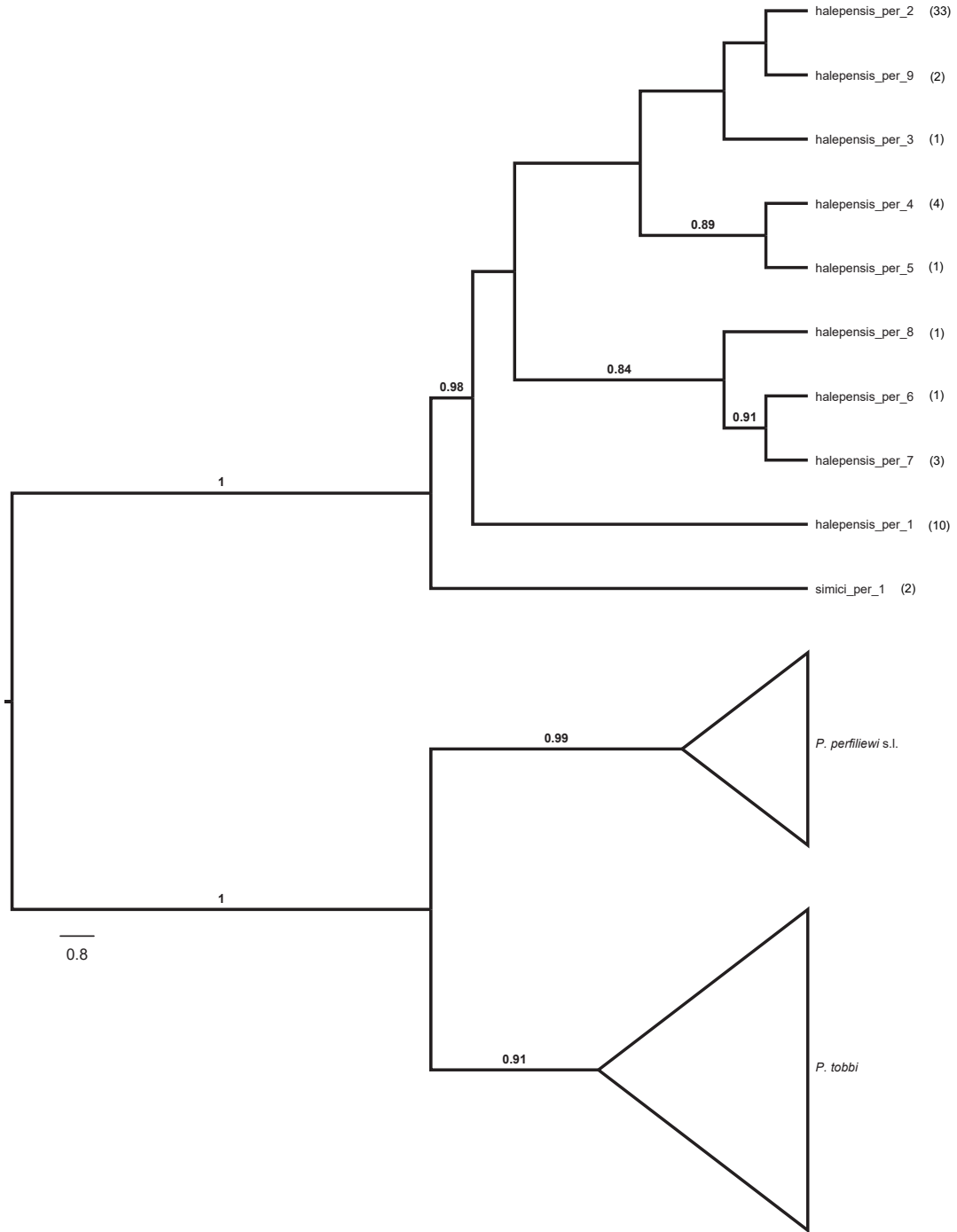
Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>P. halepensis</i>	Samsun	KOS 1.2	halepensis_per_2
		KOS 1.3	halepensis_per_2
	Sivas	KA 2	halepensis_per_1
	Rize	YKOY 1.2	halepensis_per_2
		AK 1.2	halepensis_per_2
		ISK 1.2	halepensis_per_2 / 3
	Artvin	CML 1.7	halepensis_per_2
		TEK 1.6	halepensis_per_9
	Konya	AYK 8	halepensis_per_1
	Erzincan	YUVA 1.36	halepensis_per_7
		YUVA 1.37	halepensis_per_1
		YUVA 2.3	halepensis_per_2
		YUVA 2.4	halepensis_per_1
KLM 1.18		halepensis_per_1 / 4	
Malatya	BG 1.4	halepensis_per_2 / 4	
	BG 1.21	halepensis_per_2	
	BG 1.27	halepensis_per_1 / 7	
	DUM 1.1	halepensis_per_5 / 6	
Kars	KOT 2	halepensis_per_2 / 8	
	KOT 3	halepensis_per_2	
	KOT 7	halepensis_per_2	
	KOT 13	halepensis_per_2	
	TK 18-2.1	halepensis_per_2	
	TK 19-2.1	halepensis_per_2	
İğdır	Pirli 7	halepensis_per_2	
Mardin	PNR 1	halepensis_per_2	
	SRG 6	halepensis_per_4	
	DRI 41	halepensis_per_2	
<i>P. simici</i>	Yozgat	KDL 14	simici_per_1



Şekil 3.21. *Adlerius* alt cinsine ait türlerin *period* haplotipleri arasında görülen nükleotid değişimleri.

Adlerius alt cinsine ait örneklerin *period* haplotiplerinden oluşan veri seti için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmış, söz konusu veri seti için T92+G (Tamura 3-parameter + Gamma distributed) en uygun model olarak bulunmuştur. Bu model altında ML filogenetik ağacı oluşturulmuş, dış grup olarak *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. tobbi* ve *P. perfiliewi* s.l. haplotipleri kullanılmıştır. Veri setinde tek birey ile temsil edilen *P. simici*, Türkiye’de 10 farklı lokaliteden örneklenen *P. halepensis*’ten *period* geni kullanılarak belirgin şekilde ayrılmıştır. Tüm *P. halepensis* örnekleri, herhangi bir gruplanma olmaksızın tek bir soy altında toplanmıştır. *Period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Adlerius* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.22.’de verilmiştir.

Period gen dizisi elde edilen tüm *Adlerius* örnekleri için yapılan en uygun substitüsyon modeli hesaplamasında HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), bu veri seti için en uygun model olarak bulunmuş ve genetik uzaklık hesaplamaları yapılmıştır. *P. halepensis* için tür içi genetik uzaklık değeri %0.18 iken, *P. halepensis* ve *P. simici* arasındaki genetik uzaklığın %7 olduğu tespit edilmiştir. ML filogenetik ağacı, genetik uzaklık hesaplamaları ile desteklenmiştir.



Şekil 3.22. *period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Adlerius* alt cinsi için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

3.2.5. *Transphlebotomus* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Transphlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan ve Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen tüm türler çalışmaya dahil edilmiş, iki farklı lokaliteden toplam 15 bireyin *period* geni analiz edilmiştir. PZR optimizasyonu sırasında hiçbir örnekte bant gözlenmemiş, tüm denemelere rağmen amplifikasyonu başarılı şekilde gerçekleşen herhangi bir örneğe rastlanmamıştır. Bu nedenle, *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan türlerden hiçbirinin *period* gen dizisine ulaşamamıştır.

3.2.6. *Sergentomyia* Alt Cinsi İçerisinde Yer Alan Türlerle Ait Bulgular

Sergentomyia antennata ve *Sergentomyia thedori* dışında Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen tüm *Sergentomyia* alt cinsine ait örnekler çalışmaya katılmış, yedi lokaliteden 67 örneğin *period* geni analiz edilmiştir. Söz konusu genin amplifiye edebilmek için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları *Sergentomyia* türleri için de gerçekleştirilmiş; ancak yalnızca *Sergentomyia minuta*’nın *period* geni başarılı şekilde amplifiye edilmiştir. *S. minuta*’nın Türkiye’de var olduğu bilinen tüm lokalitelerinden temsilci bireyler sonraki analizlere dahil edilmiş, yapılan haplotip analizleri sonucunda bu türe ait yedi adet haplotipin var olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca haplotip çeşitliliği 0.22 olarak bulunmuştur. DNA dizi analizleri sonucunda yalnızca bir adet örnekte heterozigot insersiyon /delesyona rastlanmıştır. *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan *S. minuta* için *period* genine ait veri elde edilen örnek sayısı, heterozigot indel görülen örnek sayısı, türlerin haplotip sayıları ve haplotip çeşitlilikleri Çizelge 3.29.’da yer almaktadır.

Çizelge 3.29. *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan *S. minuta*'nın analizlere dahil edilen ve indel gözlenen örnek sayıları ile her bir tür için elde edilen haplotip sayısı ve haplotip çeşitliliği.

<i>S. minuta</i>	
<i>period</i> dizisi olan örnek sayısı	30
Heterozigot indel gözlenen örnek sayısı	1
Haplotip sayısı	7
Haplotip çeşitliliği	0.22

S. minuta bireylerinin örneklendikleri lokaliteler, örnek numaraları, haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları Çizelge 3.30.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.30. *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan *S. minuta*'nın *period* geni için elde edilen haplotipleri ve bu haplotiplerin lokalitelere göre dağılımları.

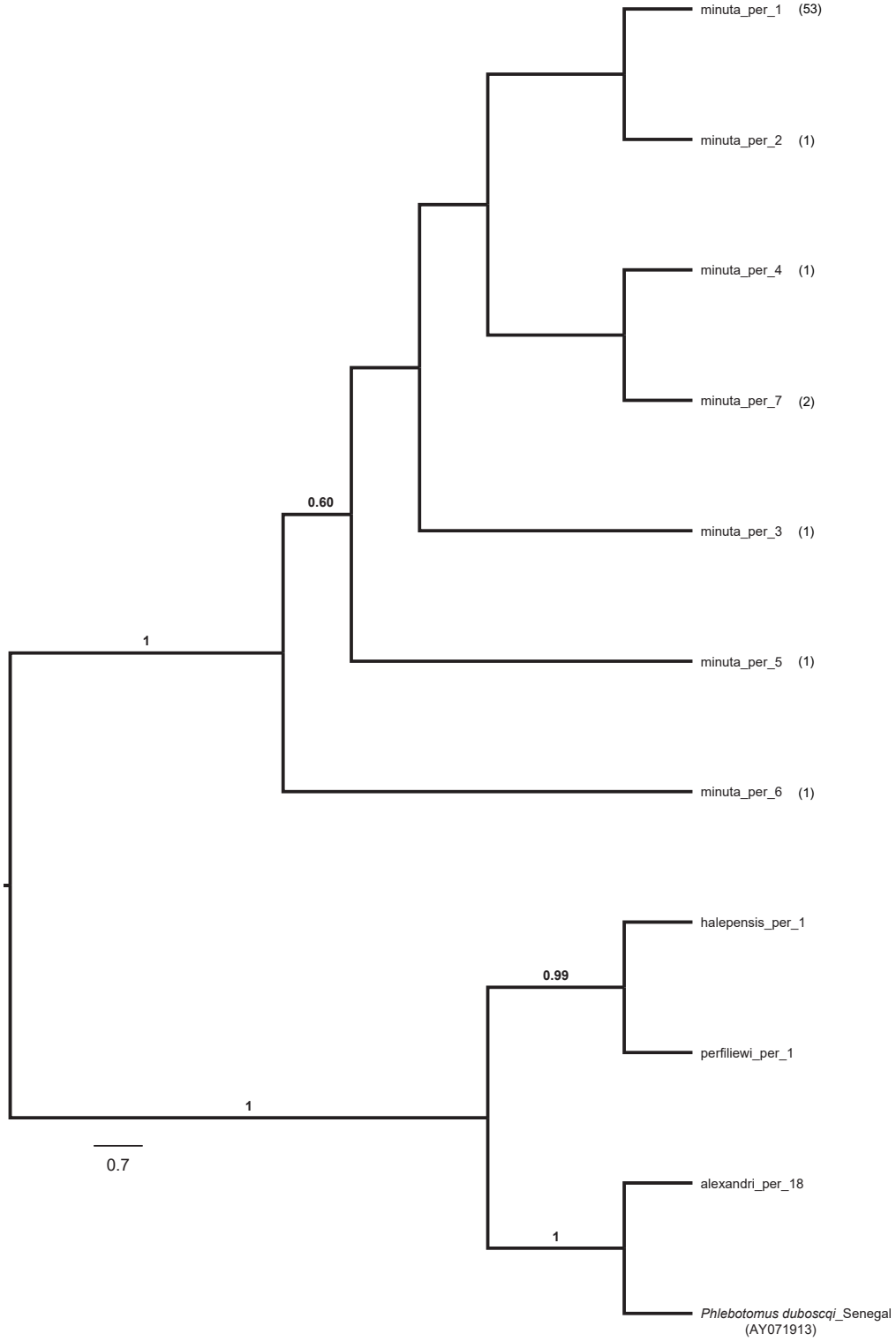
Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>S. minuta</i>	Antalya	BLD 3.153	minuta_per_1
		BLD 3.156	minuta_per_1
		BLD 3.163	minuta_per_1 / 7
		BLD 3.168	minuta_per_1
		BLD 3.189	minuta_per_1 / 7
		BLD 4.22	minuta_per_1
		BLD 4.34	minuta_per_1
		BLD 5.50	minuta_per_1
		BLD 5.59	minuta_per_1 / 6
		DIK 22	minuta_per_1
		DIK 23	minuta_per_1 / 5
	İzmir	KRBRN 52	minuta_per_1
		KRBRN 64	minuta_per_1
		SFR 62	minuta_per_1
		SFR 67	minuta_per_1
	Aydın	AKB 2.76	minuta_per_1
AKB 5.9		minuta_per_1	
AKB 23		minuta_per_1	
AKB 161		minuta_per_1	

Çizelge 3.30. devam ediyor.

Tür	Lokalite	Örnek No	<i>per</i> Haplotip
<i>S. minuta</i>	Mersin	KDIS 14	minuta_per_1 / 4
		KDIS 2.34	minuta_per_1
		KDIS 2.37	minuta_per_1
		KDIS 40	minuta_per_1
		KDIS 2.43	minuta_per_1 / 3
		KDIS 44	minuta_per_1
		KDIS 46	minuta_per_1
		KDIS 50	minuta_per_1
		KDIS 2.56	minuta_per_1
		KDIS 57	minuta_per_1
		KDIS 63	minuta_per_1 / 2

Dış grup olarak *Adlerius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. halepensis*, *Larroussius* alt cinsi içerisinde yer alan *P. perfiliewi* s.l. ve *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan *P. alexandri*'ye ait haplotipler ile *Phlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan ve GenBank'tan *period* gen dizisine ulaşılan *P. duboscqi* (GenBank erişim numarası: AY071913) örneği kullanılarak *S. minuta* haplotipleri için en uygun nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmıştır. T92+I (Tamura 3-parameter + Invariable) en uygun model olarak bulunmuş, ML filogenetik ağacı bu modele göre oluşturulmuştur. Elde edilen ağaca göre Türkiye'nin farklı lokalitelerinden örneklenen *S. minuta* haplotiplerinin tek bir soy halinde bulunduğu görülmüştür. *Period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *S. minuta* ML filogenetik ağacı ve her bir haplotipin frekansı Şekil 3.23.'te verilmiştir.

S. minuta'nın tüm bireylerine ait *period* geni için en uygun nükleotid substitüsyon modeli T92 (Tamura 3-parameter) olarak bulunmuş, bu model kullanılarak tür içi genetik uzaklık hesaplanmıştır. Elde edilen %0.00 değeri ile ML filogenetik ağacındaki sonuçlar desteklenmiştir.



Şekil 3.22. *period* haplotipleri kullanılarak oluşturulan *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan *S. minuta* için elde edilen ML filogenetik ağacı (Parantez içerisindeki değerler, her bir haplotipin frekansını göstermektedir).

4. TARTIŞMA

Kum sinekleri taşıdıkları birçok patojen nedeniyle insan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren önemli vektör canlılardır [1]. Her yıl on binlerce kişinin hayatını kaybettiği, Dünya Sağlık Örgütü'nün günümüzde en acil enfeksiyon hastalıklar sıralamasında başta yer alan ve tüm dünyada 20'den fazla *Leishmania* türünün yol açtığı leishmaniasis, enfekte kum sineği dişileri tarafından taşınmaktadır [8]. Kum sineklerinin yayılım gösterdiği alanlarda 800'ü aşkın türü bulunmakta, ekolojik ve biyolojik özellikler türler arasında değişkenlik göstermektedir [4, 19]. Bu nedenle vektör-konak-patojen arasındaki ilişkinin doğru kurulması ve kum sinekleri ile etkin bir mücadelenin gerçekleştirilebilmesi için doğru tür teşhisi esastır. Morfolojik karakterlere dayalı tür anahtarları, birçok canlı grubunda olduğu gibi kum sinekleri için de doğru tanımlama ve sınıflandırma için başvurulan ilk kaynağı oluşturmaktadır. Ancak kum sineği taksonomisi, içerdiği bazı sorunlar nedeni ile yalnızca morfolojik karakterlerin kullanımı ile gerçekleştirilecek bir sınıflandırmayı olanaksız hale getirmektedir. Özellikle birbirlerine yakın akraba türlerden oluşan ve morfolojik karakterlerine bakılarak ayırımın neredeyse imkansız olduğu tür komplekslerinin aydınlatılması, taksonomik çalışmalarda karşılaşılan zorluklardan birini oluşturmaktadır [11, 12]. Türkiye'de *Larrousius* alt cinsi içerisinde *Phlebotomus kandelakii* s.l., *Phlebotomus major* s.l., *Phlebotomus perfiliewi* s.l.; *Paraphlebotomus* alt cinsi içerisinde ise *Phlebotomus sergenti* s.l.'nin tür kompleksi olarak bulunduğu bilinmektedir [12]. Bunlar içerisinde *P. major* s.l. tür kompleksi içerisinde bulunan *P. neglectus* ve *P. syriacus* erkekleri, Lewis [45] 'in tür anahtarına göre coxite ve style uzunluklarına ve coxite'te bulunan kıl sayılarına göre birbirinden ayrılırken; aynı türlerin dişileri ortak spermateka kanalının uzunluğuna bağlı karakterler ile teşhis edilmektedir. Benzer şekilde *P. sergenti* s.l. kompleksi içerisinde yer alan *P. sergenti* ve *P. similis* erkekleri, yine Lewis [45]'e göre coxite'in basal lobunun uzunluk ve genişlik ölçümleri ile ayrılırken; dişilerin klasik preparat teknikleri ile birbirinden ayrılması neredeyse imkansızdır. Bu nedenle taksonomik olarak problemlili türlerin ve tür komplekslerinin anlaşılması kompleksi oluşturan türlerin belirlenmesi, aralarındaki ilişkinin anlaşılması, yayılım sınırlarının çizilmesi ve vektöriyel kapasitelerinin belirlenerek uygun mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [12]. Bu gibi durumlarda

araştırmacılar, morfolojiye ek farklı yöntemler deneyerek doğru tür teşhisine ulaşmayı hedeflemektedir. Tüm canlı gruplarında olduğu gibi kum sineklerinin taksonomisinin aydınlatılması ile ilgili çalışmalarda da çoğunlukla DNA barkod bölgeleri kullanılmaktadır. Ancak taksonomik statüsü net olmayan, birbirine yakın akraba türlerin sınıflandırılmasında barkod bölgelerin yeterliliği tartışılmaktadır [18, 46]. Barkod bölgelerine ek olarak çekirdek gen bölgeleri de çalışmalarda yer almakta; ancak iki farklı gene ait sonuçların korele olmadığı çalışmalar bulunmaktadır [22]. Bu nedenle araştırmacıların tür komplekslerini aydınlatma üzerine çalışmaları, güvenilir ve ayırım gücü yüksek yöntemler üzerine yoğunlaşmaktadır [28].

Yalnızca Eski Dünya kum sinekleri için değil, Yeni Dünya kum sinekleri için de komplekslerin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Latin Amerika'da *Leishmania infantum chagasi*'nin birincil vektörü olan *Lutzomyia longipalpis*'in taksonomik durumunun belirlenebilmesi için birçok yöntem denenmiştir [28]. Bauzer ve arkadaşlarının [28] yayınlamış olduğu derlemede izoenzim elektroforezi, eşey feromon analizleri, metafaz karyotiplemesi, *cytochrome b*, *cacophony* ve *period* genlerinin nükleotid varyasyon analizleri gibi birçok farklı yöntemin *Lu. longipalpis*'in taksonomik durumunu ortaya çıkarmak için kullanıldığı belirtilmiştir. Bu yöntemler içerisinde kur şarkısını kontrol ettiği bilinen *cacophony* ve *period* gen bölgelerine ait nükleotid varyasyon analizleri, *Lu. longipalpis*'in bir tür kompleksi olarak bulunduğunu desteklemiştir. Tür kompleksleri ile ilgili güçlü tahminler ortaya koyan söz konusu bu iki genden *cacophony*, Eski Dünya kum sineklerinden yalnızca *Sergentomyia clydei* ile çalışılmışken; *period* genine ait Eski Dünya kum sinekleri için bir kayıt bulunmamaktadır [28, 47].

Tez çalışması kapsamında *cacophony* ve *period* genlerinin Türkiye'de yayılım gösteren tüm kum sineği türleri için nükleotid varyasyonu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen gen dizileri, *S. clydei* dışında Eski Dünya kum sineklerine ait ilk kayıtları oluşturmuştur. Ayrıca Türkiye'deki tüm türlerin değerlendirmeye alınması ile geniş bir örneklem alanında söz konusu gen bölgelerinin tür içi ve türler arası

varyasyonları belirlenmiştir. Çalışmaya katılan her tür, kendi alt cinsi içerisinde değerlendirilmiştir. Alt cinsler gen bölgeleri bakımından ayrı analizlere alınmış, her biri için ayrı filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Sonuçta çalışmaya alınan tüm türler değerlendirildiğinde, *cacophony* ve *period* gen bölgelerinin Türkiye’de var olduğu bilinen türleri birbirinden ayırmada başarılı oldukları, aynı türün farklı popülasyonları arasındaki gen akışının mevcut durumlarını tespit edebildikleri ve tür komplekslerinin içerisinde yer alan farklı grupları belirlemede güçlü tahminler ortaya koydukları bulunmuştur.

Türkiye’nin farklı coğrafi bölgesinden iki cins ve altı alt cinse ait, toplam 884 birey her iki gen için de analiz edilmiştir. Alt cinslere ait elde edilen sonuçlar, daha önce Türkiye’de bulunan bütün türler için gerçekleştirilmiş olan barkod çalışması ile karşılaştırılmıştır [12].

Phlebotomus Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Phlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus papatasi*, Ortadoğu’dan Akdeniz’e kadar geniş bir coğrafi alanda yayılım göstermektedir [44]. Eski Dünya’da *Leishmania major*’ün kanıtlanmış temel vektörü olan *P. papatasi*’nin, Türkiye’de bu alt cins içerisinde yer alan tek tür olduğu bilinmektedir [12]. Daha önceki çalışmalarda, *P. papatasi*’nin yayılım gösterdiği birçok farklı ülkeden örnekler toplanmış, bu örnekler çeşitli çekirdek (*ITS2*) ve mitokondriyal (*ND4*, *cyt b*) gen bölgeleri bakımından analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, söz konusu türün tüm yayılım alanları içerisinde gen akışının devam ettiği, coğrafi herhangi bir engele veya mesafeye bağlı olarak bir üreme izolasyonunun henüz görülmediği tespit edilmiştir [44, 48]. Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] Türkiye’de var olduğu bilinen bütün türler ile yaptığı barkod çalışmasında, 56 adet *P. papatasi* örneği *cox1* barkod bölgesi bakımından analize alınmış, sonuçta tüm örneklerle ait tek bir soy hattı elde edilmiştir. Tez çalışmasında örneklem grubu daha da genişletilerek 69 adet *P. papatasi* bireyi, *cacophony* ve *period* gen bölgeleri bakımından analize alınmıştır. *Cacophony* genine ait DNA dizileri, analize alınan tüm örneklerde heterozigot insersiyon / delesyon göstermiş; *period*

genine ait dizilerde ise örneklerin neredeyse tamamında aynı durum gözlenmiştir. Söz konusu indel durumu, *P. papatasi* bireyleri dışında *cacophony* geninin amplifiye edilen son 80-100 nükleotidlik bir kısmında görülürken, yalnızca *P. papatasi* bireylerinde elde edilen amplikonun tamamında tespit edilmiştir. *Period* geninde ise diğer türlerde olduğu gibi *P. papatasi*'de gözlenen indel belirli bir noktadan başlayıp, amplikonun sonuna kadar devam etmektedir. Ancak hem dünyanın farklı ülkelerinden toplanan örneklerle yapılan çalışmalar hem de Türkiye'nin farklı lokalitelerinden örneklerin barkod bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda, *P. papatasi* için gen akışının tüm dünyada kesintisiz devam ettiği ile ilgili bulguların var olduğu tespit edilmiştir [12, 44, 48]. Bu nedenle *P. papatasi* örnekleri için herhangi bir indel örüntüsü tespit edilememiş, klonlama basamağına başvurulmaksızın *cacophony* ve *period* gen bölgeleri bakımından analizler bu türün bireyleri için gerçekleştirilmemiştir.

Paraphlebotomus Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Paraphlebotomus alt cinsine ait *Phlebotomus alexandri*, İspanya'dan Çin'e ve güney Etiyopya'ya kadar geniş bir coğrafi alanda yayılım göstermektedir. Taşdığı *Leishmania donovani complex* (*Leishmania donovani* s.s. ve *Leishmania infantum*) nedeni ile yayılım gösterdikleri alanlarda kanıtlanmış veya şüphelenilen vektör olarak bilinmektedir [4, 12]. Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] Türkiye'de yaptığı barkod çalışması sonucunda, *cox1* geni bakımından iki farklı *P. alexandri* soyu olduğu bulunmuştur. İkinci soyu oluşturan tek bireyin, diğer bütün bireylerden belirgin şekilde ayrıldığı gözlenmiştir. Tez çalışmasında barkodu yapılmış olan örnekler ile çalışılmıştır; ancak tek bireyle ayrı soyu oluşturan örneğin, her iki genine ait amplifikasyonu da başarılı olamamıştır. Bu nedenle değerlendirmeye alınamamış, filogenetik ağaçları oluşturulamamıştır. Söz konusu örnek hariç, diğer örnekler için oluşturulan hem *cacophony* hem de *period* gen bölgelerine ait ML filogenetik ağaçlarının, barkod sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görülmüştür. Türkiye'de *P. alexandri* türüne ait tek bir soy bulunmuştur ve sekiz farklı lokaliteden örneklenen tüm bireyler arasında coğrafi herhangi bir engel veya mesafeye bağlı olmaksızın gen akışının devam ettiği

tespit edilmiştir. Ayrıca tüm coğrafi bölgelerde aynı haplotipin paylaşılması (alexandri_cac_1 ve alexandri_per_1 gibi), kesintisiz gen akışı düşüncesini destekler nitelikte görülmüştür. İkinci bir soy hattının, diğer *P. alexandri* soyundan ne kadar farklılaştığını veya popülasyondaki durumunu anlayabilmek için örnek sayısını arttırmak ve çalışma alanını bu doğrultuda genişletmek gerekmektedir.

Paraphlebotomus alt cinsi içerisinde bulunan başka bir tür olan *Phlebotomus sergenti* s.l., hem ülkemizde hem de yayılım gösterdiği birçok Ortadoğu ve Afrika ülkesinde *L. tropica*'nın kanıtlanmış vektörüdür [4, 14]. Yayılım alanları içerisinde göstermiş olduğu morfolojik varyasyonlar nedeniyle, tür kompleksi olarak düşünülmektedir. Aynı alt cins içerisinde yer alan ve morfolojik olarak *P. sergenti* s.l.'ye oldukça benzeyen *Phlebotomus similis* ise, ilk olarak *P. sergenti* s.l.'nin alt türü olarak tanımlanmış [45]; daha sonra yapılan moleküler ve morfolojik bir takım çalışmalar sonucunda ise ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir [49, 50]. Depaquit ve arkadaşlarının [49] farklı ülkelerden topladıkları *Paraphlebotomus* örnekleri ile yaptıkları çalışmada *P. similis*, *P. jacusieli*'ye kardeş tür olarak gruplanmış, *P. sergenti* s.l. ise bu iki türden belirgin şekilde ayrılmıştır. Ülkemizde Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] yaptığı barkod çalışması sonucunda ise, Bursa'dan toplanan *P. sergenti* s.l. örneklerinin belirgin şekilde diğer bütün *P. sergenti* s.l.'lerden ayrıldığı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında *cacophony* geni değerlendirilen *P. sergenti* s.l.'nin, yalnızca Bursa örneklerinin gen dizileri elde edilmiş; diğer lokalitelerden toplanan tüm örneklerde heterozigot indel görülmesi nedeniyle gen dizilerine ulaşamamıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçta *P. sergenti* s.l. örnekleri, *P. jacusieli* örnekleri içerisine yer almıştır. *Period* geni için gerçekleştirilen analizlerde ise, Bursa hariç Türkiye'deki tüm lokalitelerden toplanan *P. sergenti* s.l. örnekleri, coğrafi koşullardan bağımsız tek bir soy hattında toplanmıştır. Bursa *P. sergenti* s.l. örnekleri tıpkı *cacophony*'de olduğu gibi Karabük ve Antalya *P. jacusieli*'leri ile birlikte gruplanmıştır. *P. sergenti* s.l.'ye yakın akraba takson olan *P. similis* Türkiye'de rapor edilmiş olmasına rağmen, varlığı şüphelidir [12]. Bursa örneklerinin barkod çalışması ile birlikte hem *cacophony* hem de *period* gen bölgeleri bakımından belirgin şekilde diğer *P. sergenti* s.l.'lerden ayrılması, Türkiye'de olası bir *P. similis* türünün varlığına işaret edebilmektedir [56]. Aynı zamanda barkod sonucu *P. jacusieli* çıkan

örneklerin, söz konusu iki gen bakımından Bursa *P. sergenti* s.l.'leri ile karışık şekilde gruplanması, iki tür arasında bir hibritleşmenin var olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca genetik uzaklık hesaplamalarından elde edilen sonuçlar, söz konusu şüpheleri desteklemektedir.

Paraphlebotomus türleri içerisinde *Phlebotomus caucasicus*, *L. major*'ün Afganistan ve İran'da kanıtlanmış veya şüphelenilen vektörüdür [4]. Son zamanlarda Kuzey Doğu Anadolu'dan da örneklenen *P. caucasicus*'un ülkemizde nadir bulunan bir tür olduğu bilinmektedir [12]. Türkiye'deki kum sinekleri için oluşturulan barkod kütüphanesinde iki birey ile temsil edilen *P. caucasicus* örnekleri *cacophony* çalışmasına bir, *period* çalışmasına ise iki bireyle katılmıştır. Söz konusu barkod geni için değerlendirmeye alınan *P. caucasicus* örnekleri, hiçbir sınıfa dahil edilemeyen ve Artvin'den örneklenen *Paraphlebotomus* sp. örnekleri ile kardeş tür olarak gruplanmıştır. *Cacophony* gen dizisine ulaşılamayan *Paraphlebotomus* sp. örneklerinin, *period* geni değerlendirildiğinde ise *P. jacusieli* örneklerine daha yakın akraba olduğu görülmüştür. İki filogenetik ağaç arasındaki bu fark, *cox1* geninin maternal kalıtılırken; kur davranışı genlerinin her iki ebeveyniden aktarılması nedeniyle farklı sonuçların çıkması olarak açıklanabilmektedir.

Paraphlebotomus alt cinsi içerisinde yer alan ve vektör olduklarına dair herhangi bir kanıt bulunmayan *P. jacusieli*'nin, Ortadoğu ve Kafkaslarda yayılım gösterdiği, Türkiye'de ise Anadolu'da ve Akdeniz'de var olduğu bilinmektedir. Daha önce gerçekleştirilen barkod çalışması kapsamında ilk defa Karabük'ten olmak üzere Karadeniz'de varlığı belirlenmiştir [12]. *Cacophony* ve *period* gen bölgelerinden elde edilen ML filogenetik ağaçlarında Erzincan'a ait haplotipler (*jacusieli_cac_3/4* ve *jacusieli_per_2/3*), belirgin şekilde ayrılmıştır. Genetik uzaklık hesaplamaları ile desteklenen bu durum sonucunda, *P. jacusieli* türü içerisinde türleşmeye başlayan ayrı bir grubun varlığından söz edilebilmektedir. Ayrıca *P. sergenti* s.l. haplotipleri için tartışılan durum, *P. jacusieli* haplotipleri için de söz konusu olmuştur. İç içe geçen *P. sergenti* s.l. ve *P. jacusieli* haplotipleri, olası bir hibritleşme durumunu ifade ediyor olabilmektedir. Bunun yanı sıra, *cox1*

haplotipleri ile oluşturulan ML filogenetik ağacında [12] *P. jacusieli* örnekleri, birlikte gruplanan *P. caucasicus* ve *Paraphlebotomus* sp. örneklerine yakın akraba bir durum sergilerken; *period* sonuçlarına göre *P. caucasicus* örnekleri belirgin şekilde ayrı bir grup oluşturmuş, *P. jacusieli* örnekleri *P. jacusieli*-*P. sergenti* s.l. grubuna kardeş tür olarak gruplanmıştır. Aynı durum *cacophony* sonuçları için de geçerlidir. Ancak *cacophony* geni analizlerine *Paraphlebotomus* sp. örneklerinin dahil olmamış olması ve *P. sergenti* s.l. örneklerine ait tüm bireylerin ağaçta yer almaması tüm akrabalık ilişkilerini göstermede yeterince başarılı olamamıştır.

Larroussius Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus kandelakii* s.l., Gürcistan'da *Leishmania infantum*'un kanıtlanmış vektörüdür [51]. Yayılım gösterdiği diğer ülkelerde olduğu gibi, Türkiye'de de ZVL'nin şüphelenilen vektörü olduğu bilinmektedir [4, 52]. Bu tür kompleksi içerisinde bulunan *P. kandelakii* ve *P. burneyi* türlerinin Türkiye'de bulduklarına dair kayıtlar rapor edilmiştir [53, 54]. Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] 2005-2016 yılları arasında Türkiye'nin tüm biyocoğrafik bölgelerinden topladıkları örnekler içerisinde toplamda 52 adet *P. kandelakii* s.l. örneği, *cox1* geni bakımından değerlendirilmiştir. Sonuçta iki ana soy hattının varlığı tespit edilmiştir. Birinci soyu Anadolu'dan toplanan haplotipler oluştururken, ikinci soy Akdeniz ve Karadeniz'den elde edilen haplotiplerden oluşmuştur. Anadolu haplotiplerinin içerisinde ise İğdır popülasyonlarına ait bir alt gruplanma ortaya çıkmıştır. *Cacophony* geni değerlendirildiğinde, tıpkı barkod bölgesinde olduğu gibi iki ana soy hattından bahsedilmektedir. Anadolu'dan toplanan örneklerin oluşturduğu soy, Akdeniz-Karadeniz örneklerinin oluşturduğu soydan tamamen ayrılmıştır. Her iki gen için de elde edilen bu sonuç, *P. kandelakii* s.l.'nin tür kompleksi içerisinde yer alan söz konusu grubun Türkiye'nin kuzeyinden güneyine devam eden bir gen akışı içerisinde olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca Anadolu haplotiplerinin oluşturduğu grup içerisinde İğdır örnekleri ayrı bir alt grup oluşturmaktadır. Bu alt grubun önemli bir farklılaşma ile diğer gruplardan ayrılmadığı; ancak söz konusu

populasyondan yeterli sayıda birey olmadan gerçekleştirilen bu analizin örneklem grubunun arttırılması ile daha anlamlı ve doğru sonuçlar ortaya koyacağı düşünülmektedir. Anadolu'dan toplanan *P. kandelakii* s.l. örnekleri ile Akdeniz-Karadeniz'den toplanan *P. kandelakii* s.l. örnekleri arasındaki genetik uzaklık (%2.13), *cacophony* geni göz önünde bulundurulduğunda iki ayrı tür arasında gözlemlenen genetik uzaklık değerini göstermiştir. Bu doğrultuda *P. kandelakii* s.l. içerisinde yer alan bu iki grubun iki ayrı tür olarak Türkiye'de var olduğu ile ilgili geçerli tahminler öne sürmek söz konusu olabilmektedir. Ancak erkek bireylerin karakterinin yeterince belirleyici olmaması ve dişilerin izomorfik olması nedeni ile analizlere alınan örneklerin morfolojik teşhisleri gerçekleştirilemediği gibi [45], örneklerin herhangi bir gen dizisi *P. burneyi* ve *P. kandelakii* s.l.'ye ait tip lokalitelerinden (sırasıyla Gürcistan ve Pakistan) örneklerin gen dizileriyle karşılaştırılmadığı için hangi örneğin bu tür kompleksinin hangi üyesine ait olduğu belirlenememiştir.

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan ve ülkemizde geniş bir alanda yayılım gösterdiği bilinen *P. major* s.l. tür kompleksi, birbirine morfolojik olarak oldukça benzeyen türlerden oluşmaktadır [12, 24]. Erişöz Kasap ve arkadaşları [24] tarafından yapılan önceki çalışmalarda *P. major* s.l. kompleksini tanımlamak, üyelerini ve üyelerinin yayılım sınırlarını belirlemek amacı ile Türkiye'yi temsil edecek şekilde birçok farklı lokaliteden örnekler toplanmış, tüm bireylerin morfolojik ve moleküler yöntemler ile teşhis edilebilmesi amaçlanmıştır. Kullanılan 12 farklı morfolojik karakter ile herhangi bir ayırım sağlanamamış; mitokondriyal *cyt b* ve nükleer *EF 1- α* genlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu, Türkiye'de simpatrik olarak bulunan üç farklı soyun varlığı tespit edilmiştir. Bunlardan birincisini Türkiye'nin yalnızca güney doğusunda bulunan *Phlebotomus syriacus*, ikincisini ise Türkiye'nin en doğusu ve en batısında bulunan *Phlebotomus neglectus* türleri oluşturmaktadır. Üçüncü bir olası grup ise Türkiye'nin orta kuzey ve orta güney bölgelerinde bulunmaktadır [24]. Barkod çalışması sonucunda ise Türkiye genelinde toplamda beş farklı grubun varlığından söz edilmektedir. İki ayrı araştırma birlikte değerlendirildiğinde, birbiri ile örtüşen iki grubun varlığı tespit edilmiştir. Gruplardan ilki *P. syriacus* olduğu düşünülen örneklerden oluşurken; ikincisi Türkiye'nin genelinde yayılım gösteren

diğer bir grup tarafından temsil edilmektedir. *P. syriacus*'un bulunduğu düşünölen bölge, Türkiye'nin Adana, Hatay ve Kahramanmaraş illeri ile sınırlanmıştır [12]. *Cacophony* genine ait sonuçlar değerlendirildiğinde ise, *P. major* s.l. örneklerinin iki ana soy altında toplandığı görölmüştür. *P. syriacus* olduğu düşünölen örnekler, diğer çalışmalarda olduğu gibi belirgin şekilde ayrı gruplanmıştır. Akdeniz Bölgesi'nin güney doğusunda sınırlı bulunan ve yapılan tüm çalışmalarda aynı gruplanmayı gösteren bu örneklerin, *P. major* s.l. tür kompleksi içerisinde yer alan *P. syriacus* örnekleri olduğu güçlü bir tahminle ortaya koyulmuştur. *Cacophony* geni kullanılarak oluşturulan ML filogenetik ağacına göre diğer sonuçlar, *P. syriacus* haplotiplerine kardeş grubun Antalya'dan iki, Hatay'dan bir örnek (major_cac_33 ve 36) olduğunu göstermiştir. Bu gruba yakın akraba olarak gruplanan tek birey ise Kars'tan örneklenmiştir. Söz konusu bütün haplotipler, ana soylardan ilkinin oluşturmuştur. İkinci ana soyda ise kalan tüm *P. major* s.l. haplotipleri yer almakla birlikte, Kars'tan iki ve Artvin'den bir örnek (major_cac_27 ve 35) belirgin şekilde ayrı bir alt soya ayrılmaktadır. Böylelikle, *cacophony* geni bakımından *P. major* s.l. tür kompleksi, örneklendiği tüm alanlar içerisinde dört alt grup halinde bulunmaktadır. Barkod ve *cacophony* sonuçları karşılaştırıldığında, her iki gen için Türkiye'de bulunan *P. major* s.l. tür kompleksine ait grupların sayısı ve grupların yayılım gösterdiği coğrafi sınırlar çok benzer bulunmuş; buna ek olarak örtüşmeyen bireylerin var olduğu tespit edilmiştir. Barkod çalışmasında kullanılan genin mitokondriyal genomda bulunan bir gen olması, dolayısıyla mutasyon biriktirme hızının çekirdek genomda bulunan genlere göre daha hızlı olması nedeniyle bu uyumsuzluğun olabileceği düşünölmektedir [55]. *Cacophony* geninde gözlenen heterozigot bireyler de bu uyumsuzluğa neden olabilecek başka bir parametre olabilmektedir. Ayrıca indel gözlenen bireylerin fazlalığı nedeniyle değerlendirmeye alınamayan çok sayıda örnek bulunmaktadır. Bu nedenle örneklem grubunun genişletilerek gruplar üzerine değerlendirmelerin tekrarlanması gerektiği düşünölmektedir. Tüm bunlara ek olarak, genetik uzaklık hesaplamaları *P. major* s.l. içerisinde yalnızca iki ana soyun varlığı çerçevesinde gerçekleştirildiğinde türler arasında ortaya çıkan sonuç (%2,7), bu gen için oldukça yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. Filogenetik ağaçta göröldüğü gibi, beş farklı grup ile hesaplamalar gerçekleştirildiğinde, tür içi ve türler arası oranlar beklenen sınırlar içerisinde bulunmuştur. Bu nedenle *P. neglectus* olarak bilinen türün, Türkiye'de yayılım

gösterdiği alan tam olarak bilinmemektedir. Özetle Türkiye'nin güneyinde *P. syriacus*'un bulunduğu net bir şekilde söylenebilmekle beraber, farklı türler olduğu düşünülen diğer grupların *P. major* s.l. olarak adlandırılmasının daha doğru olabileceği düşünülmektedir.

P. major s.l. tür kompleksi için elde edilen diğer sonuçlara göre, Antalya'dan iki örnek *P. syriacus* örneklerine yakın gruplanırken, diğer tüm Antalya örnekleri ikinci soyda gruplanmıştır. Böylelikle farklı tür olduğu düşünülen *P. major* s.l. gruplarından bireylerin, Antalya'da simpatrik olarak bulunabildiği sonucu, daha önce gerçekleştirilen sonuçlarla uygunluk göstermektedir [12, 24]. Ayrıca Kahramanmaraş'tan klonlanan CUH 10 örneğinin allellerinden biri birinci soy hattında, diğeri ise ikinci soy hattında bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında *P. syriacus* ve farklı bir *P. major* s.l. türüne ait bireyin hibrit oluşturabildiği ilk kez ortaya koyulmuştur.

Larrousius alt cinsi içerisindeki diğer tür kompleksi olan *Phlebotomus perfiliewi* s.l. içerisinde sınıflandırılan üyelerin taksonomik durumu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Erkek bireyler dış genital karakterleri bakımından önemli bir coğrafi varyasyon göstermekle birlikte, dişileri birbirinden ayırmak neredeyse imkansızdır [22]. *Phlebotomus galilaeus*, *Phlebotomus perfiliewi* ve *Phlebotomus transcaucasicus* olmak üzere dünyada yayılım gösteren üç türü olduğu bilinmektedir. Türkiye'de bu üç türün simpatrik olarak bulunduğu dair kayıtlar olmasına rağmen [52, 54, 56], Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] *P. perfiliewi* s.l. tür kompleksi için ortaya koydu *cox1* sonuçları, söz konusu tür kompleksinin Türkiye'de tek takson olarak bulunduğunu göstermiştir. Tez çalışmasından elde edilen *cacophony* ve *period* gen bölgelerine ait sonuçlar ise, yapılmış olan barkod çalışmasını desteklemektedir. Her iki gen kullanılarak oluşturulan ML filogenetik ağaçları ayrı ayrı incelendiğinde, *P. perfiliewi* s.l.'nin tek takson olarak gruplandığı gözlenmiş, geniş bir coğrafi alandan örneklenmiş farklı populasyonlar arasındaki gen akışının devam ettiği tespit edilmiştir. Genetik uzaklık hesaplamaları sonucunda tür içinde herhangi bir farklılaşmaya sebep olacak kadar anlamlı bir ayırım olmadığı anlaşılmıştır. Bu iki çalışmaya ek, tür içi genetik uzaklık değerlerinden de her iki çalışmayı destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

Larroussius alt cinsi içerisinde yer alan *Phlebotomus tobbi*'nin, Türkiye'de *L. infantum*'un kanıtlanmış vektörü olduğu bilinmektedir [10, 57]. *Cox1* geni ile yapılan çalışmalar doğrultusunda *P. tobbi*'nin Türkiye'de tek takson olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda Kıbrıs'tan (Erişim numarası: KX826025, KX826041), Yunanistan'dan (Erişim numarası: KU519502, KU519503, KT634317) ve İsrail'den (Erişim numarası: KF483675) örneklerin *cox1* gen bölgeleri ile karşılaştırıldığında, *P. tobbi*'nin farklı popülasyonlarında coğrafi bir engele veya mesafeye bağlı olmaksızın gen akışının devam ettiği tespit edilmiştir [12]. *Cacophony* ve *period* gen bölgelerine ait ML filogenetik ağaçları ve bu iki genden elde edilen genetik uzaklık değerleri, barkod sonuçlarını desteklemektedir.

Adlerius Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Adlerius alt cinsine ait türlerden birkaçının VL'nin şüphelenilen vektörü oldukları bilinmektedir. Söz konusu alt cins içerisinde yer alan türlerin dişilerini morfolojik olarak teşhis etmek neredeyse imkansızdır. [58]. Türkiye'de *Adlerius* alt cinsi içerisinde toplamda beş tür bulunmaktadır. Bu türlerden *Phlebotomus simici* Ortadoğu, Doğu Akdeniz ülkeleri ve Kafkasya'da yayılım göstermektedir. Türkiye'deki *Adlerius* türlerine ait elde edilen DNA barkodlama çalışması sonucunda, *P. simici*'nin tek bir soy olarak Türkiye'de var olduğu tespit edilmiştir [12]. Benzer şekilde *cacophony* dizisi kullanılarak elde edilen haplotipler ile oluşturulan ML filogenetik ağacına göre, *P. simici*'nin diğer bütün *Adlerius* türlerinden ayrılarak tek bir grup oluşturduğu görülmüştür. Elde edilen haplotipler arasında *simici_cac_2* gibi haplotiplerin, Türkiye'nin neredeyse tüm örneklem alanlarında paylaşılması, türün popülasyonları arasındaki gen akışının kesintisiz devam ettiği yönünde güçlü tahminler sunmuştur. *Adlerius* alt cinsi içerisindeki en yüksek haplotip çeşitliliği *P. simici* içerisinde bulunmuş, genetik uzaklık analizleri sonucunda tür içerisinde anlamlı bir ayrılma görülmemiştir. Bunların yanı sıra, *period* genine ait yalnızca bir örneğin amplifikasyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiş, söz konusu tür ile ilgili *period* analizleri gerçekleştirilememiştir.

Adlerius alt cinsi içerisindeki diğer bir tür olan *Phlebotomus brevis*'in Yunanistan, Malta, Türkiye, İran ve Kafkaslarda yayılım gösterdiği bilinmekle birlikte, Türkiye'de oldukça nadir bulunduğu tespit edilmiştir [12]. Daha önce yapılan çalışmalarda *P. brevis* ve *P. simici*'nin yakın akraba türler olduğu ortaya koyulmuş, belirli bölgelerde simpatrik olarak bulunabildikleri rapor edilmiştir [59]. Bunlara ek olarak Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] Türkiye'de yapmış olduğu barkod çalışmasında morfolojik olarak teşhisi gerçekleştirilemeyen ve belirgin şekilde diğer bütün *Adlerius* türlerinden ayrılarak yeni bir grup oluşturan *Adlerius* sp. örnekleri tespit edilmiştir. *cox1* sonuçlarına göre, teşhisi gerçekleştirilemeyen *Adlerius* sp. örnekleri, *P. brevis* örneklerine kardeş tür olarak gruplanmış ve *P. simici* örnekleri bu gruba en yakın *Adlerius* taksonu olarak konumlanmıştır. *Cacophony* geni ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise, daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir [12, 59]. Filogenetik ağaç dikkate alındığında *P. brevis* ve *Adlerius* sp. örnekleri birbirlerine kardeş grup, *P. simici* örnekleri ise bu gruba en yakın diğer grup olarak bulunmuştur. Aynı şekilde genetik uzaklık hesaplamalarından elde edilen değerler, türler arasındaki söz konusu genetik mesafeyi desteklemiştir.

Adlerius alt cinsi içerisindeki diğer türler olan *Phlebotomus balcanicus* ve *Phlebotomus kyraniae*'nin de yapılan arazi çalışmalarında tıpkı *P. brevis* gibi, Türkiye'de nadir buldukları belirlenmiştir [12]. *P. balcanicus* Akdeniz'de, *P. kyraniae* ise Anadolu bölgesinde yayılım göstermektedir. İçlerinden *P. balcanicus*'un Gürcistan'da ZVL'nin kanıtlanmış vektörü olduğu bilinmektedir [51]. *Phlebotomus halepensis* ise Orta Doğu, Kafkasya ve Türkiye'de yayılım göstermekte, hem ZVL hem de KL taşıdıklarına dair güçlü tahminler bulunmaktadır [12, 60]. Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] yapmış olduğu barkod çalışmasında, Türkiye'den örneklenen tüm *P. balcanicus*, *P. kyraniae* ve *P. halepensis* örnekleri, *Adlerius* alt cinsinin ikinci soyunu oluşturmuştur. *P. balcanicus* ve *P. kyraniae* kardeş türleri oluştururken *P. halepensis* örnekleri bu gruptan ayrılmış; fakat yakın akraba takson olarak ML filogenetik ağacında konumlanmıştır. *Cacophony* geni ile yapılan çalışmalar ise, tıpkı barkod bölgesinde olduğu gibi sonuçlar vermiştir. Coğrafi bir nedene bağlı olmaksızın

tüm *P. halepensis* populasyonları arasında gen akışının devam ettiği, genetik uzaklık analizlerinden elde edilen sonuçlarla da doğrulanmıştır. Ayrıca *period* geni elde edilen tek *Adlerius* türü olan *P. halepensis* (bir adet *P. simici* örneği hariç), bu gen için de Türkiye’de tek bir grup olarak gözlenmiştir. Aynı durum *P. balcanicus*’a ait iki haplotip için de geçerlidir. Barkod sonuçlarına ek, *cacophony* sonuçlarında *P. kyreniae* içerisinde bir ayırım gözlenmiş, *kyreniae_cac_1*, 2 ve 3 haplotipleri belirgin şekilde diğer haplotiplerden ayrılmıştır. İki *P. kyreniae* grubu arasında gerçekleştirilen genetik uzaklık hesaplamaları, söz konusu tür içerisinde türleşmeye başlayan ayrı bir grubun varlığına işaret etmektedir. Analize alınan tüm haplotiplerin aynı lokaliteden (Mardin) örneklenmiş olması, türün örnekleri içerisinde herhangi bir üreme izolasyonunun gerçekleştiğine dair güçlü tahminler ortaya koymaktadır.

Transphlebotomus Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen diğer bir alt cins olan *Transphlebotomus*’un vektöriyel durumları şüphelidir [61]. Türkiye’de *Phlebotomus anatolicus*, *Phlebotomus economidesi* ve *Phlebotomus killicki*’nin varlığı kesin olarak bilinmektedir [12]. Buna ek olarak Akdeniz ülkelerinden [62], Avrupa ülkelerinin en kuzeyine kadar [63-67] dünyada geniş bir alanda yayılım gösterdiği bilinen *Phlebotomus mascitti*’nin ise Türkiye’de kaydı olmasına rağmen varlığı şüphelidir [14, 54]. *Transphlebotomus* alt cinsi içerisinde yer alan tüm türler, barkod sonuçlarına göre birbirlerinden belirgin şekilde ayrılmıştır. *P. economidesi* ve *P. anatolicus* kardeş türler olarak görülürken; *P. killicki* onlardan ayrılarak farklı bir grup altında toplanmıştır. Bunun yanı sıra *cacophony* geni tüm türleri ayırmada oldukça başarılı iken; söz konusu genlere ait sonuçlarda *P. killicki* ve *P. economidesi* kardeş tür olarak gruplanırken *P. anatolicus*’un onlardan ayrıldığı görülmüştür.

Sergentomyia Alt Cinsine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Sergentomyia alt cinsi içerisinde yer alan türlerin sürüngen leishmaniasis'ini taşıdığına dair kayıtlar bulunmakla birlikte, insanlar için patojenik olup olmadığına dair belirsizlikler mevcuttur [68]. Türkiye'de *Sergentomyia antennata*, *Sergentomyia dentata*, *Sergentomyia minuta* ve *Sergentomyia theodori* olmak üzere dört türün varlığı bilinmektedir [56, 57]. Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] yaptığı çalışmada, *Sergentomyia* alt cinsine ait morfolojik olarak teşhisi gerçekleştirilen *S. dentata* ve *S. minuta* türleri kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada, *S. dentata*'ya ait örneklerin Akdeniz Bölgesi'nin batısında ve güneyinde olmak üzere Türkiye'de iki ayrı gruba ayrıldığı ortaya koyulmuştur. Tez çalışması kapsamında yalnızca *cacophony* geni başarılı şekilde elde edilebilen *S. dentata* örnekleri, tek bir takson olarak gruplanmıştır. ML filogenetik ağacında herhangi bir ayırım gözlenmediği gibi, genetik uzaklık hesaplamalarından elde edilen değer de desteklediği şekilde tür içerisinde herhangi bir ayırım gözlenmemiştir. Örneklerin toplandıkları populasyonların neredeyse hepsi arasında paylaşılan haplotiplerin varlığı (*dentata_cac_1*, 2 ve 3) bu durumu destekleyen başka bir kanıt ortaya koymuştur. Sonuçların hepsi birlikte değerlendirildiğinde populasyonlar arasında gen akışının aktif şekilde gerçekleştiği, ancak maternal kalıtılan *cox1* geni dikkate alındığında *S. dentata*'nın yayılım gösterdiği bölgenin kendi içerisinde iki gruba ayrılarak grupların kendi arasında daha aktif bir gen alış-verişinin gerçekleştiği düşünülmektedir. Ancak bu durumun, henüz tür düzeyinde bir farklılaşmaya sebep olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca mitokondriyal genomda mutasyon hızının daha yüksek olması ile [55], örneklerin *cox1* genine göre böyle bir ayırım ortaya koyarken, nükleer gen bölgesinde henüz bir farklılaşmanın ortaya çıkmadığı düşünülmektedir.

Türkiye'de bulunan ve *Sergentomyia* alt cinsi içerisinde yer alan diğer tür olan *S. minuta*'nın, yalnızca Akdeniz Bölgesi'nden toplanan örnekleri hem barkod hem de tez çalışmasına dahil edilmiştir. *S. minuta* içerisinde morfolojik ve moleküler anlamda ciddi farklılıklar bulunmaktadır [12]. Depaquit ve arkadaşlarının [69]

yaptığı çalışmada, 10 farklı ülkeden örneklenen *S. minuta* bireyleri *cytochrome b* ve *cytochrome C oxidase I* mitokondriyal gen bölgeleri bakımından değerlendirilmiş, sonuçta dört farklı grubun varlığını ortaya koymuştur. Türkiye’de ise Erişöz Kasap ve arkadaşlarının [12] *cox1* geni ile yaptığı çalışmada, herhangi bir coğrafi koşula bağlı olmaksızın önemli genetik uzaklık değerleri ile ayrılan üç farklı *S. minuta* grubu tespit edilmiştir. Bu nedenle söz konusu türün altında yer alan farklı alt grupların olup olmadığı tartışmalı bir konu olmakla beraber, *S. minuta*’nın taksonomik durumu henüz net olarak bilinmemektedir. *Cacophony* sonuçları değerlendirildiğinde ise, Antalya ve Mersin’den bazı haplotipler (*minuta_cac_3*, 11 ve 12) ayrı bir grup oluşturmuş, Antalya ve Mersin’in diğer bütün haplotiplerinin de dahil olduğu kalan bütün *S. minuta* haplotipleri ikinci bir grup altında toplanmıştır. *Period* geninde ise Antalya’dan örneklenen yalnızca *minuta_per_6* haplotipi diğer bütün haplotiplerden ayrılmıştır (*period* genine ait haplotip, *minuta_cac_3* ve 11 haplotipini gösteren aynı örneği ifade etmektedir). İki gene ait tür içi genetik uzaklık değerleri ise, *S. minuta* bireylerinin içerisinde anlamlı bir ayırım olmadığını ifade etmiştir. Bu doğrultuda, *S. dentata* için yapılan yorumun aynısı *S. minuta* türü için de mantıklı görünmektedir: Türkiye’de *S. minuta* içerisinde türleşme anlamında herhangi bir ayırım görülmemesinin, bazı populasyonlar arasında gen alış-verişinin daha aktif şekilde gerçekleştiğinden bahsedilebilmektedir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde görülmüştür ki, kur davranışı ile yakından ilişkili olan *cacophony* ve *period* genlerinin kum sineği taksonomisindeki yeri oldukça önemlidir. Yeni Dünya’da bulunan ve Amerika’da leishmaniasis’in en önemli vektörü olan *Lutzomyia* alt cinsine ait birçok farklı türde yapılan çalışmalar *cacophony* ve *period* gen bölgelerinin tür komplekslerinin üyelerini tanımlamada, olası bir hibritleşme durumunu ortaya koymada ve türleri birbirinden ayırmada güçlü birer moleküler belirteç olduğunu ortaya koymuştur [33, 36, 70]. Literatürdeki çalışmalara dayanılarak, tez kapsamında bu iki genin Türkiye’deki türleri birbirinden ayırmada ve tür komplekslerini aydınlatmadaki başarısı değerlendirilmiştir. *Cacophony* geninin türler arasında oldukça varyatif bir intron bölgesine sahip olması sonucu, tüm türler için ayrı bir *cacophony* örüntüsü olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle türler birbirlerinden intron bölgelerine bakılarak

(yaklaşık 80 bç ile) ayrılabilir. Bu özelliği ile birlikte *cacophony* geni, yeni bir tanımlayıcı bölge olma özelliği göstermektedir. Ancak söz konusu gende oldukça sık rastlanan heterozigot indel durumu, ayrı bir basamak olan klonlamayı gerektirmektedir. Diğer bir gen olan *period* ise, türleri ayırmada *cacophony* kadar başarılı olmakla beraber, türe özgü optimizasyon çalışmaları gerektirmektedir. Türkiye’de yayılım gösterdiği bilinen ve analize dahil edilen türlerin, söz konusu gen bölgeleri kullanılarak ayrımlarının gerçekleştirildiği açıkça görülmüştür. Kullanılan her iki gene ait sonuçlar ve barkod sonuçları [12] Çizelge 4.1.’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Cacophony*, *period* ve *cox1* genlerine ait özet sonuç tablosu

ALT CİNS	TÜR	<i>Cacophony</i>	<i>Period</i>	<i>Cox1</i>
<i>Phlebotomus</i>	<i>P. papatasi</i>	X*	X*	✓
<i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. alexandri</i>	✓	✓	✓
	<i>P. caucasicus</i>	✓	✓	✓
	<i>P. jacusieli</i>	✓	✓	✓
	<i>P. sergenti</i> s.l.	✓	✓	✓
<i>Larrousius</i>	<i>P. kandelakii</i> s.l.	✓	X	✓
	<i>P. major</i> s.l.	✓	X	✓
	<i>P. perfiliewi</i> s.l.	✓	✓	✓
	<i>P. tobbi</i>	✓	✓	✓
<i>Adlerius</i>	<i>P. balcanicus</i>	✓	X	✓
	<i>P. brevis</i>	✓	X	✓
	<i>P. halepensis</i>	✓	✓	✓
	<i>P. kyreniae</i>	✓	X	✓
	<i>P. simici</i>	✓	X**	✓
<i>Transphlebotomus</i>	<i>P. anatolicus</i>	✓	X	✓
	<i>P. economidesi</i>	✓	X	✓
	<i>P. killicki</i>	✓	X	✓
<i>Sergentomyia</i>	<i>S. dentata</i>	✓	X	✓
	<i>S. minuta</i>	✓	✓	✓
✓ Amplifikasyonu başarılı olan türleri göstermektedir.				
X Amplifikasyonu başarısız olan türleri göstermektedir.				
X* Amplifikasyonu başarılı olan; ancak heterozigot indel bulunması nedeni ile gen dizisine ulaşılamayan türleri göstermektedir.				
X** Amplifikasyonu tek örnek için başarılı olan türleri göstermektedir.				

Kur davranışını kontrol eden *cacophony* ve *period* genlerinin, türe özgü kur şarkısı oluşturmada etkili oldukları bilinmektedir. Türkiye'den örneklenen 16 farklı tür/tür kompleksi için değerlendirilen söz konusu bu iki genin, tür içinde genetik uzaklık değerlerinin %0 ile %1 arasında değiştiği gözlenmiştir. Farklı türler ya da tür kompleksine ait üyeler arasında ise bu değerlerin %1 ve üzerinde olduğu belirlenmiştir. Çalışılan bütün alt cinsler kendi içlerinde değerlendirildiğinde *cacophony* bakımından genetik uzaklık değerleri *Paraphlebotomus* alt cinsi için %1.34-%14.36, *Larroussius* alt cinsi için %4.23-%10.34, *Adlerius* alt cinsi için %0.93-%31.86, *Transphlebotomus* alt cinsi için %5.15-%7.55, *Sergentomyia* alt cinsi için ise %18.00 olarak bulunmuştur. *Period* bakımından genetik uzaklıklar ise *Paraphlebotomus* alt cinsi için %1.94-%12.77, *Larroussius* alt cinsi için %6.00 ve *Adlerius* alt cinsi için %7.00 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin alt cinsler içerisinde bulunan tür ve tür komplekslerinin üyelerini ayırmada kullanılabilecek moleküler belirteçler olduğu düşünülmektedir.

Söz konusu genlerde meydana gelen varyasyonlar sonucu, kum sineklerinin türe özgü kur davranışının değişmesi ve tez kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda lokalitelerin coğrafi orijininden bağımsız olarak türlerin kendi içlerindeki genetik uzaklığın %0-%1 arasında değişmesi nedeni ile, her iki gen de kum sineği taksonomisinde önemli moleküler belirteçler olarak değerlendirilmiştir. Son olarak söz konusu gen bölgelerinde meydana gelen değişimlerin kur davranışını değiştirmesi, buna bağlı olarak türün eşeylerinin birbirini tanıyamaması ile ortaya çıkan muhtemel üreme izolasyonu, gen bölgelerinde görülen anlamlı değişimin türleşme yolundaki önemini vurgulamaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] R. Killick-Kendrick, The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies, Clinics in Dermatology, 17 (1999) 279-289.
- [2] Y. Ozbel, The Infections Transmitted by Sand Flies in Turkey, Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 60 (2013) 225-228.
- [3] B. Alexander, Sampling Methods for Phlebotomine Sandflies, Medical and Veterinary Entomology, 14 (2000) 109-122.
- [4] M. Maroli, M. Feliciangeli, L. Bichaud, R. Charrel, L. Gradoni, Phlebotomine Sandflies and The Spreading of Leishmaniasis and Other Diseases of Public Health Concern, Medical and Veterinary Entomology, 27 (2013) 123-147.
- [5] ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control, <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies> (Erişim tarihi: 12 Eylül 2019).
- [6] L. Orshan, S. Elbaz, Y. Ben-Ari, F. Akad, O. Afik, I. Ben-Avi, D. Dias, D. Ish-Shalom, L. Studentsky, I. Zonstein, Distribution and Dispersal of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in A Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Focus, the Northern Negev, Israel, PLoS Neglected Tropical Diseases, 10 (2016) e0004819.
- [7] P.D. Ready, Biology of Phlebotomine Sand Flies As Vectors of Disease Agents, Annual Review of Entomology, 58 (2013) 227-250.
- [8] W.H.O.-Leishmaniasis, World Health Organization Leishmaniasis, <https://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Erişim tarihi: 3 Ekim 2019).
- [9] S.O. Toz, A. Nasereddin, Y. Ozbel, H. Ertabaklar, G. Culha, N. Sevil, M. Ziya Alkan, C.L. Jaffe, Leishmaniasis in Turkey: Molecular Characterization of Leishmania from Human and Canine Clinical Samples, Tropical Medicine & International Health, 14 (2009) 1401-1406.
- [10] M. Svobodová, B. Alten, L. Zídková, V. Dvořák, J. Hlavačková, J. Myšková, V. Šeblová, O.E. Kasap, A. Belen, J. Votýpka, Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* Transmitted by *Phlebotomus tobbi*, International Journal for Parasitology, 39 (2009) 251-256.
- [11] Y. Ozbel, The Infections Transmitted by Sand Flies in Turkey, Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 60 (2013) 225-228.
- [12] O. Erisoz Kasap, Y.M. Linton, M. Karakus, Y. Ozbel, B. Alten, Revision of The Species Composition and Distribution of Turkish Sand Flies Using DNA Barcodes, Parasit Vectors, 12 (2019) 410.

- [13] D. Lewis, D. Young, G. Fairchild, D. Minter, Proposals for A Stable Classification of The Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae), *Systematic Entomology*, 2 (1977) 319-332.
- [14] P. Volf, Y. Ozbel, F. Akkafa, M. Svobodova, J. Votýpka, K. Chang, Sand Flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: Relationship of *Phlebotomus sergenti* with The Epidemic of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis, *Journal of Medical Entomology*, 39 (2002) 12-15.
- [15] A.C. Bahia, N.F. Secundino, J.C. Miranda, D.B. Prates, A.P. Souza, F.F. Fernandes, A. Barral, P.F. Pimenta, Ultrastructural Comparison of External Morphology of Immature Stages of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Diptera: Psychodidae), Vectors of Cutaneous Leishmaniasis, by Scanning Electron Microscopy, *Journal of Medical Entomology*, 44 (2007) 903-914.
- [16] J.P. Dujardin, F. Le Pont, Geographic Variation of Metric Properties within The Neotropical Sandflies, *Infection, Genetics and Evolution*, 4 (2004) 353-359.
- [17] H. Yin, J.P. Mutebi, S. Marriott, G.C. Lanzaro, Metaphase Karyotypes and G-banding in Sandflies of The *Lutzomyia longipalpis* Complex, *Medical and Veterinary Entomology*, 13 (1999) 72-77.
- [18] J. Depaquit, Molecular Systematics Applied to Phlebotomine Sandflies: Review and Perspectives, *Infection, Genetics and Evolution*, 28 (2014) 744-756.
- [19] W. Marquardt, *Biology of Disease Vectors*, Second Edition, Elsevier, Chapter 12, 2004.
- [20] H. Johnson, The Identification of Female Sandflies of The Subgenus *Larroussius* by The Morphology of The Spermathecal Ducts, *Parassitologia*, 33 (1991) 1.
- [21] D. Lewis, R. Lane, A taxonomic review of *Phlebotomus (Idiophlebotomus)* (Psychodidae), *Systematic Entomology*, 1 (1976) 53-60.
- [22] J. Depaquit, A. Bounamous, M. Akhouni, D. Augot, F. Sauvage, V. Dvorak, A. Chaibullinova, B. Pesson, P. Volf, N. Léger, A Taxonomic Study of *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* s.l., *Infection, Genetics and Evolution*, 20 (2013) 500-508.
- [23] O. Erisoz Kasap, Türkiye’de Yayılım Gösteren *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 ve *Phlebotomus syriacus* Adler ve Theodor, 1931 (Diptera: Psychodidae) Türlerinin Taksonomik Durumunun Belirlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- [24] O.E. Kasap, J. Votýpka, B. Alten, The Distribution of The *Phlebotomus major* Complex (Diptera: Psychodidae) in Turkey, *Acta Tropica*, 127 (2013) 204-211.

- [25] I. Abbasi, R. Cunio, A. Warburg, Identification of Blood Meals Imbided by Phlebotomine Sand Flies Using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9 (2009) 79-86.
- [26] C.M. Flanley, M. Ramalho-Ortigao, I.V. Coutinho-Abreu, R. Mukbel, H.A. Hanafi, S.S. El-Hossary, E.E.Y. Fawaz, D.F. Hoel, A.W. Bray, G. Stayback, D.A. Shoue, S. Kamhawi, M. Karakus, K. Jaouadi, M.R. Yaghoobie-Ershadi, A. Kruger, A. Amro, M.A. Kenawy, M.R. Dokhan, A. Warburg, O. Hamarsheh, M.A. McDowell, Population Genetics Analysis of *Phlebotomus papatasi* Sand Flies from Egypt and Jordan Based on Mitochondrial *Cytochrome b* Haplotypes, *Parasit Vectors*, 11 (2018) 214.
- [27] C. Simon, F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook, Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and A Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers, *Annals of The Entomological Society of America*, 87 (1994) 651-701.
- [28] L.G. Bauzer, N.A. Souza, R.D. Maingon, A.A. Peixoto, *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: A Complex or A Single Species? A Mini-Review, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (2007) 1-12.
- [29] R.F. Chapman, *The Insects: Structure and Function*, Fifth Edition, Cambridge University Press, Chapter 26, 1998.
- [30] P.J. Gullan, P.S. Cranston, *The Insects: An Outline of Entomology*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Chapter 5, 2014.
- [31] S. Oliveira, M. Bottecchia, L. Bauzer, N. Souza, R. Ward, C.P. Kyriacou, A.A. Peixoto, Courtship Song Genes and Speciation in Sand Flies, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (2001) 403-405.
- [32] A.A. Peixoto, C. Gomes, P. De Amoretty, R. Lins, A. Meireles-Filho, N. De Souza, C. Kyriacou, New Molecular Markers for Phlebotomine Sand Flies, *International Journal for Parasitology*, 31 (2001) 635-639.
- [33] R. Lins, S. Oliveira, N.d. Souza, R. De Queiroz, S. Justiniano, R. Ward, C. Kyriacou, A. Peixoto, Molecular Evolution of The *Cacophony* IVS6 Region in Sandflies, *Insect Molecular Biology*, 11 (2002) 117-122.
- [34] A.S. Araki, F.M. Vigoder, L.G. Bauzer, G.E. Ferreira, N.A. Souza, I.B. Araújo, J.G. Hamilton, R.P. Brazil, A.A. Peixoto, Molecular and Behavioral Differentiation Among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3 (2009) e365.
- [35] C.R.L. Costa, M.T. de Souza Freitas, C.A.S. Figueirêdo, N.C. Aragão, L.G. da Silva, C.B. Marcondes, R.V. Dias, T.C. Leal-Balbino, M.B.R. Souza, M. Ramalho-Ortigão, Genetic Structuring and Fixed Polymorphisms in The Gene *Period* Among Natural Populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil, *Parasites & Vectors*, 8 (2015) 193.

- [36] C. Mazzoni, C. Gomes, N. Souza, R. Queiroz, S. Justiniano, R. Ward, C. Kyriacou, A.A. Peixoto, Molecular Evolution of The *Period* Gene in Sandflies, *Journal of Molecular Evolution*, 55 (2002) 553-562.
- [37] M. Pentinsaari, H. Salmela, M. Mutanen, T. Roslin, Molecular Evolution of A Widely-Adopted Taxonomic Marker (*COI*) Across The Animal Tree of Life, *Scientific Reports*, 6 (2016) 35275.
- [38] P.D. Hebert, A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. Dewaard, Biological Identifications through DNA Barcodes, *Proceedings of The Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (2003) 313-321.
- [39] E. Dokianakis, N. Tsirigotakis, V. Christodoulou, N. Poulakakis, M. Antoniou, Identification of Wild-Caught Phlebotomine Sand Flies from Crete and Cyprus Using DNA Barcoding, *Parasites & Vectors*, 11 (2018) 94.
- [40] I. de Souza Pinto, B.D. das Chagas, A.A.F. Rodrigues, A.L. Ferreira, H.R. Rezende, R.V. Bruno, A. Falqueto, J.D. Andrade-Filho, E.A.B. Galati, P.H.F. Shimabukuro, DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil, *PloS One*, 10 (2015) e0140636.
- [41] M.M. Artemiev, A Revision of Sandflies of The Subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, *Phlebotomus*), *Zoologicheskii Zhurnal*, 59 (1980) 1177–1192.
- [42] E. Theodor O, Psychodidae — Phlebotominae. Die Fliegen der Palaearktischen Region (ed. by E. Lindner), Germany: Schweizerbart'sche, (1958) 1-55.
- [43] L. Bauzer, J. Gestó, N. Souza, R. Ward, J. Hamilton, C. Kyriacou, A.A. Peixoto, Molecular Divergence in The *Period* Gene Between Two Putative Sympatric Species of The *Lutzomyia longipalpis* Complex, *Molecular Biology and Evolution*, 19 (2002) 1624-1627.
- [44] O. Hamarsheh, W. Presber, Z. Abdeen, S. Sawalha, A. Al-Lahem, G. Schönian, Genetic Structure of Mediterranean Populations of The Sandfly *Phlebotomus papatasi* by Mitochondrial *Cytochrome b* Haplotype Analysis, *Medical and Veterinary Entomology*, 21 (2007) 270-277.
- [45] D.J. Lewis, A Taxonomic Review of The Genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae), *The Bulletin of The British Museum (Natural History) Entomology Series*, 45 (2) (1982) 121-209.
- [46] N. Galtier, B. Nabholz, S. Glemin, G.D. Hurst, Mitochondrial DNA As A Marker of Molecular Diversity: A Reappraisal, *Molecular Ecology*, 18 (2009) 4541-4550.
- [47] J. Depaquit, F. Randrianambinintsoa, K. Jaouadi, J. Payard, A. Bounamous, D. Augot, A. Krueger, C. Brengues, A. Couloux, V. Robert, Molecular and Morphological Systematics of The Sandfly *Sergentomyia (Sintonius) clydei*

Sinton, 1928 and Questions About Its Record in The Seychelles, *Infection, Genetics and Evolution*, 21 (2014) 41-53.

[48] J. Depaquit, E. Lienard, A. Verzeaux-Griffon, H. Ferté, A. Bounamous, J.-C. Gantier, H.A. Hanafi, R.L. Jacobson, M. Maroli, V. Moin-Vaziri, Molecular Homogeneity in Diverse Geographical Populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) Inferred from *ND4* mtDNA and *ITS2* rDNA: Epidemiological Consequences, *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (2008) 159-170.

[49] J. Depaquit, H. Ferté, N. Léger, F. Lefranc, C. Alves-Pires, H. Hanafi, M. Maroli, F. Morillas-Marquez, J.-A. Rioux, M. Svobodova, *ITS2* Sequences Heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): Possible Consequences in Their Ability to Transmit *Leishmania tropica*, *International Journal for Parasitology*, 32 (2002) 1123-1131.

[50] V. Moin-Vaziri, J. Depaquit, M.-R. Yaghoobi-Ershadi, M.-A. Oshaghi, P. Derakhshandeh-Peykar, H. Ferté, M. Kaltenbach, M.D. Bargues, N. Léger, A. Nadim, Intraspecific Variation within *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Psychodidae) Based on mtDNA Sequences in Islamic Republic of Iran, *Acta tropica*, 102 (2007) 29-37.

[51] E. Giorgobiani, P.G. Lawyer, G. Babuadze, N. Dolidze, R.C. Jochim, L. Tskhvaradze, K. Kikaleishvili, S. Kamhawi, Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as Vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6 (2012) e1609.

[52] B. Sari, M.E. Limoncu, I.C. Balcioglu, A. Aldemir, G.T. Tasci, Y. Kiliç, S. Toz, B. Demirci, S. Demir, O.E. Kasap, Seroepidemiological and Entomological Survey in A New Focus of Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Kars Province, Northeastern Turkey, *Veterinary Parasitology*, 209 (2015) 179-187.

[53] M. Yaman, B. Dik, An Inventory of The Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) Found in The Turkish Province of Konya, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100 (2006) 265-276.

[54] Y. Özbel, I.C. Balcioglu, M.K. Ölgen, F.M. Şimsek, S.Ö. Töz, H. Ertabaklar, S. Demir, M.Z. Alkan, Spatial Distribution of Phlebotomine Sand flies in The Aydin Mountains and Surroundings: The Main Focus of Cutaneous Leishmaniasis in Western Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 36 (2011) S99-S105.

[55] R. Allio, S. Donega, N. Galtier, B. Nabholz, Large Variation in The Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate Across Animals: Implications for Genetic Diversity and The Use of Mitochondrial DNA As a Molecular Marker, *Molecular Biology and Evolution*, 34 (2017) 2762-2772.

[56] F.M. Simsek, B. Alten, S.S. Caglar, Y. Ozbel, A.M. Aytekin, S. Kaynas, A. Belen, O.E. Kasap, M. Yaman, S. Rastgeldi, Distribution and Altitudinal Structuring of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Southern Anatolia, Turkey: Their Relation to Human Cutaneous Leishmaniasis, *Journal of*

Vector Ecology, 32 (2007) 269-279.

[57] Y. Özbel, M. Karakuş, S.K. Arserim, Ş.O. Kalkan, S. Töz, Molecular Detection and Identification of Leishmania spp. in Naturally Infected *Phlebotomus tobbi* and *Sergentomyia dentata* in A Focus of Human and Canine Leishmaniasis in Western Turkey, *Acta tropica*, 155 (2016) 89-94.

[58] M. Akhoundi, P. Parvizi, A. Baghaei, J. Depaquit, The Subgenus *Adlerius* Nitzulescu (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) in Iran, *Acta Tropica*, 122 (2012) 7-15.

[59] S. Perrotey, I. Benabdennbi, N. Haddad, B. Pesson, N. Leger, Electrophoretic and Morphological Differentiation Between Two Sympatric Species of *Adlerius*: *Phlebotomus brevis* and *Phlebotomus simici* (Diptera: Psychodidae), *Journal of Medical Entomology*, 37 (2000) 289-294.

[60] J. Sadlova, M. Hajmova, P. Volf, *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* Vector Competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*, *Medical and Veterinary Entomology*, 17 (2003) 244-250.

[61] J. Depaquit, T.J. Naucke, C. Schmitt, H. Ferté, N. Léger, A Molecular Analysis of The Subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (Phlebotomus, Diptera, Psychodidae) Inferred from *ND4* mtDNA with New Northern Records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908, *Parasitology Research*, 95 (2005) 113-116.

[62] V. Ivović, M. Patakakis, Y. Tselentis, B. Chaniotis, Faunistic Study of Sandflies in Greece, *Medical and Veterinary Entomology*, 21 (2007) 121-124.

[63] C. Melaun, A. Krüger, A. Werblow, S. Klimpel, New Record of The Suspected Leishmaniasis Vector *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)—The Northernmost Phlebotomine Sandfly Occurrence in The Palearctic Region, *Parasitology Research*, 113 (2014) 2295-2301.

[64] T.J. Naucke, S. Lorentz, F. Rauchenwald, H. Aspöck, *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: First Record of The Occurrence of Sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), *Parasitology Research*, 109 (2011) 1161.

[65] V. Dvorak, K. Hlavackova, A. Kocisova, P. Volf, First Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* in Slovakia, *Parasite*, 23 (2016).

[66] S. Vaselek, N. Ayhan, G. Oguz, O.E. Kasap, S. Savić, T. Di Muccio, L. Gradoni, Y. Ozbel, B. Alten, D. Petrić, Sand fly and Leishmania spp. Survey in Vojvodina (Serbia): First Detection of *Leishmania infantum* DNA in Sand Flies and The First Record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908, *Parasites & Vectors*, 10 (2017) 444.

- [67] E. Praprotnik, S. Zupan, V. Ivočić, Morphological and Molecular Identification of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908 Populations From Slovenia, *Journal of Medical Entomology*, 56 (2018) 565-568.
- [68] J. Sadlova, V. Dvorak, V. Seblova, A. Warburg, J. Votypka, P. Volf, *Sergentomyia schwetzi* is not A Competent Vector for *Leishmania donovani* and Other Leishmania Species Pathogenic to Humans, *Parasites & Vectors*, 6 (2013) 186.
- [69] J. Depaquit, L. Hadj-Henni, A. Bounamous, S. Strutz, S. Boussaa, F. Morillas-Marquez, B. Pesson, M. Gállego, J. Delécolle, M. Afonso, Mitochondrial DNA Intraspecific Variability in *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae), *Journal of Medical Entomology*, 52 (2015) 819-828.
- [70] L. Bauzer, N. Souza, R. Ward, C. Kyriacou, A. Peixoto, The Period Gene and Genetic Differentiation Between Three Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis*, *Insect Molecular Biology*, 11 (2002) 315-323.