

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
2017-YL-034

**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN  
ANOPHELES TÜRLERİNİN (DIPTERA:  
CULICIDAE) MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER  
SİSTEMATIĞI**

**Çiler KÖŞLÜOĞLU**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK**

**AYDIN**



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Çiler Köşlüoğlu tarafından hazırlana Türkiye’de yayılış gösteren *Anopheles* türlerinin (Diptera: Culicidae) Morfolojik ve Moleküler Sistematığı başlıklı tez, 04.08.2017 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR	Hacettepe Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN	Adnan Menderes Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla .....(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../2017

Çiler KÖŞLÜOĞLU



## ÖZET

# TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN *ANOPHELES* TÜRLERİNİN (DİPTERA: CULİCİDAE) MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Çiler KÖŞLÜOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK  
2017, 73 sayfa

Sıtma, dünya çapında yıllardır etkili olan ve günümüzde de binlerce insanın ölümüne neden olan en önemli vektör kökenli hastalıktır. İnsan sıtmasının vektörleri *Anopheles* cinsinde yer alan sivrisinek türleridir. Bu nedenle, *Anopheles* türü sivrisinekler, pek çok ülkede sivrisinekler için sürdürülen kontrol çalışmalarının ilk hedefi olmuşlardır. Sıtma ve sıtma vektörleri mücadelesinde doğru hedef türün belirlenmesi önemli olduğundan, *Anopheles* sistematigi çalışmaları da hızla artmıştır. Tarihsel süreç içerisinde birçok ülkede zamanla değişen ve gelişen pek çok teknik bu amaç doğrultusunda kullanılarak, hem *Anopheles* türleri hem de sıtma vektörlerinin belirlenmesi için önemli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmada da, ülkemizde bulunan *Anopheles* türlerinin hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikli olarak, *Anopheles* türlerine ait larva ve ergin örnekleri ülkemizin farklı bölgelerinden çeşitli entomolojik yöntemler kullanılarak örneklenmiş ve laboratuvar ortamında morfolojik incelemeleri yapılmıştır. Sonraki aşamada, hem morfolojik karakterlerin yeterli olmadığı sistematik sorunlu taksonlarda hem de diğer türlerde moleküler teşhis yöntemlerinden yararlanılarak tür teşhisleri doğrulanmıştır. Moleküler tür teşhislerinde rDNA ITS2 bölgesi ve mtDNA COI gen bölgesi verilerinden yararlanılmış ve morfolojik tür teşhislerinin güvenilirliği moleküler verilerle test edilmiştir. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalara ait rDNA ITS2 bölgesi ve mtDNA COI gen bölgesi verileriyle bu çalışmadan elde edilen veriler karşılaştırılarak tür teşhisleri doğrulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Anopheles*, COI, ITS2, Morfoloji, Moleküler sistematik.



## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR SYSTEMATICS OF *ANOPHELES* SPECIES (DIPTERA: CULICIDAE) DISTRIBUTED IN TURKEY

Çiler KÖŞLÜOĞLU

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK

2017, 73 pages

Malaria, which has been existed for many years around the world and is still causing the death of thousands of people, is the most important vector-borne disease. Human malaria vectors are found in the *Anopheles* genus of the mosquitoes. Therefore, in many countries the *Anopheles* species has been the primary target for the mosquitoes control efforts. Since the correct determination of the target species is important for the control of malaria and malaria vectors, studies of the *Anopheles* systematics have increased rapidly. Numerous techniques, which have been evolved in many countries overtime, used for this purpose and serious research was done for the determination of both *Anopheles* species and malaria vectors. The aim of this study is the identification of the *Anopheles* species in our country using both morphological and molecular methods. For this purpose, initially, larvae and adult samples of the *Anopheles* species from different regions of our country were collected by using the entomological methods and morphological examinations were performed under laboratory conditions. Then, molecular identification methods were used for species verification on the systematically problematic taxa with insufficient morphological characters as well as on the other species. rDNA ITS2 region and mtDNA COI gene sequence data were used for molecular identification of the species and, the reliability of the morphological species identification was tested using molecular data. Species identification were verified by comparing the results of this study and the data of rDNA ITS2 region and mtDNA COI gene sequence studies performed in different countries.

**Key Words:** *Anopheles*, COI, ITS2, Morphology, Molecular systematics.



## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince destek ve önerileriyle yol gösterici olan danışman hocam Prof. Dr. Fatih Mehmet ŞİMŞEK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımda kullandığım moleküler teknikler konusunda bilgileriyle beni aydınlatan Prof. Dr. Celal ÜLGER' e teşekkür ederim.

Tez jürimde yer alıp tezime katkılarda bulunan Prof. Dr. Selim Sualp ÇAĞLAR ve Prof. Dr. Oğuz TÜRKOZAN'a, laboratuvar çalışmalarım ve istatistiksel analizlerimde yardımcı olan Arş. Gör. Sare İlknur YAVAŞOĞLU, Arş. Gör. Fatma BURSALI ve Doç. Dr. Can YILMAZ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlıklarıyla bana her zaman güç veren ve büyük fedakarlıkla desteklerini esirgemeyen annem Ayşe KÖŞLÜOĞLU'na, babam Fikret KÖŞLÜOĞLU'na ve ağabeylerim Raşit KÖŞLÜOĞLU ve Çınar KÖŞLÜOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi kaynak sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne (Proje no: FEF-15004) teşekkür ederim.

Çiler KÖŞLÜOĞLU



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1. Türkiye Sivrisinek Faunası Araştırmaları ve <i>Anopheles</i> Türleri .....	4
2.2. Türkiye <i>Anopheles</i> Türlerinin Dağılımları ve Biyolojik Özellikleri.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	17
3.1. Alansal Çalışmalar .....	17
3.1.1. Larva Örneklemeleeri .....	18
3.1.2. Ergin Örneklemeleeri.....	18
3.2. Morfolojik Tür Teşhisi.....	19
3.3. Laboratuvar Çalışmaları .....	22
3.3.1. Örneklerden DNA İzolasyonu.....	22
3.3.2. ITS2 ve COI Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu.....	24
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.3.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	26
3.4. Veri Analizleri.....	27

3.4.1. mtDNA COI ve rDNA ITS2 Dizilerinin Hizalanması .....	27
3.4.2. mtDNA COI ve rDNA ITS2 Dizilerinin Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği. 27	
3.4.3. Populasyonlara Ait Uzaklığa Bağlı UPGMA Ağacının Oluşturulması.....	27
3.4.4. <i>Anopheles</i> Türleri için Haplotip Ağının Oluşturulması.....	28
4. BULGULAR .....	29
4.1. <i>Anopheles</i> Türleri ve Morfolojik Özelliklere Dayalı Teşhisleri .....	29
4.1.1. <i>Anopheles claviger</i> Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri .....	29
4.1.2. <i>Anopheles hyrcanus</i> Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri .....	31
4.1.3. <i>Anopheles plumbeus</i> Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri.....	34
4.1.4. <i>Anopheles superpictus</i> Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri .....	35
4.1.5. <i>Anopheles maculipennis</i> Kompleksi Türlerinin Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri.....	37
4.2. DNA İzolasyonu ve COI ve ITS2 Bölgesi Dizileri .....	41
4.3. <i>Anopheles</i> Türleri İçin Haplotip ( $H_d$ ), Nükleotit Çeşitliliği ( $\pi$ ) ve Nükleotit Farklılıklarının Ortalaması (K).....	42
4.4. <i>Anopheles</i> Türleri Arasında Genetik Uzaklık ve UPGMA Uzaklık Ağacı ...	43
4.5. <i>Anopheles</i> Türleri İçin Haplotip Ağacı.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
KAYNAKÇA .....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	72

## SİMGELER DİZİNİ

°C	: Derece santigrad
µl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
Π	: Nükleotid çeşitliliği
~	: Yaklaşık olarak
mL	: Mililitre
mA	: Mili amper
mg	: Miligram
hd	: Haplotip çeşitliliği
A	: Adenin
G	: Guanin
C	: Sitozin
T	: Timin
pH	: Power of hydrogen
Xg	: Gravity
K	: Nükleotid farklılıklarının ortalaması



## KISALTMALAR DİZİNİ

<i>An.</i>	: <i>Anopheles</i>
Bç	: Baz çifti
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
COI	: Sitokrom Oksidaz I
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	: Etilendaimin Tetra Asetik asit
ITS2	: Transkribe Edilebilen Ara Bölgeler
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum Klorür
mtDNA	: Mitokondrial DNA
rDNA	: Ribozomal DNA
NJ	: Neighbor joining
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TBE	: Tris-Borik Asit EDTA
UPGMA	: Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış İkili Grup Metodu



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Larva <i>Anopheles</i> örneklemeleri .....	18
Şekil 3.2. Ergin <i>Anopheles</i> örneklemeleri .....	19
Şekil 3.3. <i>Anopheles</i> ve <i>Culex</i> 4. evre larva teşhis karakterleri göstergesi .....	20
Şekil 3.4. Ergin <i>Anopheles</i> morfolojik teşhis karakterleri göstergesi .....	21
Şekil 4.1. <i>Anopheles claviger</i> 4. evre larvasında başa göre anten uzunluğu .....	29
Şekil 4.2. <i>Anopheles claviger</i> 4. evre larvasında 2-C ve 3-C setaları .....	30
Şekil 4.3. <i>Anopheles claviger</i> abdomen segment IV ve V antepalpat seta 2-IV ve 2-V .....	30
Şekil 4.4. <i>Anopheles claviger</i> dışısında scutum deseni ve interocular bölge seta demeti .....	31
Şekil 4.5. <i>Anopheles claviger</i> dışısında beneksiz kanat yapısı .....	31
Şekil 4.6. <i>Anopheles hyrcanus</i> 4. evre larvasında dallı büyük anten setası (1-A) .....	32
Şekil 4.7. <i>Anopheles hyrcanus</i> 4. evre larvasında setalar, 2-C, 3-C, 5-C - 7-C .....	32
Şekil 4.8. <i>Anopheles hyrcanus</i> proboscis ve palplerin yapısı .....	33
Şekil 4.9. <i>Anopheles hyrcanus</i> scutum yapısı ve bant desenleri .....	33
Şekil 4.10. <i>Anopheles hyrcanus</i> kanat beneklenmeleri ve tarsomer bantlanması .....	34
Şekil 4.11. <i>Anopheles plumbeus</i> ergin dışide thoraks, proboscis ve palpler .....	35
Şekil 4.12. <i>Anopheles superpictus</i> 4. evre larvasında 2-C ve 3-C setaları .....	35
Şekil 4.13. <i>Anopheles superpictus</i> larvasında abdomen II-VII'deki palmate setalar .....	36
Şekil 4.14. <i>Anopheles superpictus</i> ergin dışide thoraks, proboscis ve palpler .....	36
Şekil 4.15. <i>Anopheles superpictus</i> ergin dışide costa-subcostada beyaz bantlar .....	37
Şekil 4.16. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi 4. evre larvasında 2-C ve 3-C setalar .....	38

Şekil 4.17. <i>Anopheles maculipennis</i> kompleksi 4. evre larvasında 5-C-7-C setalar .....	38
Şekil 4.18. <i>Anopheles maculipennis</i> ergin dişilerinde proboscis ve palplar .....	39
Şekil 4.19. <i>Anopheles maculipennis</i> ergin dişilerinde scutum (a) ve kanat beneklenmesi (b).....	39
Şekil 4.20. <i>Anopheles sacharovi</i> yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı .....	40
Şekil 4.21. <i>Anopheles melanoon</i> yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı .....	40
Şekil 4.22. <i>Anopheles maculipennis</i> yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı...	41
Şekil 4.23. <i>Anopheles</i> Türlerine göre mtDNA COI geni haplotip frekanslarının Gamma <sub>ST</sub> ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı .....	45
Şekil 4.24. <i>Anopheles</i> Türlerine göre nDNA ITS2 geni haplotip frekanslarının Gamma <sub>ST</sub> ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı .....	46
Şekil 4.25. <i>Anopheles</i> Türlerinin COI gen bölgeleri için elde edilen NJ ağacı .....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Anopheles</i> populasyonları örnekleme bölgeleri ve yöntemleri .....	17
Çizelge 3.2. ITS2 ve COI gen bölgeleri için hazırlanan PZR reaksiyonu karışımı. .....	25
Çizelge 4.1. <i>Anopheles</i> türlerinin mtCOI gen bölgesi için tespit edilen haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ), nükleotid farklılıklarının ortalaması .....	43
Çizelge 4.2. COI geni verilerine göre <i>Anopheles</i> türlerinin ikili genetik uzaklık ( $F_{ST}$ ve $\gamma_{ST}$ ) değerleri.....	44



## 1. GİRİŞ

Sivrisinekler (Diptera: Culicidae), Anophelinae ve Culicinae alt familyalarını içermektedir. Dünya genelinde geçerli kabul edilen 3500 kadar türü bulunan önemli bir Diptera familyasıdır (Harbach ve Kitching, 2005). Çünkü bu türlerden yaklaşık 200 kadarı insanlar için tehlikeli hastalıkların vektörlüklerini yapmaktadır (Reinert, 2001). Vektörlükleriyle neden oldukları hastalıkların en yaygın ve en önemlileri, dünyanın pek çok bölgesinde etkili olan Sıtma, Deng humması, Sarıhumma, Ensefalitis, Batı Nil Ateşi, Filariasis gibi hastalıklardır (Lehane, 1991; Kettle, 1995; Beaty ve Marquart, 1996). Geçmişte ve günümüzde insan ölümlerine sebebiyet verme bakımından bu hastalıkların en etkili olanı ise sıtmadır. Sivrisineklerin vektörlüğünü yaptığı sıtma yüzünden dünyada her yıl 500 milyon kişi bu hastalıkla enfekte olmakta ve bunlardan 1 milyondan fazlası yaşamını yitirmektedir. Sıtma, *Anopheles* cinsinde yer alan bazı türlerinin *Plasmodium* türlerine vektörlük yapmaları sonucu ortaya çıkmaktadır (Martens ve Hall, 2000). *Anopheles* cinsi 500 kadar tür içermektedir ve bunların 70-80 kadarı insanlar için etkin sıtma vektörüdür (Harbach, 2004). Sıtma epidemiyolojilerine bakıldığında özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan insan toplulukları bu hastalıktan en çok etkilenenlerdir. Ülkemiz coğrafik konumu, ekolojik özellikleri, sosyo-ekonomik durumu nedeniyle sivrisinekler için uygun yaşam şartlarını ve ortamlarını sağlamaktadır. Ayrıca, ülkemiz, coğrafi komşularındaki sosyolojik, etnik, savaş gibi toplumsal gelişmeler nedeniyle yoğun olarak ortaya çıkan insan hareketliliklerine bağlı olarak sivrisineklerin vektörlüğünü yaptığı hastalıkların yayılabileceği ve frekanslarını arttırabileceği bir bölge konumundadır. Türkiye’de 1940 yılından 2009 yılına kadar olan dönemde sıtma en tehlikeli vektör kaynaklı halk sağlığı sorunu olmuştur. Uzun yıllar süren kimyasal ağırlıklı mücadele çalışmaları sonucunda vaka sayıları oldukça azalmış ve son zamanlarda az sayıda sıtma vakası sadece Güneydoğu Anadolu bölgesinden rapor edilmiştir (Doğan vd., 2010; Şimsek vd., 2010). Bununla birlikte özellikle de ülkemize sıtma endemik diğer bölgelerden (Suriye, Irak, Afganistan gibi) çok sayıda insanın gelip gitmesine bağlı olarak sıtma hastalığının yeniden artışa geçme olasılığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, özellikle de göçmen statüsündeki insanların düzenli olarak kontrol edilmesi önemli hâle gelmiştir. Diğer taraftan, sıtmanın epidemiyolojisini anlamak için bu hastalığın esas olarak dinamikleri üzerine de çalışılmalıdır (Rubio-Palis, 1994).

Vektörlerin vektörel kapasitelerinin saptanması endemik bölgelerdeki sıtma transmisyon oranlarının ölçülmesinde kullanılan en önemli yaklaşımlardan bir tanesidir (Lee vd., 2001). Bununla birlikte önemli diğer bir konu sıtma vektörü türlerinin doğru tür teşhisleriyle tanımlanmaları ve coğrafi dağılım alanlarının belirlenmesidir. Çünkü sivrisineklerde tür düzeyinde davranış ve ekoloji çok fazla değişkenlik göstermektedir (Jetten ve Takken, 1994). Bu durumda mücadele hedefi sıtma vektörü türe karşı sürdürülecek çalışmaların başarısını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, ülkemizdeki sıtma vakalarının azaltılması ya da önlenmesi çalışmalarında Türkiye'nin *Anopheles* faunasını belirlemek öncelikli bir konu olmuştur ve bu amaç doğrultusunda özellikle de ülkemizin sıtma endemik bölgelerinden toplanan/yakalanan *Anopheles* örneklerinin tür tanımları için morfolojik incelemeye dayalı birçok araştırma yapılmıştır (Parris, 1959; Postiglione vd., 1970; Postiglione vd., 1972; Kasap ve Kasap, 1983; Merdivenci, 1984; Alten vd., 2000; Simsek, 2006). Vektör kontrolü amacıyla *Anopheles* türleri üzerinde bir dizi diğer destekleyici çalışmalarda tür tanımlama çalışmalarına paralel olarak sürdürülmüştür. Bu kapsamda, vektör türlerde insektisit direnç seviyelerini belirleyen çalışmalar (Kasap vd., 1992, 2000; Luleyap vd., 2002; Alten vd., 2003), laboratuvar kolonilerinin oluşturulduğu çalışmalar (Kasap ve Kasap, 1983b; Simsek vd., 2005; Yurttaş ve Alten, 2006), ekolojik (Kasap, 1986; Simsek, 2006) ve etiyolojik (Demirhan ve Kasap, 1995; 1996) çalışmalar yapılmıştır. Ancak, morfolojik incelemeye dayalı yapılan çalışmalar ülkemiz *Anopheles* faunasını uzun yıllar kesin olarak ortaya koyamamıştır. Çünkü ülkemiz *Anopheles* türlerinden bazılarının sibling tür grubunda bulunmaktadır ve bu durum zamanla gelişen farklı tekniklerin tür tanımlamasında kullanılmasıyla anlaşılabilmiştir. Dolayısıyla sadece morfolojik karakterlere dayalı değerlendirmeler çalışılan bölgeye, örnek toplama şekline ve hatta araştırmacıya göre genellikle farklı sonuçları ortaya koymuştur. Bu nedenle, ülkemizin *Anopheles* faunasının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça önemli olmakla birlikte, uzun yıllar yeterli olamamış ve tür düzeyinde tartışmalar süregelmiştir. Son yıllarda ise moleküler tür teşhis yöntemlerindeki hızlı gelişmeler, ülkemizdeki çalışmaları da yönlendirmiş ve bu yöntemlere dayalı yapılan çalışmalar sonucunda Palearktık bölgede 11 sibling tür içeren *Maculipennis* kompleksinin ülkemizde *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. sacharovi*, *An. melanoon* türlerinin varlığını doğrulamıştır (Şimşek vd., 2011; Sevgili ve Şimşek, 2012). Bu çalışmalar *Anopheles* sistematğinde moleküler tekniklerin yararlı olacağını göstermiştir. Bununla birlikte, moleküler tekniklerin

her zaman uygulanmasının gerekli olup olmadığı, uygulamanın maliyeti ve teknik yeterliliğin uygun olması gibi nedenlerle morfolojik yöntemlere göre avantajlı olup olmadığı tartışma konusu olmuştur. Günümüzde ise hem morfolojik hem de moleküler tekniklerin birlikte kullanıldığı ve sistematik çözümlenmelerin her iki yöntemden elde edilen verilerle desteklendiği pek çok çalışmanın gerçekleştirildiğini görmekteyiz.

Bu kapsamda planlanan ve gerçekleştirilen bu Yüksek Lisans Tez çalışması kapsamında da ülkemizde bulunan *Anopheles* türlerinin hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikli olarak, *Anopheles* türlerine ait larva ve ergin örnekleri ülkemizin farklı bölgelerinden örneklenmiş ve laboratuvar ortamında morfolojik incelenmeleri yapılmıştır. Sonraki aşamada, hem morfolojik karakterlerin yeterli olmadığı sistematik sorunlu taksonlarda ve hem de diğer türlerde moleküler teşhis yöntemlerinden yararlanılarak tür teşhisleri doğrulanmıştır. Moleküler tür teşhislerinde rDNA (ribozomal DNA ) ITS2 (second internal transcribed spacer) gen bölgesi ve mtDNA (mitokondriyal DNA) COI (cytochrome c oxidase subunit 1) gen bölgeleri verilerinden yararlanılmış ve morfolojik tür teşhislerinin güvenilirliği moleküler verilerle test edilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Türkiye Sivrisinek Faunası Araştırmaları ve *Anopheles* Türleri

Ülkemizde sivrisinek türlerini belirlemek amacıyla yapılan araştırmalar 1920'li yıllarda başlamış ve 1930-1950 yıllarında yapılan araştırmalar ile sivrisinek faunası açısından belirli bir düzeye ulaşılmıştır. Özellikle de sıtma vektörü olmaları nedeniyle bu çalışmalarda daha çok *Anopheles* türleri üzerine yoğunlaşmıştır. Ülkemizde o yıllardaki yüksek sıtma insidansı göz önüne alındığında bu yaklaşım tarzı son derece yararlı olmuş ve sıtma sorununun çözümüne yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu dönemde, Akalın (1936) ve İrdem (1940, 1943)'in çalışmalarıyla *An. maculipennis* Meigen, 1818 kompleksine ait bazı türler de dâhil olmak üzere ülkemizde ilk kez tespit edilen 10 kadar sivrisinek türünün varlığı bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda, ülkemizin sivrisinek türlerinin belirlenmesine yönelik en kapsamlı bilgiler, Parrish (1959)'in 1958-1959 yıllarında yaptığı araştırma sonuçlarında verilmiştir ve Türkiye sivrisinek faunasının 7 cinse bağlı toplam 55 sivrisinek türünden oluştuğu ortaya konulmuştur. Sonraki yıllarda, Postiglione vd., (1973) yaptıkları çalışmada, ülkemizdeki *Anopheles* cinsi türlerinin dağılımını ve daha önce varlığı bildirilen *Anopheles* türlerinin sistematik geçerliliğini tartışmışlardır. Gerçekleştirilen bu çalışmalara paralel olarak sıtma mücadelesi çalışmaları da yoğun bir şekilde sürdürülmüş ve sıtma artışı kısmen kontrol altına alınmıştır. Buna bağlı olarak da sivrisinek sistematigi üzerine yapılan çalışmalar da belirgin olarak azalmıştır. Bu nedenle uzun bir süre, ülkemizin sivrisinek faunasının belirlenmesine yönelik araştırmalar, derlemeler (Erel, 1973; Kasap, 1979; Kasap vd., 1981; Merdivenci, 1984; Şahin, 1983,1984; Alptekin, 1991; Alptekin ve Kasap, 1997; Alten, 1993; Boşgelmez vd., 1994,1995; Aldemir, 1997; Şimşek, 1997, 2004a) yapılmış olmakla birlikte, bu çalışmalar genellikle küçük ölçekli bölgesel incelemeler ve daha önce yapılan çalışmaların bir değerlendirilmesi şeklinde ya da belirli türlerin populasyon özelliklerinin analizi biçiminde olmuştur. Bununla birlikte her yeni çalışma Türkiye sivrisinek faunasının tespitine ve hataların giderilmesine önemli katkılar sağlamıştır. Şahin (1983, 1984), Antalya ve çevresinde yaptığı araştırmalarda *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* ve *Culiseta* cinslerine ait 28 tür tespit etmiş ve *Aedes cretinus* Edward, 1921 türünü ülkemiz için yeni kayıt olarak vermiştir. Boşgelmez vd., (1994, 1995)'nin Muğla-Ortaca-Dalaman bölgelerinde ve Antalya çevresinde yapmış oldukları araştırmalarda *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* ve

*Culiseta* cinslerine ait 35 tür tespit edilmiştir. Alten ve Boşgelmez (1996, 1997)'in Muğla-Ortaca-Dalaman bölgelerindeki araştırmalarında, *Culex* cinsi incelenmiş ve 14 türün varlığı saptanmıştır. Bu kapsamda en son değerlendirme Ramsdale vd., (2001)'de yapılmış ve daha önce ülkemizin sivrisinek faunasını belirlemeye yönelik çalışmaların sonuçları tartışılmıştır. Bu çalışmada, *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia* ve *Uranotaenia* cinslerine ait 48 türün varlığı bildirilmiş olmakla birlikte, daha önceki çalışmalarda tespit edilen *An. melanoon*, *An. multicolor*, *An. sergentii*, *Aedes aegypti* ve *Lasiosiphon adairi* türlerinin şüpheli, hatalı ya da doğrulanmamış kayıtlar olduğunu ortaya koymuşlardır. Aldemir vd., (2009)'nin özellikle de yüksek irtifa sivrisinek türlerine yönelik olarak ülkemizin Kars-Iğdır bölgelerinde yapılan araştırmalarla, Türkiye sivrisinek tür listesine 5 tanesi *Ochlerotatus* cinsine, 1 tanesi de *Culiseta* cinsine ait olmak üzere 6 yeni sivrisinek türü kayıt edilmiştir. Ülkemizde 2000'li yılların başına kadar devam eden bu araştıma periyodunda Türkiye sivrisinek türlerinin tespiti ve dağılım alanlarının belirlenmesi çalışmalarında sadece morfolojik karakterlerden yararlanılmıştır. Morfoloji temelli bu çalışmalar soucunda ülkemizde sivrisinek tür sayısı 54 olarak kabul edilmiştir. Ancak, diğer ülkelerdeki sivrisinek sistematığı konusunda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, ülkemiz sivrisinek faunasında yer alan bazı türler için ve özellikle de bazı sibling tür gruplarında yer alan türler için sistematik sorunlar ve hatalı tanımlamalar yapılmış olabileceği anlaşılmıştır. Bu kapsamda yapılan ön değerlendirmeleri sonucunda da, sistematik sorunların Türkiye sivrisinek faunasında sadece *Anopheles* türleriyle ilgili olmayıp diğer tür, cins ve gruplarda da çeşitli tartışmalı durumların olabileceğine dair de bilgiler elde edilmiştir. Örneğin, ülkemizden daha önceki çalışmalara göre *Ochlerotatus caspius caspius* ve *Ochlerotatus caspius dorsalis* olarak iki alt tür şeklinde bildirilen sivrisinekler sonraki zamanlarda *Ochlerotatus caspius* ve *Ochlerotatus dorsalis* olarak iki ayrı tür olarak kabul edilmiş ve her iki türün de ülkemizde varlığı bildirilmiştir. Ancak, bugün pek çok lokalitede yapılan çalışmalarda *Ochlerotatus caspius* sıklıkla örneklenirken, *Ochlerotatus dorsalis* türü örneklenememektedir ve türün varlığına dair tartışmalar artmaktadır. Diğer bir sorunlu olabileceği düşünülen tür *Aedes cretinus* türüdür. Patsoula vd., (2006), Yunanistan'da *Aedes cretinus* türünün sistematik durumunu incelemişler ve ITS2 ve COI ile yapılan moleküler çalışmaların sonuçlarıyla *Aedes cretinus* olduğunu düşündükleri bazı örneklerin aslında *Aedes albopictus* olduğunu bulmuşlardır. Bu iki türün morfolojik olarak ayırt edilebilmekle birlikte benzerliklerinin de fazla

olması nedeniyle hatalar yapılabildiğinden, ülkemizde yeni kayıt olarak ilk kez 1984 yılında bildirilen (Şahin, 1984) *Aedes cretinus* türünün de yeniden örnekler bulunarak değerlendirilmesinin gerekliliği anlaşılmıştır. Benzer şekilde *Anopheles* türleriyle de ilgili olarak çeşitli sistematik sorunlar olabileceği anlaşılmıştır. Özellikle de, *An. hyrcanus* ve *An. maculipennis* tür grupları bu kapsamda üzerinde çok durulan gruplar olmuştur. Kanat desen özelliklerinin benzerliği nedeniyle yine sıklıkla hatalı teşhisleri yapılan iki tür *An. superpictus* ve *An. pulcherrimus* türleri olmuştur (Postiglione vd., 1973). Her iki türün de Türkiye'de sıtma vektörlüğünde etkili oldukları kabul edilmesine rağmen morfolojik özelliklerine göre yapılan geçmiş yıllardaki tanımlamalarında hatalar yapılmıştır. Özellikle de *Anopheles* türleriyle ilgili yapılan hatalar, uzun yıllar çözümsüz kalmış ve tartışmalar devam etmiştir. Oysa sıtmanın tehlikeli bir sorun olduğu ülkemizde *Anopheles* türlerin hangi bölgelerimizde bulunduğu bilinmesi (birçoğu sıtma vektörüdür) oldukça önemlidir. Çünkü simpatrik sibling türler olsalar da, beslenme davranışları, sıtma parazitine karşı duyarlılıkları ve buna bağlı olarak da vektör kapasiteleri oldukça farklılık göstermektedir (Jetten ve Takken, 1994). Benzer sorunlar diğer ülkelerde de yaşanmış olmakla birlikte, yeni tekniklerin kullanıldığı çalışmaların yapılmasıyla bu sorunlar hızla çözülmeye başlamıştır. Bu kapsamda, örnek teşkil eden ilk çalışmalar, Hyrcanus ve Maculipennis grupları için yapılan çalışmalardır. Hyrcanus grubunda yapılan çalışmalarla morfolojik olarak çok farklı karakter sergilemeyen 29 tür (çoğunluğu sıtma vektörü) tespit edilmiştir. Tür grubunun *An. hyrcanus* Pallas, *An. pseudopictus* ve *An. chodukini* Martinii türleri Batı Paleartik Bölge'de, diğerleri Doğu Paleartik ve Oriental Bölge'de bulunmaktadır (Harbach, 2004; Rueda, 2005). Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar sonucunda da gruba dâhil dört türün İran'da, beş türün de Japonya'da bulunduğu saptanmıştır. Ülkemizde ise gruba ait hangi türlerin bulunduğu ya da bulunmadığı bilinmemektedir ve farklı morfolojik formları (farklı türler olmaları mümkün) içeren *An. 'hyrcanus'* şeklinde kullanım yaygındır (Ramsdale, 2001; Ramsdale vd., 2001). Benzer şekilde Türkiye'deki *An. maculipennis* kompleksine ait taksonomik durum da uzun yıllar morfolojik karakterlere dayanan sistematik çalışmalarla çözümlenememiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *Anopheles* örnekleri yumurta morfolojisi ve sitogenetik özelliklerine bağlı olarak incelenmiştir (Postiglione vd., 1970). Bu çalışmanın sonucunda daha önceden *An. messeae* olarak tanımlanan türün aslında *An. subalpinus* olduğu kaydedilmiştir. Daha sonraki çalışmalar da ise *An. subalpinus* türünün yumurta morfolojisi bakımından benzerliklere dayalı olarak *An. melanoon* türünün bir alt türü olduğu

kabul edilmiştir (Kasap ve Kasap, 1983a; Postiglione vd., 1973; Ramsdale ve Haas, 1978).

Türler arasındaki biyolojik farklılıklar, habitat seçimleri, beslenme tercihleri ve vektörlük kapasitelerindeki farklılıklardan dolayı *An. maculipennis* 1930'lu yıllarda heterojen bir takson olarak kabul edilmiştir (Hackett, 1934). Bu farklılıklar göz önüne alınarak türler birbirlerinden ayırt edilmeye çalışılmıştır. Falleroni (1926), *Maculipennis* kompleks türlerini laboratuvar kültürü olarak yetiştirmiş ve populasyonların yumurtalarındaki belirgin koryon desenlerinden yararlanarak taksonların farklı biyolojilerini ve farklı morfolojilerini tanımlamıştır. Martini vd., (1931), Van Thiel (1933) ve Hackett ve Missiroli (1935) *Maculipennis* kompleksi hakkında daha fazla özellik tanımlamışlar ve 1930'ların sonunda (Bates, 1940) *An. maculipennis* kompleksinin türleri ayırt edilmiştir. Çalışmalarda üreme ve beslenme davranışlarının karşılaştırılmaları kullanılmış, farklı türlerin sitotaksonomik methodlar veya enzim elektroforezi ile farklılıkları tanımlanmıştır (Stegnii ve Kabanova, 1976; Bullini ve Coluzzi, 1978; Suzzoni-Blatger vd., 1990). Sibling türler arasında bağlantı kurularak ergin ve dişiler arasındaki bazı morfolojik farklılıklar bulunmuştur (White, 1978). Dişiler, kanatları üstündeki belirli bölgelerde renksizlik olmasıyla, erkekler de dış taraftaki claspette lobunun üzerindeki dikeninin uzunluğu ile ayırt edilebilmişlerdir. Larvalar ise abdominal segment IV ve V'in üzerindeki 4. antepalpat setanın baştanbaşa bir kol oluşturmasıyla ayırt edilebilmiştir. Ancak, zamanla incelenen örnek sayısının artmasına paralel bu karakterlerin de çok değişken olduğu ve tür ayırımında güvenilir olmadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla, *Maculipennis* kompleksi türlerinin ayırımında morfolojik teşhisler uzun yıllar yumurta karakterliğine oldukça bağımlı kalmıştır. Ülkemizde *An. maculipennis* kompleksi ile ilgili yumurta morfolojisi kullanılarak yapılan çalışmalarda, komplekse ait *An. maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. subalpinus*, *An. melanoon* ve *An. messeae* türlerinin varlığı bildirilmiştir (Parris, 1959; Merdivenci, 1984). Alten vd., (2000)'nin Türkiye'nin sıtma vektörleri üzerine yaptıkları analizlerde de *An. maculipennis* s.s., *An. sacharovi* ve *An. subalpinus* türleri *Maculipennis* kompleksi türleri olarak verilmiştir. Ramsdale vd., (2001) ise komplekse ait yalnızca *Anopheles maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. subalpinus* türlerinin ülkemizde bulunduğunu ve *An. subalpinus*'un *An. melanoon*'un bir alt türü olduğu görüşüne şüpheyle yaklaşmış ve *An. subalpinus* yeni farklı bir tür olarak kabul edilmiştir. Benzer şekilde, son yıllarda geliştirilen moleküler tekniklerin uygulanmadığı

dönemlerde bu sibling tür grubunun taksonomik olarak tanımlanması hemen hemen bütün ülkelerde önemli bir sorun olmuştur. Çünkü yumurta, larva ve erginler morfolojik özelliklerine göre tanımlanması oldukça zordur hatta bazı durumlarda, hemen hemen imkânsızdır (Linton vd., 2002c; Nicolescu vd., 2004; Patsoula vd., 2007). Sorunun çözümünde, hibritleşme, kromozomal ve isoenzim analizleri gibi değişik yöntemler geliştirilmesine karşılık, türlerin ayırımında yumurta morfolojisi standart bir yöntem olarak kalmıştır. Ancak, yumurtalarda yüzgeçlerin bulunup bulunmaması gibi morfolojide ortaya çıkabilen mevsimsel farklılıklar, yumurta yüzey desenlerinde ortaya çıkabilen tür içi varyasyonlar ve simpatrik türlerdeki desen benzerlikleri gibi nedenlerle bu yöntem de her zaman güvenilir sonuçlar verememiştir (Marinucci vd., 1999; Linton vd., 2002a; Sedaghat vd., 2003). Çünkü ağırlıklı olarak yumurta morfolojisine dayandırılarak yapılan bu tür tanımlamaları, yumurta morfolojisinin politipik bir karakter olmasının anlaşılmasıyla güvenilir bulunmamaktadır.

Son yıllarda geliştirilen moleküler teknikler ile tür teşhislerine yönelik sistematik çalışmalarda, türlerin zoocoğrafik dağılımlarına yönelik araştırmalarda ve populasyon genetiği analizlerinde oldukça hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu yenilikler, bilgisayar programlarının kullanımı ile daha etkili hale gelmiş ve biyolojik hiyerarşi hakkında yararlı olmuştur (Jarne vd. 1996). Bu gelişmeler doğal olarak sivrisinek sistematigi çalışmalarına da önemli katkı sağlamıştır. Örneğin, sibling tür kompleksleri için bütün türlerde orta ve yüksek değişkenliği olan genom bölgelerinin dizi analizlerinin yapıldığı DNA çalışmalarıyla sibling türler arasındaki moleküler farklılıkların saptanabilmesi mümkün olmuştur ve bu çalışmalarla tür komplekslerindeki taksonomik sorunların çözümünde önemli başarılar elde edilmiştir (Proft vd., 1999; Bortel vd., 2000; Naddaf, 2003; Marrelli vd., 2005; Chen vd., 2006; Goff vd., 2006; Torres vd., 2006). Böylece, *Anopheles* genusundaki yüksek filogenetik çalışmalar hızlanmış ve özellikle de hem yüksek seviyedeki taksonomik sorunlara odaklanılmış (Krzywinski vd., 2001, Sallum vd., 2002, Sallum vd., 2000) hem de önemli sıtma vektörleri ve onların benzer taksonlarıyla aralarındaki ilişkiye açıklık getirmeye çalışılmıştır (Anthony vd., 1999; Garros vd., 2004; Harbach, 2004; Marshall vd., 2005).

Moleküler tür teşhislerinde rDNA ITS2 bölgesi ve mtDNA COI geni verilerinden yararlanılmaktadır. Organizmaların mtDNA COI gen bölgeleri kullanılarak, Neighbor joining (NJ) yöntemi ile yakın akraba türlerin karşılaştırılmasını temel alan bu yöntemin adı DNA barkodlama yöntemidir. COI alt birimi *Anopheles*

filogenilerinin kurgulanmasında sık sık kullanılan bir mitokondriyal protein genidir (Marshall vd., 2005, Mohanty vd., 2009, Sallum vd., 2002). Ayrıca, ITS2 gen dizilerinin hizalanması, evrimsel olarak araştırmalarda daha fazla yarar sağladığından ikinci gen yapılarının belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Bu kapsamda yapılan çalışmalardan en onemlilerinden biri *An. maculipennis* kompleksi üzerine yapılan çalışmalardır. *An. maculipennis* kompleksi için nüklear DNA (nDNA) ITS2 bölgesi ve mtDNA COI gen bölgesi dizileri kullanılarak yapılan çalışmalarla bu kompleks ile ilgili olarak birçok taksonomik sorunun çözülmesi sağlanmıştır (Proft vd. 1999; Marinucci vd., 1999; Romi vd., 2000; Linton vd., 2001b; Boccolini vd., 2003). Özellikle de, Yunanistan'da (Linton vd., 2002a), İşan'da (Sedaghat vd., 2003) ve Romanya'da (Nicolescu vd., 2004) yapılan moleküler çalışmalar ülkemiz açısından oldukça onemlidir. Sedagnat vd., (2003), İşan'da, rDNA ITS2 dizi analizleri ile *An. maculipennis* kompleksini değerlendirmişler ve daha önce varlığı (yumurta morfolojisine göre) bildirilen *An. maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. messeae* ve *An. melanoon* türlerinden sadece *An. maculipennis* s.s. ve *An. sacharovi* türlerinin olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda dünyada ilk kez moleküler teknikler kullanılarak tanımlanan ve adlandırılan ilk sivrisinek türü olan *An. persiensis*'i yeni bir tür olarak bildirmişlerdir. Nicolescu vd., (2004), rDNA ITS2 ve mtDNA COI geni ile yaptıkları moleküler çalışma sonucunda Romanya'da daha önce varlığı bildirilen *An. maculipennis* s.s., *An. sacharovi*, *An. atroparvus* ve *An. messeae* türlerine ek olarak, *An. melanoon* ve *An. daciae* (kompleksin yeni türü olarak verilmiştir) türlerinin de bulunduğunu belirlemişlerdir. Yunanistan'da da benzer şekilde Linton vd., (2002a) tarafından *An. maculipennis* ve *An. messeae* türlerinin varlığı bildirilmiştir. Linton vd., (2002c)'nin Yunanistan'daki diğer çalışmalarında, elde edilen *An. subalpinus* türünün çizgili yumurtasıyla, *An. melanoon* türünün tipik siyah yumurtasının farklılıklar göstermesine rağmen, türlerin nDNA ITS2 gen dizilerini incelediğinde *An. subalpinus* ile *An. melanoon*'un sinonim oldukları kanıtlanmıştır. *An. maculipennis* kompleksine ait ülkemizde yapılan çalışmada, Güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanan örneklerin ITS2 dizi verileri kullanılarak bu tespitin doğruluğu araştırılmıştır (şimşek vd., 2011; Sevgili ve Simsek, 2012). Türkiye'nin farklı bölgelerinde 70 lokaliteden *An. maculipennis* kompleksine ait örnekler kullanılarak 200 ITS2 bölgesi dizisi elde edilmiş ve bu diziler GenBank'taki mevcut dizilerle karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda bu örneklerin 53% (106) *An. maculipennis* s.s., 2.5% (5) *An. melanoon* ve 44.5% (89)

*An. sacharovi* olarak tanımlanmıştır. Böylece *An. melanoon*'un Türkiye'deki varlığı ITS2 dizilerine dayanan bu çalışmada tespit edilmiştir.

Tür ayrımında kullanılan bu moleküler yöntemlerin yararlılığının görülmesi üzerine pek çok çalışma farklı kıta ve ülkelerde farklı tür gruplarıyla da yapılmıştır. Örneğin, Güney Afrika'daki *Anopheles* türlerinin filogenilerini saptamak amacıyla yapılan araştırmada, türlerin vektör olup olmadıkları ve antropofilik-zoofilik tercihlerinin belirlenmesi öncelikli amaç olarak saptanması amaçlanmıştır. Ancak, türler arasında morfolojik benzerlik önemli bir sorun teşkil ettiğinden moleküler çalışmalar yapılması gerekli olmuştur. *An. gambiae*, *An. arabiensis* ve *An. quadriannulatus*, *An. gambiae* kompleksinde yer alırlar ve Afrika boyunca geniş dağılıma sahiptirler. *An. arabiensis* kuraklığa çok toleranslı iken *An. gambiae* nemli alanlarda bulunur (Gillies ve DeMeillon 1968). *An. gambiae* yüksek derecede antropofiliktir ve Sahra Altı Afrika'daki en önemli sıtma vektörüdür (Gillies ve DeMeillon 1968, White vd., 1972). Lokalisyona bağlı olarak *An. arabiensis* antropofilik değişkenlik gösterebilir ve bu tür Güney Zambiya'da başlıca antropofilik türdür (Fornadel vd., 2010a; Kent vd., 2007) ve bu bölgedeki ana sıtma vektörüdür. *An. quadriannulatus* türünün tamamına yakını zoofiliktir ve bu yüzden sıtma vektörü değildir. *An. pharoensis* ve *An. squamosus* (Cellia serisi) türleri zoofilik olduklarından dolayı genelde vektör gibi düşünülmezler. Ancak *An. squamosus* türüne ait sineklere diseksiyon yapıldığında Tanzanya (Gillies, 1964) ve Zimbabwe'deki (Gillies ve DeMeillon 1968) tarlalardan toplanan sivrisineklerin *Plasmodium* sporozoitleri taşıdıkları bulunmuş ve bu türe ait sivrisineklerin Zambiya'da insanlardan kan emdikleri de görülmüştür (Fornadel vd., 2010b). *An. pharoensis* türü Mısır'daki en önemli vektördür (Barber ve Rice, 1937), Kamerun'un bazı bölgelerinde de görülmektedir (Antonia-Nkondjio vd., 2006) ve Senegal'de ülkedeki en önemli olan ikinci vektör olan türdür (Dia vd., 2008). *An. longipalpis*'in tamamına yakını zoofiliktir (Gillies ve Demeillon, 1968) fakat endofilik özellik gösterebilmektedir. *An. funestus s.s.* türü ile kolayca karıştırılabilmektedir (Kent vd., 2007). Yeni kriptik iki tür *An. funestus* ve *An. rivulorum* ITS2 sekans farklılıklarına bağlı olarak keşfedilmiştir (Cohuet vd., 2003; Spillings vd., 2009). Güney Zambiya'daki araştırmalarda bu iki türün sibling tür olduğu belirtilmiştir (Spillings vd., 2009). Fakat yapılan başka bir araştırmayla *An. rivulorum* ve *An. funestus* türlerinin simpatrik tür olduğu ve coğrafik farklılıklardan dolayı bu türlerin ayrı türler olarak gösterildiği kanıtlanmıştır (Norris ve Norris, 2015).

Filiz (2015), 34 ilden topladığı 6.318 sivrisineği morfolojik olarak teşhis etmiş ve bu örneklerin 1.015 tanesinin COI gen bölgesi dizi analizlerini elde etmiştir. Bu çalışma sonucunda Türkiye’de bulunan sivrisinek tür sayısı 62’ye yükselmiş ve Türkiye’den ilk kez *An. hyrcanus var. pseudopictus*’un varlığı bildirilmiştir.

Ülkemizde yapılan morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan *Anopheles* türlerinin yumurta, larva ve ergin örnekleri morfolojik karakterleri analiz edilerek 10 tane *Anopheles* türü tanımlanmıştır. Bu türler, *An. sacharovi*, *An. algeriensis*, *An. melanoon subalpinus*, *An. superpictus*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. marteri sogdianus*, *An. maculipennis*, *An. plumbeus* ve *An. pulcherrimus* türleridir.

Birçok ülke öncelikle kendi bölgelerindeki sivrisinek faunasına yönelik sistematik, zoocoğrafik araştırmalar yapmakta, epidemiyolojik ve sosyolojik yeni projeleri planlamakta ve bu çalışmalardan elde edilen tüm verilerle olası tehlikelere karşı mücadele stratejileri geliştirmektedirler. Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmaların en önemlileri güvenilir sistematik çalışmalar, türlerin dağılım modellerini ortaya koyan araştırmalar ve populasyon yapısına yönelik analizlerdir. Böylece, doğru tür teşhisleriyle, doğru alanda, uygun mücadele stratejileri uygulanabilmektedir. Aksi durumda ise tür teşhisinin yanlışlığı özellikle de sıtma vektörü gibi türlerin mücadelesini etkisiz kılmakta bu da hastalıkların hızla yayılmasına neden olmaktadır.

## 2.2. Türkiye *Anopheles* Türlerinin Dağılımları ve Biyolojik Özellikleri

Türkiye’de bulunan *Anopheles* türlerinin dünya üzerindeki dağılımı [www.mosquitocatalog.org](http://www.mosquitocatalog.org) veri tabanı kaynakları esas alınarak hazırlanmıştır.

*An. algeriensis* Theobald, 1903: Afganistan, Arnavutluk, Cezayir, Avusturya, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Mısır, Estonya, Fransa, Gürcistan, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İran, Irak, İrlanda, İsrail, İtalya, Ürdün, Kırgızistan, Lübnan, Libya, Makedonya, Moldova, Fas, Portekiz, Rusya, İspanya, İsveç, Suriye, Tacikistan, Tunus, Türkiye, Ukrayna, Birleşik Krallık, Sırbistan ve Karadağ’da tespit edilmiştir. *An. algeriensis*’in üreme yerleri genelde bataklıklar, bitki örtüsü fazla olan yavaş akan dereler ve sızıntı sularda bulunurlar. Az tuzlu sularda yoğun olarak bulunurlar. Larvaların yaşam alanlarında genellikle *An. maculipennis* ve *Uranotaenia unguiculata* larvaları da bulunur. Kış aylarında larva

döneminde kışlarlar. Bazı bölgelerde kış döneminde hem larvalar hem de erginler bulunabilir. Eginler ekzofil ve zoo-antropofildirler. Nadiren ev veya ahır gibi kapalı alanlara girerler. En yoğun olduğu dönemlerdeki ilkyaz ve güz aylarında genellikle sazlık ve su bitkileri bol olan yerlerde saldırırlar (Merdivenci, 1984; Snow, 1999; Becker vd., 2003).

**An. claviger** Meigen, 1804: Afganistan, Arnavutluk, Ermenistan, Avusturya, Azerbaycan, Beyaz Rusya, Belçika, Bulgaristan, Çin, Hırvatistan, Kıbrıs, Bosna-Hersek, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Gürcistan, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İran, Irak, İrlanda, İsrail, İtalya, Ürdün, Kırgızistan, Letonya, Lübnan, Litvanya, Lüksemburg, Makedonya, Moldova, Fas, Hollanda, Norveç, Pakistan, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsveç, İsviçre, Suriye, Tacikistan, Tunus, Türkiye, Türkmenistan, Ukrayna, Birleşik Krallık, Özbekistan, Sırbistan ve Karadağ'dan bildirilmiştir. *An. claviger*, ekzofil davranış gösterirler ve genellikle zoofiliktir fakat hayvansal kaynakların yetersiz olduğu durumlarda insan kaynaklı beslenmeye eğilim göstermektedir. Bu yüzden her ne kadar Türkiye'de birincil sıtma vektörü olmasa da büyük önem taşımaktadır. Özellikle de, ormanlık alanlardaki sıtmanın en önemli vektörüdür. Şimşek (2006), Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde *An. claviger* ile yaptığı çalışmada, bu türün Haziran ve Eylül ayları arasında aktif üreme davranışı gösterdiğini, ergin beslenmesinin gündeğümü ve günbatımı sırasında arttığını ve antropofil eğilimlerinin de % 14.22 - %18.78 oranında olduğunu göstermiştir. Kışı larva evresinde geçirirler. Larvalar ısı derecesi düşük, akıntısız ve temiz sularda yaşarlar. Sıtma, *Francisella tularensis* (Tularemi), *Dirofilaria immitis* ve *Difilaria repens*' in vektörlüğünü yaparlar (Erel, 1973; Postiglione vd., 1973; Service, 1973; Merdivenci, 1984; Snow, 1990; Boşgelmez vd., 1995; Amr vd., 1997; Alten ve Çağlar, 1998; Schaffner vd., 2000).

**An. plumbeus** Stephens, 1828: Arnavutluk, Cezayir, Avusturya, Azerbaycan, Beyaz Rusya, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Fransa, Gürcistan, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İran, Irak, İrlanda, İtalya, Litvanya, Lüksemburg, Makedonya, Moldova, Hollanda, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsveç, İsviçre, Suriye, Türkiye, Ukrayna, Birleşik Krallık, Sırbistan ve Karadağ'da yayılış göstermektedir. *An. plumbeus* larvaları geniş ve derin gölgelikli ormanlık alanlardaki kayın, gürgen, akçaağaç, dut, ceviz, söğüt, kavak, meşe vb. ağaçların kavuklarında yağmurlar sonucunda oluşan su birikintilerinde, su kuyuları ve su

kanallarında yaşarlar. Yumurtalar ağaç kovuklarında kovuk kenarına bırakılır ve yağışlarla birlikte su dolan kovuklarda yumurtalar açılır. Yumurta ya da larva olarak kışlayabilirler. Kurak dönemlerde su ile dolu olan küçük kaplarda, yalalarda veya atık lastiklerde de larvalar bulunabilir. Kış aylarında su birikintileri don tutunca yumurta ve larvaların bir kısmı canlı kalır. Ormanlık alan ekzofil sivrisineğidirler. İnsana çok nadir saldırırlar. Larvaların yaşam alanlarında *Aedes geniculatus*, *Aedes pulchritarsis* ve *Orthopodomyia pulchripalpis* larvaları da bulunur (Merdivenci, 1984; Becker vd., 2003).

**An. maculipennis** Meigen, 1818: Arnavutluk, Cezayir, Ermenistan, Avusturya, Azerbaycan, Beyaz Rusya, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Fransa, Gürcistan, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İran, Irak, İrlanda, İtalya, Letonya, Litvanya, Lüksemburg, Makedonya, Moldova, Fas, Hollanda, Norveç, , Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, İsveç, İsviçre, Suriye, Tacikistan, Tunus, Türkiye, Ukrayna, Birleşik Arap Emirlikleri, Birleşik Krallık, Sırbistan ve Karadağ'da tespit edilen türün Palearktık Bölge'de geniş bir yayılımı vardır. *An. maculipennis* larvalar durgun ya da yavaş akan temiz, güneş alan, içerisinde bol su bitkisi bulduran sularda yaşarlar. Yazın sıcak aylarda gölgelikli kışın ise soğuk aylarda güneş alan gölgeliksiz sularda bulunurlar. Dağlık bölgelerde 2000 mt ve üzerinde kaydedilmişlerdir. Larvalar yüksek organik materyal içeren habitatlarda yaşarlar. Larvalar kış aylarında ölür ve kışı erişkin olarak geçirirler. *An. maculipennis* genellikle insan etkileşiminin aktif olduğu yerlerde faaliyetlerini sürdürürler. Kan emme açısından ilk tercihleri ahırlardaki hayvanlardır ancak bunlar yetersiz olduğunda insanlardan da kan emmektedirler (Merdivenci, 1984; Becker vd., 2003).

**An. melanoon** Hackett, 1934: Azerbaycan, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Fransa, Gürcistan, Yunanistan, İran, Irak, İtalya, Makedonya, Romanya, Rusya, İspanya, Türkiye'de tespit edilen türün daha önceki çalışmalarda *An. subalpinus* olarak kaydı verilmiştir. *An. melanoon* larvalar tipik olarak bazı vejetasyonların durgun güneşli sularında su yüzeyinde bulunurlar (Jetten ve Takken, 1994). Bataklıklarda, nehir ve göl kıyılarında, havuzlarda ve göletlerde bulunurlar. Ayrıca pirinç tarlalarında buldukları da rapor edilmiştir (Hackett ve Missiroli, 1935). Zoofilitirler fakat nadiren de olsa insanlardan beslendikleri kayıt edilmiştir. Gün içerisinde barınaklarda bulunan büyükbaş hayvanlardan beslenirler (Ribeiro vd., 1980). Yazın uçarken çiftleşirler, tatlı sulara yumurtlarlar ve sıcak barınaklarda

kışlarlar. *An. melanoon* dağılımı sınırlı olan nadir bir türdür (Merdivenci, 1984). Güney Fransa'da yapılan çalışmada *An. melanoon*'un kan emmek için hayvanlara ilgi gösterdiği ve kan emmiş dişilerin ELISA yöntemiyle analizi sonucunda türün yaklaşık % 90'nın at veya sığır kanyla beslendikleri anlaşılmıştır (Poncon vd., 2007).

*An. sacharovi* Favre, 1903: Afganistan, Arnavutluk, Cezayir, Ermenistan, Avusturya, Azerbaycan, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Çin, Hırvatistan, Fransa, Gürcistan, Yunanistan, İran, Irak, İsrail, İtalya, Ürdün, Lübnan, Makedonya, Polonya, Portekiz, Rusya, İspanya, Suriye, Tacikistan, Türkiye, Sırbistan ve Karadağ'dan bildirilmiştir. *An. sacharovi* zoo-antropofil ve endofildirler. Sıcak barınaklarda, ev ve ahırlarda bulunurlar ve buralarda hem insanlardan hem de hayvanlardan kan emerler. Kış aylarında kan emebilir ve uçarken çiftleşebilirler. Larvalar durgun ya da yavaş akan temiz, güneş alan, içerisinde bol su bitkisi bulunduran ve tuz oranı çok yüksek olan sularda yaşarlar. Pirinç tarlaları gibi sularda larvalar sık sık *Culex modestus* larvalarıyla birlikte bulunurlar. Ülkemizdeki en önemli sıtma vektörüdür ( Barkai ve Saliternik, 1968; Postiglione vd., 1973; Kasap vd., 1981; Merdivenci, 1984; Pener ve Kitron, 1985; Gutsevich ve Dubitaky, 1987; Boşgelmez vd., 1995; Alten ve Çağlar, 1998; Özer vd., 2001; Aldemir vd., 2002; Tavşanoğlu ve Çağlar, 2008). Avrupa'nın güneyinde (Romi vd., 1997; Ramsdale ve Snow, 2000.), İran (Djadid vd., 2007) ve Ermenistan'da da (Romi vd., 2002) başlıca sıtma vektörü olarak kabul edilmektedir. *An. sacharovi* yumurta ve larva dönemlerinde Avrupa'da genellikle durgun tuzlu sularda bulunurken Türkiye'de yatay bitki örtüsüne sahip temiz sularda bulunur (Jetten ve Takken, 1994). Türkiye'de sıtma vakaları görülen alanlardaki en baskın türdür. *An. sacharovi*, *An. maculipennis* kompleksi içerisinde termofilik özellikli türdür ve 30 °C'den yüksek su sıcaklıklarında yaşayabilirler. Önemli oranda insan etkisinin bulunduğu ortamlarda yaşamlarını sürdürürler (Gutsevich ve Dubitaky, 1987).

*An. superpictus* Grassi, 1899: Afganistan, Arnavutluk, Cezayir, Ermenistan, Azerbaycan, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Kıbrıs, Mısır, Fransa, Gürcistan, Yunanistan, Hindistan, İran, Irak, İsrail, İtalya, Ürdün, Kazakistan, Kırgızistan, Lübnan, Libya, Makedonya, Pakistan, Rusya, İspanya, Suriye, Tacikistan, Tunus, Türkiye, Türkmenistan, Özbekistan, Sırbistan ve Karadağ'da tespit edilmiştir. *An. superpictus* larvaları akıntısız, ılık ve kirli olmayan sularda bulunurlar. Örneğin; nehir kenarındaki havuzlar veya pirinç tarlaları gibi

(Gutsevich vd., 1974). Tuzluluğa karşı tolerans gösterebilirler fakat çamurlu ve ötrofik sulardan kaçarak. Larval gelişim yüksek sıcaklıkta olabilir. Dişiler soğuk iklimde aktif bir şekilde hayatta kalabilirler. Konak ayrımı yapmaksızın hem insanlardan hem de hayvanlardan beslenirler. Gün batımıyla beraber daha da aktif olurlar. Hem endofilik hem de ekzofiliktirler (Becker vd., 2003). Önemli sıtma vektörüdürler ancak buldukları bölgedeki davranışlarına bağlı olarak vektörlük dereceleri değişebilir (Kasap vd., 1987; Alten ve Çağlar, 1998). Ülkemizde *An. sacharovi*'den sonraki en önemli sıtma vektörünün *An. superpictus* olduğu bildirilmiştir. Çünkü bu türün ekzofilik ve zoofilik davranışları buldukları yere göre farklılıklar gösterir (Postiglione vd., 1973; Merdivenci, 1984; Alten ve Çağlar, 1998).

*An. pulcherrimus* Theobald, 1909: Afganistan, Bahreyn, Hindistan, İran, Irak, İsrail, Kazakistan, Lübnan, Pakistan, Rusya, Suudi Arabistan, Suriye, Tacikistan, Türkiye'de tespit edilen türün dağılım alanları oldukça sınırlıdır. Ülkemizde de sadece Mardin İli çevresinde tespit edilmiştir. Larval üreme yerleri genelde bataklıklar, bitki örtüsüyle büyüyen yavaş akan küçük derelerdir. Nadiren çeltik tarlalarında da bulunurlar. Larvalar tuzlu sularda ve küçük su birikintilerinde yaşayamazlar. Hem endofilik hem de ekzofiliktirler. Ev içleri ve ahırlara girerek hayvan ve insanlara saldırırlar. Buna karşılık bazı bölgelerde açık alanlarda da yoğun saldırı olmaktadır (Al-Tikrity, 1964; Merdivenci, 1984). Sıtma vektörlüğü yapabilmektedirler. İran'da yapılan çalışmada *An. pulcherrimus* ergin dişileri ilkbahar aylarından sonbahar sonuna kadar ahırlarda yoğun olarak örneklenmiştir (Zaim vd., 1993).

*An. hyrcanus* Pallas, 1771: Afganistan, Arnavutluk, Ermenistan, Azerbaycan, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Kamboçya, Çin, Hırvatistan, Fransa, Gürcistan, Yunanistan, Macaristan, İran, Irak, İtalya, Japonya, Ürdün, Kazakistan, Kırgızistan, Lübnan, Libya, Makedonya, Malezya, Moldova, Moğolistan, Romanya, Rusya, Slovakya, Slovenya, İspanya, Sri Lanka, Suriye, Tacikistan, Türkiye, Türkmenistan, Ukrayna, Özbekistan, Sırbistan ve Karadağ'da bulunmuştur. *An. hyrcanus* zoofiliktirler ancak nadiren insanlardan da beslendikleri görülmüştür. Ağıl biçiminde konağı sarabilirler. Yumurtalarını temiz, durgun ve güneş alan sulara bırakırlar. Larvalar, bol yeşillik bitkisi olan göllerde, her türlü sulama kanallarında, çeltik tarlaları, su bentlerinde yaşar ve gelişirler. Yazın sıcak aylarda gölgelikli kışın ise soğuk aylarda güneş alan gölgeliksiz sularda bulunurlar. Larvaların yaşam alanlarında *An. sacharovi*, *An.*

*pulcherrimus* ve *Cx. modestus* larvaları da bulunur (Merdivenci, 1984). Yüksek endofilik özelliğine rağmen, *An. hyrcanus* genellikle Akdeniz Bölgesi'nde sıtma açısından önemli bir sivrisinek olarak kabul edilmez. Fakat Türkiye (Ramsdale ve Haas, 1978) ve diğer ülkelerdeki (Sergiev vd., 1993) pamuk toplayan sezonluk işçiler ve ekili pirinç tarlalarında çalışanlar arasındaki sıtma aktarımının başlıca vektörü bu tür olduğu düşünülmektedir. Fransa Camargue'de yapılan araştırma *An. hyrcanus* türünün antropofilik ve çok fazla bulunmasından dolayı muhtemelen buradaki sıtma taşınımından sorumlu olduğu kabul edilmiştir (Poncon vd., 2007).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Alansal Çalışmalar

*Anopheles* türlerinin dağılım alanları dikkate alınarak Mayıs 2014-Mayıs 2016 tarihleri arasında ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden örnekleme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar ile *Anopheles* türlerinin larva, pupa ve ergin örnekleri çeşitli yöntemlerle toplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Anopheles* populasyonları örnekleme bölgeleri ve yöntemleri

Örnekleme Alanı	Örnekleme Yöntemi			
	Larva Kepçesi	Işık Tuzağı	Aspiratör	Hayvan Tuzağı
Muğla, Dalaman, Kapıkargın Köyü	+	+	+	+
Mersin, Çamlıyayla	+	+	+	+
Adana, TufanbeyliPınarlar Köyü	+	+	+	
Adana, Karataş, Çavuşlu Köyü	+	+	+	+
Isparta, Aşağı Gökdere Köyü	+	+	+	
Isparta, Sütçüler	+	+	+	
Konya, Beyşehir, Gölkaşı Köyü	+	+	+	+
Kırklareli, Dereköy	+	+	+	
Edirne, Uzunköprü	+	+	+	
Şanlıurfa, Birecik Mağaralı Köyü	+	+	+	+
Şanlıurfa, Birecik Duyduk Köyü	+	+	+	
Samsun, Çarşamba, Köklük Köyü	+	+	+	
Rize, Çiftekapak Köyü	+	+	+	
Aydın, Söke, Akköy	+	+	+	+

### 3.1.1. Larva Örneklemeleri

Farklı lokalitelerden sulama kanalları, çeşme başları, ağaç kovukları, bataklık, göl, akarsu, dere, gölet gibi doğal alanlar ve insan yaşam çevrelerinde bulunan su kapları, araba lastikleri gibi sivrisinek üreme alanları incelenmiştir. Larva kepeçeleri ve larva pipetleri kullanılarak araştırma bölgelerinden larva ve pupa örnekleri toplanmıştır (Şekil 3.1). Farklı üreme alanlarından toplanan örnekler örnekleme kaplarına konularak buzluklarla laboratuvara götürülmüştür. Toplanan örneklerin bir kısmı örnekleme alanlarına göre ayrı ayrı tül kaplı plastik kaplarda erginleştirilmesi sağlanmıştır. Larval örneklerin bir kısmı moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere % 95'lik etil alkol içeren örnek kaplarında etiketlenerek koruma altına alınmıştır.



Şekil 3.1. Larva *Anopheles* örneklemeleri

### 3.1.2. Ergin Örneklemeleri

Ergin sivrisinekler, CDC ışık tuzakları, hayvan tuzakları ve ağız aspiratörleri yardımıyla hem dış alanlardan hem de kapalı alanlardan (ev, ahır, kiler vb.) yakalanmıştır (Şekil 3.2). Örnekler kâğıt bardaklara alınarak örnekleme lokalitesine göre etiketlenmiş ve buzluklar aracılığıyla canlı olarak laboratuvar ortamına taşınmıştır. Laboratuvar ortamında örneklerin eşey ayrımı yapılmış ve dişi bireylerin fizyolojik durumu, kan emmiş, aç veya yumurta geliştirmiş olup olmadığı tespit edilmiştir. Ağız aspiratörüyle yakalanan dişiler kan emmiş ya da yumurta geliştirmiş ise yumurtlatılmaları sağlanmıştır. Ergin örnekleri laboratuvar ortamında böcek iğneleriyle iğnelenerek etiketlenmiş ve müze materyali hâline getirilmiştir.

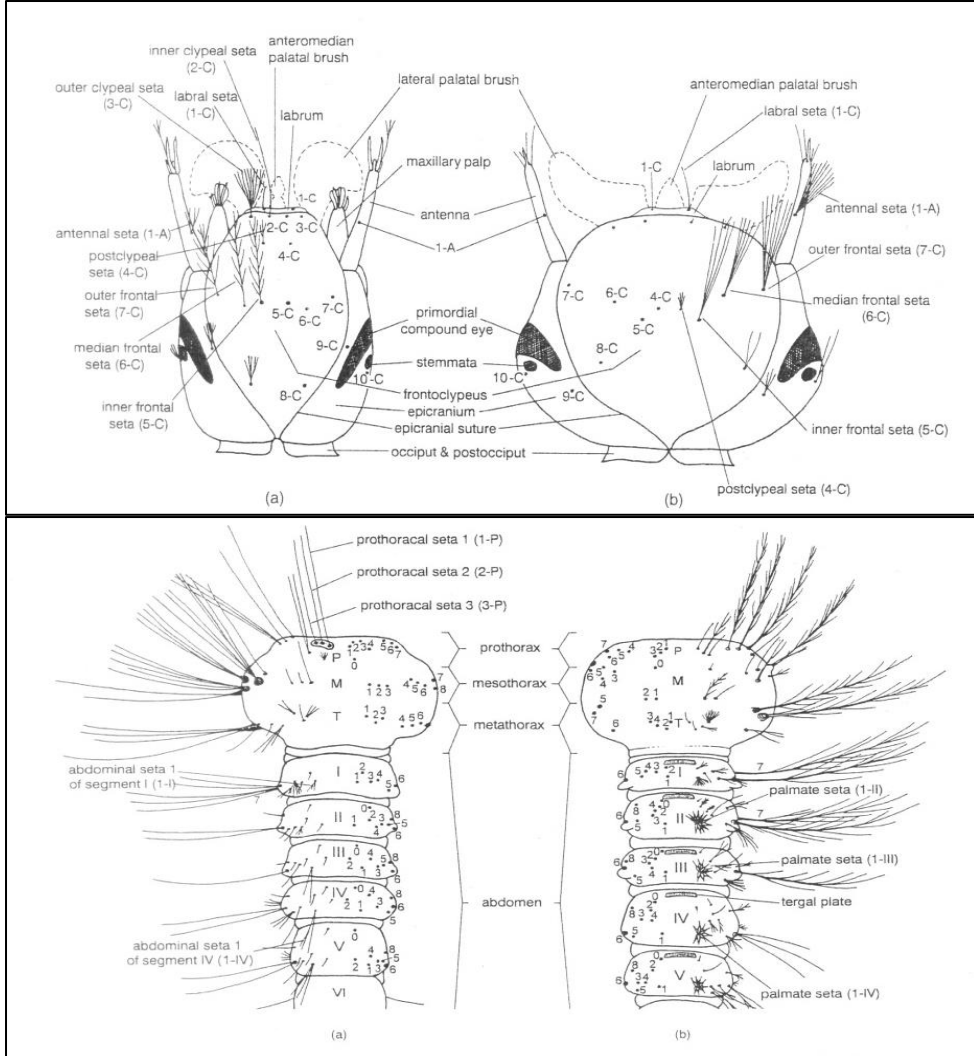


Şekil 3.2. Ergin *Anopheles* örneklemeleri

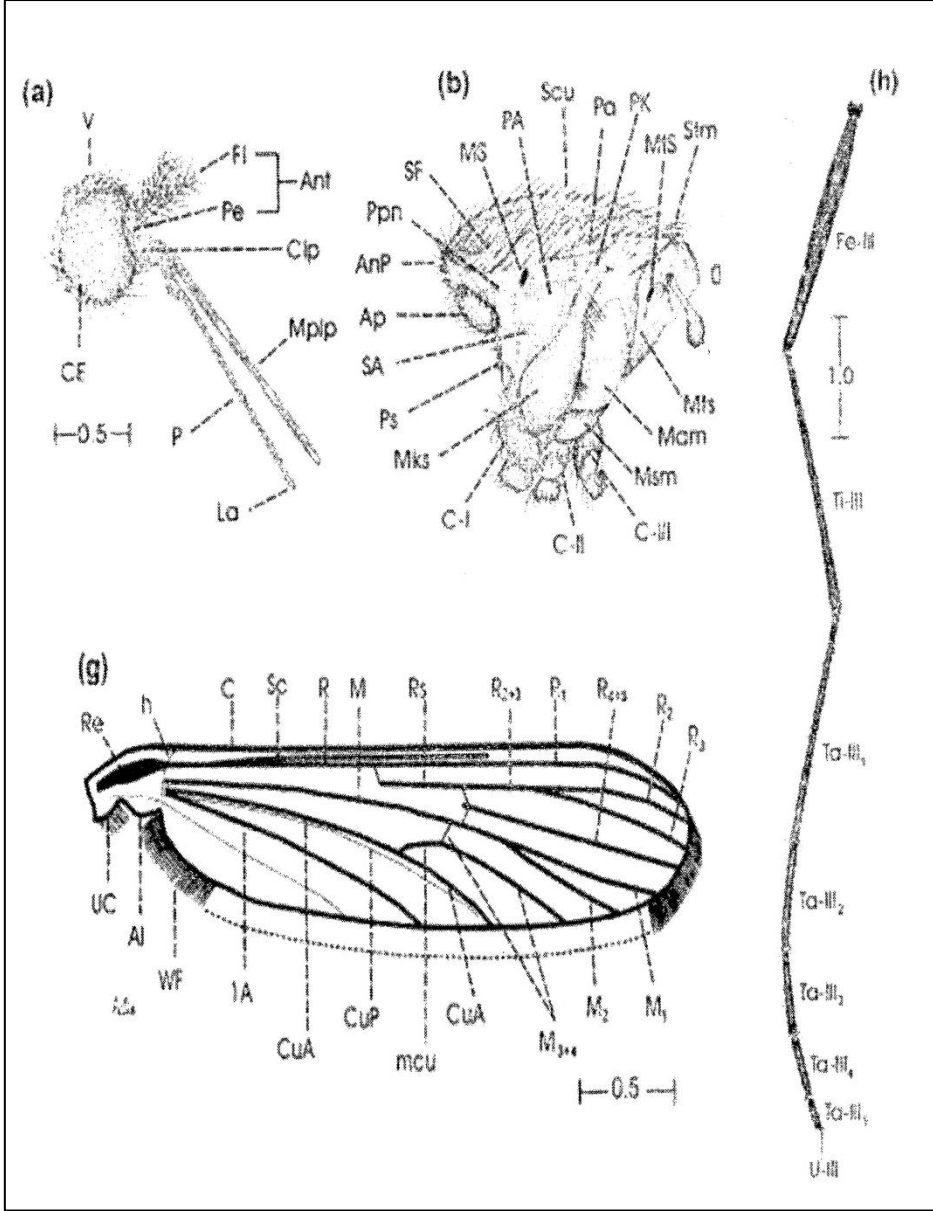
### 3.2. Morfolojik Tür Teşhisi

Arazi çalışmalarında toplanan *Anopheles* larva ve ergin örnekleri morfolojik teşhis anahtarları kullanılarak incelenmiş ve tür teşhisleri yapılmıştır. Erginlerde baş, thoraks, abdomen, kanat ve bacaklar, larvalarda baş, thoraks ve abdomen setalarının görünüm ve sayısal farklılıklarından yararlanılmıştır. Yumurta örnekleri elde edilmiş ise, yumurtalar, koryon desenleri arasındaki farklılıklardan yararlanılarak tür tanımlaması yapılmıştır. Çalışmalarda Leica S8 Apo stereo mikroskop kullanılmış ve incelenen materyalin bir kısmı dijital olarak görüntülenmiştir. Tür teşhisi yapılan örneklerin bir kısmı ile morfolojik tür teşhisinde kullanılmayan diğer örnekler moleküler çalışmalar için % 95'lik etil alkol içerisinde saklanmıştır. Türkiye'de daha önceki yıllarda yapılan sistematik araştırma sonuçlarına göre *Anopheles* cinsine ait *An. sacharovi*, *An. algeriensis*, *An. melanoon*, *An. superpictus*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. marteri*, *An. maculipennis*, *An. plumbeus* ve *An. pulcherrimus* olmak üzere 10 türün kaydı verilmiştir. Bu çalışmada daha önce kaydı verilen 10 *Anopheles* türüne ait örneklerin araştırma materyali olması hedeflenmiş olsada, yapılan örnekleme çalışmaları sonucunda *An. algeriensis*, *An. marteri* ve *An. pulcherrimus* türleri için örnek bulunamamıştır. Bu nedenle, 10 *Anopheles* türü için planlanan çalışmalar, örnekleri elde edilebilen *An. sacharovi*, *An. melanoon*, *An. superpictus*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. maculipennis* ve *An. plumbeus* için gerçekleştirilmiştir.

Bununla birlikte, örneklenemeyen *An. algeriensis* ve *An. pulcherrimus* türleri için GenBank'ta mevcut olan moleküler verilerden yararlanılarak, moleküler analizlere iki tür de dâhil edilmiştir. Ancak, morfolojik inceleme, değerlendirme ve tür teşhisi yapılamamıştır. Morfolojik tür teşhislerinde 4. evre larva örnekleri ile ergin erkek ve dişi örneklerinin morfolojik karakterleri kullanılmıştır. Teşhislerde kullanılan larva ve ergin karakterleri için kullanılan standart karakterler göstergeleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.3. *Anopheles* (a) ve *Culex* (b) 4. evre larva teşhis karakterleri göstergesi (Becker, 2003).



Şekil 3.4. Ergin *Anopheles* morfolojik teşhis karakterleri göstergesi ((a) Baş (b) Thorax (g) Kanat damarları (h) Lateralde arka bacak. 1A, anal damar; Ant, antenler; C, costal damar; Clp, clypeus; Fe-III, arka bacak femur; Mplp, maxillar palpus; P, proboscis; PA, postspiracular bölge; Ppn, postpronotum; Sc, subcosta; Scu, scutum; Stm, scutellum; Ta-III<sub>1</sub> - Ta-III<sub>5</sub>, arka bacak tarsomerleri 1-5; Ti-III, arka bacak tibia) (Amerasinghe vd., 2002).

### 3.3. Laboratuvar Çalışmaları

Moleküler tür teşhisleri, örneklerden DNA izolasyonu, elde edilen DNA'lar kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR), agaroz jel elektroforezleri, örneklerin rDNA ITS2 ve mtDNA COI gen bölgesi dizilerinin elde edilmesi ve elde edilen dizilerin analizine yönelik çalışmalarla gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3.1. Örneklerden DNA İzolasyonu

Çalışmalar sonucunda elde edilen örnekler laboratuvar ortamında %95'lik etil alkol içeren tüplerde saklanmış ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu örneklerden İnvitrogen PureLink genomik DNA kiti kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve DNA izolasyonu işlemi sırasındaki işlem basamakları aşağıdaki verilmiştir;

1. Öncelikle alkol içeren tüplerden çıkarılan örnekler kurutma kağıdı üzerinde alkollerinin uçması için birkaç dakika bekletilmiştir.
2. Daha sonra örnekler farklı eppendorf tüplere (1,5 ml'lik) alınmış ve üzerlerine 180 µl PureLink Genomic Digestion Buffer parçalama tamponu eklenmiştir.
3. Tampon içerisindeki örnekler mekanik olarak parçalanmış ve üzerine 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek, vorteksle karıştırılmıştır.
4. Tüplerin ağızları parafinlenerek 55 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 1-4 saat arası inkübasyona bırakılmıştır. Sıcak su banyosundan alınan karışım daha sonra 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ertesi sabah etüvden alınan karışım parçalanması tam olarak sağlanamamış büyük doku parçacıklarını uzaklaştırmak için maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilmiş ve son olarak süpernatant temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.
6. Süpernatant üzerine önce 20 µl RNaz A (20 mg/ml) eklenmiş, vorteksle karıştırılmış ve sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

7. Daha sonra, 200 µl genomik parçalama/bağlama tamponu eklenerek elde edilen yeni ürün, önce homojenizasyon için, sonra da homojenize ürüne eklenen 200 µl % 96-100'lük etil alkolün karışımı için iki kez vorteks ile karıştırılmıştır.
8. Parçalama ve homojenizasyon sonrası elde edilen ve yaklaşık olarak 640 µl olan karışım, PureLink genomik DNA kitinin toplama tüpü içerisindeki kolona yüklenmiştir.
9. Daha sonra üzerine karışımın miktarı kadar (~ 640 µl) genomik parçalama/bağlama tamponu eklenmiştir.
10. Yükleme yapılan kolon 10.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA'nın kolona bağlanması işlemi gerçekleştirilmiştir.
11. Kolonun altındaki toplama kolonu ve içerisindeki sıvı kısım atılmış ve üzerinde DNA bağlı olan kolon yeni bir toplama tüpü içerisine alınmıştır.
12. Bu kolonun üzerine önce 500 µl yıkama tamponu 1 eklendikten sonra 10.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiş, sonra tekrar kolon temiz bir toplama tüpüne alınarak 500 µl yıkama tamponu 2 eklenmiş ve maksimum hızda 3 dakika daha santrifüj edilmiştir.
13. Toplama tüpü tekrar atılmış ve kolon temiz bir eppendorf tüpe yerleştirilmiştir. Kolona bağlanan DNA'yı kolondan ayırmak için kolonun tam ortasına 25 µl yıkama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

DNA'yı kolondan daha etkin bir şekilde ayırmak için bir kez daha 25 µl yıkama tamponu eklenip, 2 dakika inkübasyona bırakılmış ve ardından maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj yapılmış ve elde edilen DNA tüplerinin ağzı parafinlenerek PZR gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır. Materyal, üzerinde çalışılan ya da çalışmada kullanılan objedir.

### 3.3.2. ITS2 ve COI Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

DNA izolasyonları yapılan örneklerin ITS2 bölgeleri 5.8SF ve 28SR primerleri (Biobasic) kullanılarak (Collins ve Paskewitz, 1996) Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler marka PZR cihazında çoğaltılmıştır.

5.8SF (F) 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'

28SR (R) 5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3'

Hazırlanan ITS2 reaksiyon karışımı (Çizelge 3.2), 0.2 ml PCR tüplerinde Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler marka PZR cihazı ile ön denatürasyon 94 °C'de 5 dakika, daha sonra 35 döngü olacak şekilde 94 °C'de 45 saniye denatürasyon, 53 °C'de 45 saniye annealing (primer bağlanması), 72 °C'de 45 saniye extension (uzama) adımlarından oluşan reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 °C'de 10 dakika ekstra uzama süresi ile reaksiyon devam ettirilmiş ve elde edilen PZR ürünü bir sonraki işlem gerçekleştirilinceye kadar 4 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonları yapılan örneklerin COI gen bölgeleri (yaklaşık 650 baz çifti uzunluğunda) ise LCO1490 ve HCO2198 (Folmer vd, 1994) primerleri kullanılarak eppendorf marka PZR cihazında çoğaltılmıştır.

LCO1490 (F) 5' GG T CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3'

HCO2198 (R) 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'

Hazırlanan COI reaksiyon karışımı (Çizelge 3.2), 0.2 ml PZR tüplerinde eppendorf marka PZR cihazı ile ön denatürasyon 94 °C'de 1 dakika, daha sonra 5 döngü olacak şekilde 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 45 °C'de 40 saniye annealing (primer bağlanması), 72 °C'de 1 dakika extension (uzama) adımları yapıldıktan sonra 35 döngü olacak şekilde tekrar 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 51 °C'de 40 saniye annealing (primer bağlanması), 72 °C'de 1 dakika extension (uzama) adımlarından oluşan reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 °C'de 5 dakika ekstra uzama süresi ile reaksiyon devam ettirilmiş ve elde edilen PZR ürünü bir sonraki işlem gerçekleştirilinceye kadar 4 °C'de saklanmıştır. Her PZR reaksiyonu hazırlanırken reaksiyonda herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için bir negatif kontrol kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. ITS2 ve COI gen bölgeleri için hazırlanan PZR reaksiyonu karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	Her bir PZR için hacim ( $\mu\text{L}$ )
Tampon (10X Buffer) [abm]	2.5
dNTP (2.5 mM) [abm]	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Bioron)	1.5
Primer F	0.3
Primer R	0.3
Taq DNA polimeraz (1.5 U) [Sigma]	0.1
DNA (100 ng)	1
Distile su	14.3
Toplam hacim	25

### 3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PZR ürünlerinin kalitesinin incelenmesi için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bu işlem için izlenen yol aşağıda verilmiştir;

1. 2 g agaroz (Sigma) 100 ml 1X TBE tamponu (5 L: 54 g Tris-base, 27,5 g Borik asit, 1,7 g Na<sub>2</sub>EDTA, pH: 8.0) içerisinde mikrodalga fırında homojen bir şekilde eritilmiş ve daha sonra 50 °C'ye kadar soğutulmuştur.
2. Daha sonra 5  $\mu\text{l}$  SafeView eklenerek hava kabarcığı oluşturulmadan iyice karıştırılmış ve jel kabına dökülerek donması beklenmiştir.
3. Hazırlanan bu jelin ilk kuyucuğuna 5 $\mu\text{l}$  Fermentas marka DNA büyüklük belirteci yüklenmiştir.
4. Diğer kuyucuklara da 3 $\mu\text{L}$  6X yükleme tamponu ile birlikte PZR ürünleri, (3  $\mu\text{l}$  kadar) son kutucuğa ise negatif kontrolümüz yüklenmiştir.
5. İşlem tamamlandıktan sonra elektroforez, 70 mA'de 1.5 saat çalıştırılmış ve ayırım sonucundaki jel görüntüsü Vilbert Lourmat görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.
6. Elde edilen jel görüntüsünde herhangi bir özgül olmayan bant görülmediğinden PZR ürünü direkt olarak Invitrogen PureLink PZR saflaştırma kiti kullanılarak temizlenmiştir.

### 3.3.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

1. PZR ürünlerini dizi analizi öncesi temizlemek için PZR ürünleri yeni toplama tüplerine alınarak üzerlerine PZR ürünlerinin yaklaşık 4 katı oranında (~160 µl) izopropanol içeren PureLink bağlama tamponu eklenmiş ve toplama tüpü içerisinde bulunan kolona yüklenmiştir.
2. Örnekler 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın kolona bağlanması sağlanmış ve DNA böylece diğer maddelerden arındırılmıştır.
3. Toplama tüpü içerisinde bulunan sıvı dökülmüş ve kolona etanol içeren Wash Buffer 1 yıkama tamponundan 650 µL eklenmiştir.
4. 10.000×g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt kısımdaki sıvı tekrar dökülmüştür.
5. Kolonda kalabilecek etanolü tamamen uzaklaştırmak için kolon tekrar maksimum hızda 2-3 dakika herhangi bir şey ilave edilmeksizin santrifüj edilmiştir.
6. Kolona bağlanan PZR ürününü buradan almak için kolon kitle verilen yıkama tüpleri içerisine yerleştirilmiş ve kolonun merkezine gelecek şekilde 50 µL yıkama tamponu (Elution Buffer) eklenmiştir.
7. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra maksimum hızda 2 dakika santrifüj yapılmış ve böylece DNA geri kazanılmıştır.
8. Saflaştırma işleminden sonra elde edilen PZR ürünleri tekrar agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve temizlenen ürünlerin hasar görüp görmediği kontrol edilmiştir.

DNA içeren ürünler, PZR primerleri kullanılarak DNA dizilimlerinin yapılması için Macrogen (Amsterdam, Hollanda) firmasına gönderilmiştir. Firmadan gönderilen dizi sonuçları bilgisayar ortamında incelenmiştir.

### 3.4. Veri Analizleri

#### 3.4.1. mtDNA COI ve rDNA ITS2 Dizilerinin Hizalanması

Öncelikli olarak, ileri (forward) ve ters (reverse) PZR primerleri kullanılarak elde edilen mtDNA COI gen bölgesi ve rDNA ITS2 bölgesi dizileri, BioEdit ver 7.0.5.3. (Hall, 1999) programı kullanılarak görüntülenmiştir. Daha sonra bu diziler Clustal W çoklu dizi hizalama programı ile hizalanmıştır. Teker teker kontrol edilen hizalama dizileri arasındaki uzunluk farklılıkları baz alınarak örneklerin başlangıç ve sonlanma noktalarından tekrar hizalamalar yapılmıştır. Diziler analizlere hazır duruma getirildikten sonra Fasta formatında kaydedilmiş ve Blast yöntemi ile (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank veri bankasında bulunan sekanslarla karşılaştırılmıştır.

#### 3.4.2. mtDNA COI ve rDNA ITS2 Dizilerinin Haplotip ve Nükleotit Çeşitliliği

*Anopheles* türlerine ait mtDNA COI ve rDNA ITS2 bölgelerine ait haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ) ile tür çiftleri arasındaki genetik farklılaşma düzeyinin göstergesi olan  $\gamma_{ST}$  ( $\Gamma_{ST}$ ) ve  $F_{ST}$  değerleri DNAsp ver 5.10 programı (Librado vd., 2009) kullanılarak hesaplanmıştır. Daha sonra türlere ait COI ve ITS2 dizilerinin haplotip sayısı, türler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalaması ( $K$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi_1$ ), hesaplanmıştır. Hesaplanan nükleotid çeşitliliğinin doğruluğu Jukes ve Cantor metodu ile test edilmiştir.

#### 3.4.3. Populasyonlara Ait Uzaklığa Bağlı UPGMA Ağacının Oluşturulması

Türlere ait COI geni ve ITS2 bölgesi dizi verileri DnaSP 5.10 (Librado vd., 2009) programında değerlendirilerek türlerin ikili (pairwise) karşılaştırmalarına ait  $\gamma_{ST}$  değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra elde edilen  $\gamma_{ST}$  değerleri kullanılarak MEGA 5.05 (Tamura vd., 2011) programı aracılığıyla 10000 tekrara dayalı hem ITS2 hem de COI gen bölgelerine ait UPGMA uzaklık ağacı oluşturulmuştur. Daha sonra elde edilen dendrogram txt formatında kaydedilmiştir. Bu yaklaşımda, genetik uzaklık derecesini ifade eden  $\gamma_{ST}$  değerlerinin 0-0.05 arasında olması, iki populasyon arasındaki genetik uzaklığın çok düşük; 0.05-0.25 arasında olması genetik uzaklığın orta düzeyde ve 0.25'den daha büyük olması ise genetik farklılaşmanın oldukça fazla olduğunu ifade etmektedir.

#### **3.4.4. *Anopheles* Türleri için Haplotip Ağının Oluşturulması**

Çalışmalar sonucunda hizalanmış mtDNA COI geni dizi analizi veri setleri ile network 5.0.0.1 programı kullanılarak COI geni haplotipleri belirlenmiştir. Belirlenen haplotipler için, Templeton vd. (1992)'de tanımlanan haplotiplerin istatistiksel “köksüz tutumluluk ağı” TCS v1.02 (Clement vd., 2000) programı kullanılarak oluşturulmuştur.



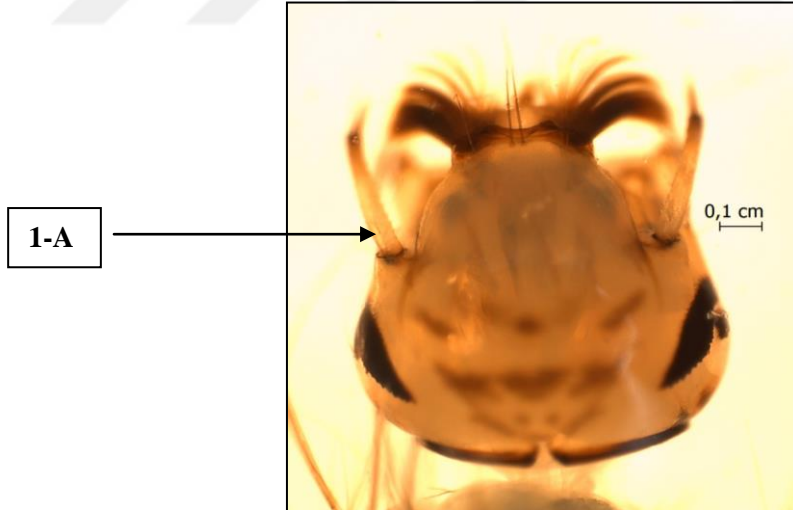
## 4. BULGULAR

### 4. 1. *Anopheles* Türleri ve Morfolojik Özelliklere Dayalı Teşhisleri

Alansal çalışmalardan elde edilen materyalin laboratuvar ortamında morfolojik incelenmesi sonucunda *An. sacharovi*, *An. melanoon*, *An. superpictus*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. maculipennis* ve *An. plumbeus* olmak üzere 7 *Anopheles* türü morfolojik olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen bu türlere ait teşhislerde izlenen yol ve yöntemlere dayalı bulgular her bir tür için aşağıda sunulmuştur.

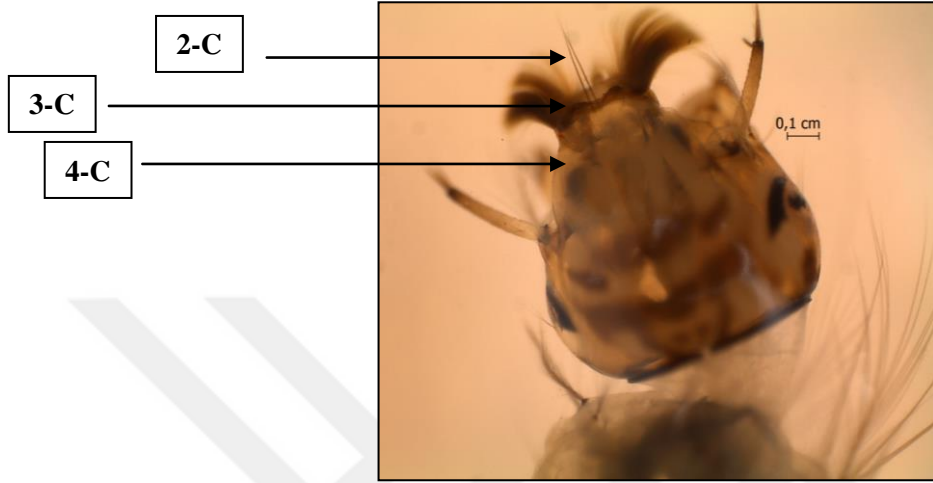
#### 4.1.1. *Anopheles claviger* Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri

*An. claviger* larvalarında anten, başın yaklaşık yarısı kadardır ve uca doğru incelik. Anten setası (1-A), anten kaidesine yakın bir bölgeden çıkar, oldukça küçüktür, zorlukla görülebilmektedir ve 4-7 dallıdır (Şekil 4.1).

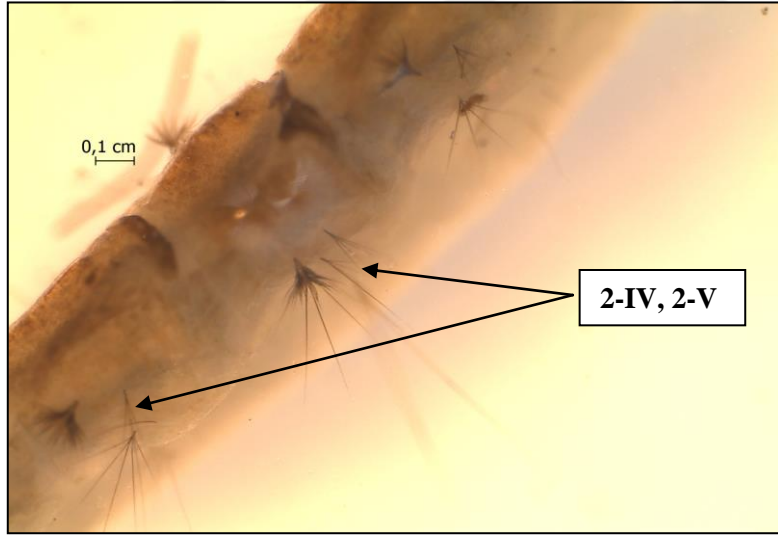


Şekil 4.1. *Anopheles claviger* 4. evre larvasında başa göre anten uzunluğu.

Larva 2-C setası uzun, 3-C setasına göre birbirine daha yakın ve dalsızdır. 3-C setası, nadiren tektir ve en fazla 2-3 dallanma gösterebilir (Şekil 4.2). 4-C setası pectinate özelliktedir ve kısa 2-4 veya nadiren 5 dallı yapı gösterebilir. Frontal setada (5-C ile 7-C) yoğun dallanmalar vardır. 8-C setası 4-5 dallıdır. Abdomen segment IV ve V'te antepalmat seta (2-IV ve 2-V) 3 dallıdır ve dallar aynı uzunluktadır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. *Anopheles claviger* 4. evre larvasında 2-C ve 3-C setaları.



Şekil 4.3. *Anopheles claviger* abdomen segment IV ve V'te antepalmar seta 2-IV ve 2-V.

*An. claviger* ergin dişilerinde proboscis ve palpler koyu kahverengindedir. Interocular alanda uzun beyaz saçaksı seta demeti vardır. Scutumun tamamı kahverengidir, scutumun ortasındaki bant, geniş ve soluk renktedir ve aynı zamanda scutumun yarısından fazlasını kaplar. Scutumun ortasındaki soluk renkteki şerit her zaman görünür olmakla birlikte çok belirgin değildir (Şekil 4.4). Antenleri kahverengi, vertex beyazımsı ve krem renklidir ve seta anteriora yönelmiştir.



Şekil 4.4. *Anopheles claviger* dışısında scutum deseni ve interocular bölge seta demeti.



Şekil 4.5. *Anopheles claviger* dışısında beneksiz kanat yapısı.

Bacaklar kahverengi veya koyu kahverengi renktedir ve bacakta birkaç soluk renkte eklem yeri vardır. Kanat damarları koyu renktedir ve kanatlarında koyu renk lekeler mevcut değildir (Şekil 4.5). Abdomen kahverengi, apikalde belirsiz açık renkli uzun bantlaşmalar vardır ve kahverengi renkli setalar vardır.

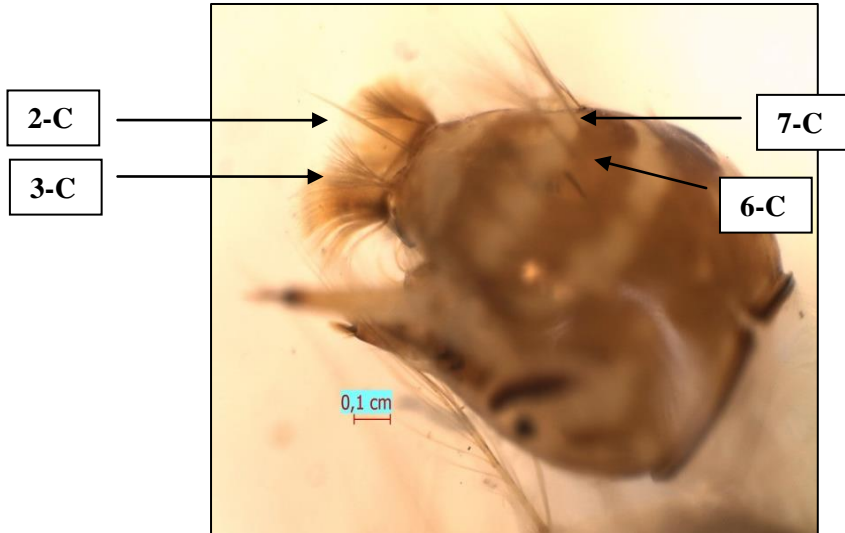
#### 4.1.2. *Anopheles hyrcanus* Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri

*An. hyrcanus* larvalarında baş üzerindeki kitinsel plakalar çok belirgin koyu renktedir ve 3 bant görünümündedir.

Larvada anten setası (1-A) oldukça karakteristiktir olup, çok dallı (7-8), büyük, kolayca görünür ve anten ortasının hemen altından çıkar (Şekil 4.6). Larva 2-C setası uç kısımda küçük çok sayıda dallanma içerir ve 3-C setasına göre birbirine daha yakındır. Seta 3-C çok dallı ve dendiriformdur. Frontal seta 5-C, 6-C ve 7-C uzundur (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. *Anopheles hyrcanus* 4. evre larvasında dallı büyük anten setası (1-A).



Şekil 4.7. *Anopheles hyrcanus* 4. evre larvasında setalar, 2-C, 3-C, 5-C, 6-C, 7-C.

*An. hyrcanus* ergin dişilerinde proboscis koyu kahverengindedir ve palpler 3 parlak beyaz bant taşır ve hemen hemen proboscis kadar uzundur (şekil 4.8). Interocular alanda uzun beyaz saćaksı seta demeti vardır ve 6ne doğru uzanır. Scutum kahverengidir, scutumun ortasında grimsi ince uzun setalardan oluşan bir bant vardır. Bu hat genellikle uzunlamasına koyu hatlarla 2 ya da 4 dar gri bantlara b6l6n6r (şekil 4.9). Bacaklar kahverengidir fakat femurların ventral y6zeyinde ve tibiaların ić y6zeylerinde parlak beyazlık vardır. Tarsi koyu kahverengi ve 6n ve orta tarsuslarda tarsomer I-III'de beyaz hakla vardır. Kanat damarları koyu ve aćık setalarla kaplıdır ve kanat kenarında 2 parlak beyaz benek belirgin 6zelliğidir (şekil 4.10).



şekil 4.8. *Anopheles hyrcanus* proboscis ve palplerin yapısı.



şekil 4.9. *Anopheles hyrcanus* scutum yapısı ve bant desenleri.



Şekil 4.10. *Anopheles hyrcanus* kanat beneklenmeleri ve tarsomer bantlanması.

#### 4.1.3. *Anopheles plumbeus* Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri

*An. plumbeus* larvaları, *Anopheles* cinsindeki diğer tüm Avrupa türlerinden, kısa frontal setalar (5-C-7-C) ile kolayca tanımlanabilir. Larvada baş oval ve koyu kahverengidir. Antenler baş uzunluğunun yaklaşık 1/3'i kadardır ve antenler düzdür, pürüzsüzdür ve spikül içermezler. Anten setası (1-A), antenin orta bölgesine yakın ya da hemen altındaki bir yerden çıkar ve oldukça küçük, dalsızdır. 2-C ve 3-C setaları ince ve seyrek olarak dallıdır. Seta 2-C'ler arasındaki uzaklık, 3-C setalarına olan uzaklık kadardır ya da biraz daha kısadır. Seta 4-C kısa ve dalsızdır.

*An. plumbeus* ergin dişileri daha küçük boyutu ve genel olarak daha koyu rengi ile *An. claviger*'den ayırt edilebilir. Thoraksın ve scutumun yan kısımları, siyahımsı kahverengidir ve scutumun soluk veya küllü griyimsi medyan kısmı ile ayrı bir kontrast oluşturmaktadır. Üstelik kanatları, *An. claviger*'in kanatlarına göre daha yoğun pul içermektedir ve daha koyu renktedir. Proboscis ve palplar siyahtır, palplar yaklaşık olarak sondan bir önceki apikal segmentin yarısı kadar veya proboscis ile aynı uzunluğa sahiptir. Pedisel kahverengi, filagellum siyah seta

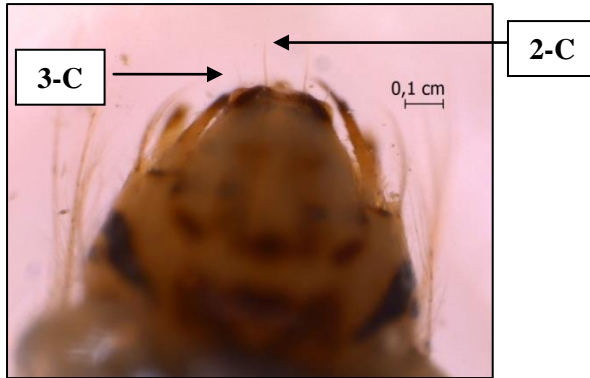
taşımakta ve koyu kahverengi renktedir. Vertexde, öne doğru yönelen dar, beyaz küme şeklinde pullar ve sarımsı uzun seta vardır. Skutumun yan kısımları, siyahımsı kahverengi olup, skutumun genişliğinin en az 1/3'ini kaplayan medyan gri bir şerit vardır. Bacaklar siyah veya siyahımsı kahverengidir. Kanatlarda lekelenmeler yoktur, yoğun koyu kahverengi pullar vardır ve kanattaki çapraz damarlar iyi ayrılmıştır. Abdomen siyahtır ve açık altın veya kahverengi renkli setalarla kaplıdır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Anopheles plumbeus* ergin dişide thoraks, proboscis ve palpler.

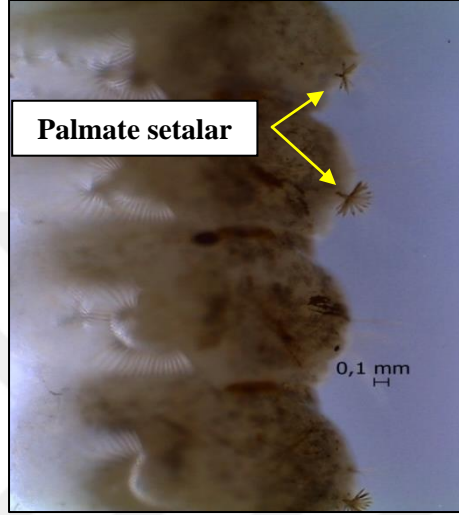
#### 4.1.4. *Anopheles superpictus* Türünün Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri

*An. superpictus* larvalarında 2-C setaları kısa dallar taşır. 3-C setaları ise 2-C setalarına göre daha kısa ve dalsızdır. 2-C setaları arasındaki mesafa 3-C setasına olan uzaklıktan daha büyüktür. Seta 5-C, seta 6-C'den belirgin bir şekilde daha uzundur (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Anopheles superpictus* larvasında 2-C ve 3-C setaları.

Abdomen seğmentleri II-VII'deki palmate setalar, iyi gelişmiş 13-19 yaprakçıkdan oluşur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Anopheles superpictus* larvasında abdomen II-VII'deki palmate setalar.

*An. superpictus* ergin dişilerinde kanatlarındaki ve bacaklarındaki beyazlığın oranıyla özellikle palplarının oranı bakımından değışkenlik gösteren bir türdür. Costa ve subcosta üzerindeki 4 beyaz beneğın uzunlukları değışkenlik gösterir. Proboscis koyu renklidir; palpomer III ve IV basalda ve apikalde beyaz bantlanmalara sahiptir ve palpomer V ise tamamen beyaz halka ile çevrelenmiştir. Scutumun uç kısmında grimsi orta büyüklükte bant görülür fakat scutum koyu renklidir ve scutellumda bazı beyaz kısımlar görülür (Şekil 4.14). Kanatın uç kısmındaki geniş şeritler açık beyaz renktedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. *Anopheles superpictus* ergin dişide thoraks, proboscis ve palpler.



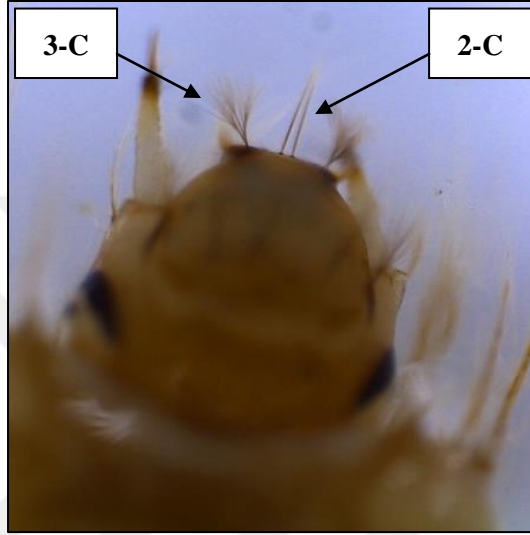
Şekil 4.15. *Anopheles superpictus* ergin dişide costa-subcostada beyaz bantlar.

#### 4.1.5. *Anopheles maculipennis* Kompleksi Türlerinin Morfolojik Teşhisi ve Özellikleri

*An. maculipennis* kompleksi türlerinden ülkemizde *An. sacharovi*, *An. melanoon* ve *An. maculipennis* türleri bulunmaktadır. Ancak kompleks türlerinin sibling tür grubu olması nedeniyle tür ayrımı gerek larva gerekse de erginlere ait morfolojik karakterler ile yapılamamaktadır. Kompleks üyelerinden *An. sacharovi* larva ve erginleri morfolojik olarak diğer türlerden bazı farklılıklar gösterse de, bu karakterler kullanılarak güvenilir olarak tür ayrımı yapmak da pek mümkün olamamaktadır. Türlerle ait yumurta morfolojisi özellikleri ise belirli bir düzeyde tür ayrımı yapmaya olanak sağlasa da her zaman örneklerden yumurta elde edebilmek mümkün değildir. Bu nedenle bu komplekse ait morfolojik değerlendirmeler genel olarak *An. maculipennis* kompleksi larva ve ergin dişi karakterleri olarak verilmiştir. Ayrıca, türlere ait yumurta morfolojisi özellikleri değerlendirilmiştir.

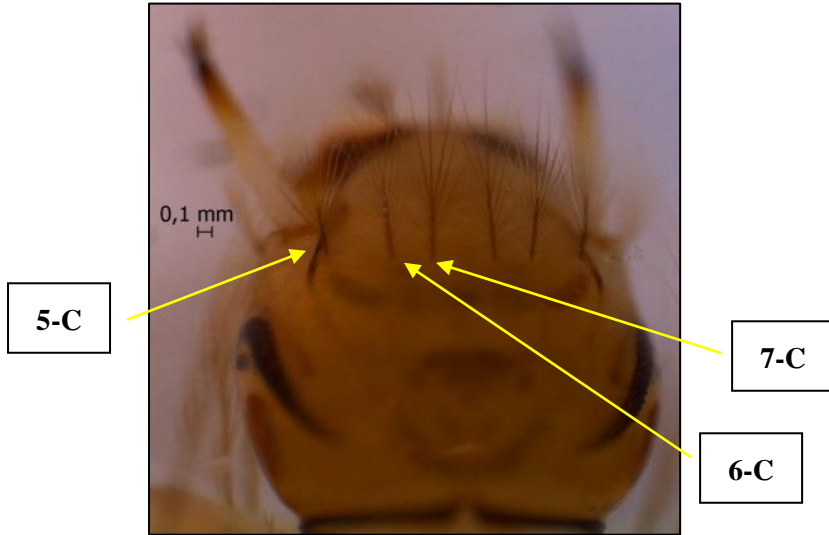
*An. maculipennis* kompleksi larvalarında başın uzunluğu genişliğinden fazladır. Antennal seta (1-A), anten kaidesinine yakın bir bölgeden çıkar ve küçüktür,

genellikle 4-6 dala sahiptir. 2-C setaları uzundur, apikalde dallıdır ve birbirine yakın konumdadır. 3-C setaları dendiriform yapıya sahiptir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *Anopheles maculipennis* kompleksi 4. evre larvasında 2-C ve 3-C setalar.

Frontal setalar (5-C, 7-C) uzun ve plumosedur (Şekil 4.17). Abdominal segment I ve II'deki palmate seta tam olarak gelişmezken, III-VII segmentlerinde iyi gelişmiştir ve 16-24 yaprakçıklıdır.



Şekil 4.17. *Anopheles maculipennis* kompleksi 4. evre larvasında 5-C- 7-C setalar.

*An. maculipennis* ergin dişilerinde proboscis koyu kahverengi ve palplar neredeyse proboscis uzunluğunda ve aynı renktedir (Şekil 4.18). Antenler kahverengi renktedir. Scutumun anteriorunda geniş grimsi bir şerit ve anteriorun ön yarısında genellikle 2-3 belirsiz kahverengimsi şeritler vardır (Şekil 4.19). Scutumun yan kısımlarından posterior kısım kahverengi, anterior kısım siyahımsı kahverengidir. Femora dorsal tarafta koyu kahverengi, ventral tarafta soluk kahverengi rengindedir. Tibya kahverengi renklidir ancak apsislerinde biraz daha soluk renktedir ve tarsi koyu kahverengi rengindedir. Kanatlardaki çapraz damarlara yakın kısımlarda, Rs'nin tabanında ve R2+3 ve M'nin dallanma gösterdiği kısımların yakınında düzensiz koyu lekeler vardır (Şekil 4.19). R2+3 ve M'deki dallanmalar kanat tabanından yaklaşık aynı mesafede bulunmaktadır

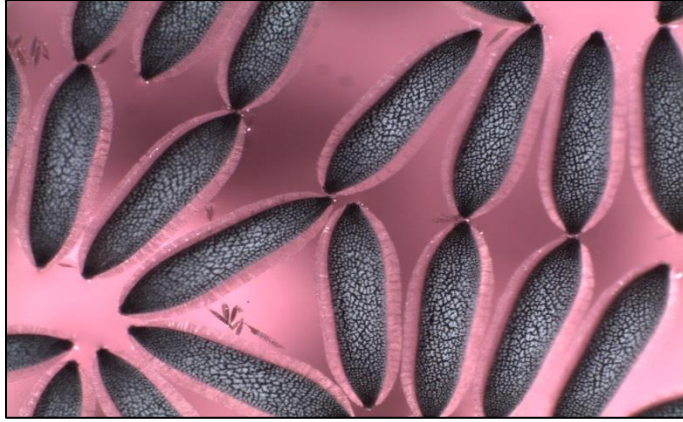


Şekil 4.18. *Anopheles maculipennis* ergin dişilerinde proboscis ve palplar.



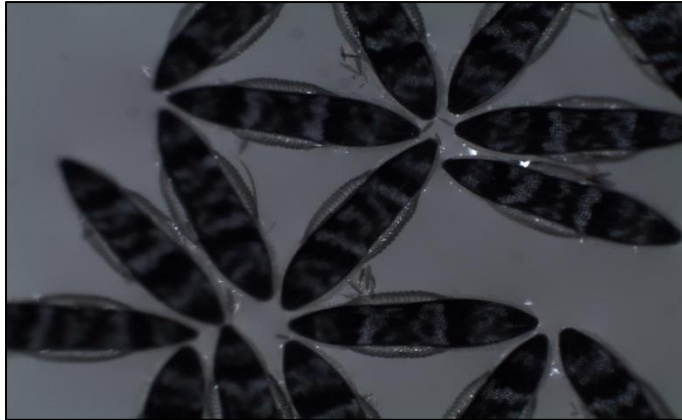
Şekil 4.19. *Anopheles maculipennis* ergin dişilerinde scutum (a) ve kanat beneklenmesi (b).

*An. maculipennis* kompleksi larva ve erginleri tür teşhisi için yeterli morfolojik özellik sağlamasa da kompleks türlerine ait yumurta morfolojisi özellikleri tür ayrımında belirli türler için yararlı olabilmektedir. Araştırmada elde edilebilen dişilerin tür teşhisleri yumurta morfolojisine göre yapılmış ve örnekler içerisinde *An. sacharovi*, *An. melanoon* ve *An. maculipennis* türleri tespit edilmiştir. *An. sacharovi* yumurtalarında yüzme yüzgeçleri diğer türlere göre az gelişmiştir. Yumurta koriyonunda siyah benek, bant ya da desen bulunmaz ve tek düze gri bir renk yapısı vardır (Şekil 4.20).



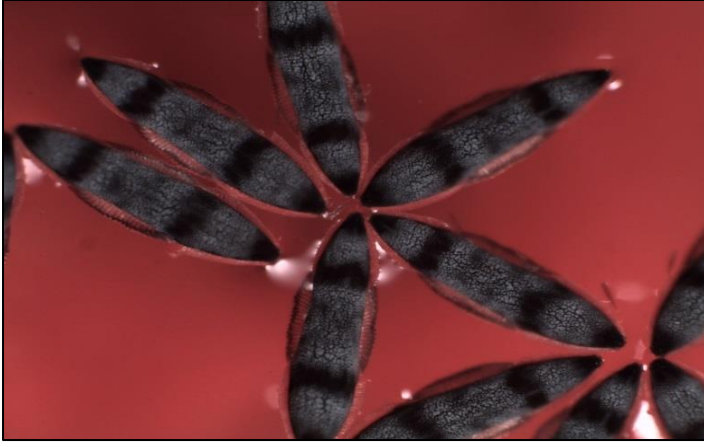
Şekil 4.20. *Anopheles sacharovi* yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı.

*An. melanoon* yumurtalarında yüzme yüzgeçleri iyi gelişmiştir ve belirgin olarak yumurta merkezinde daha büyüktür. Yumurta koriyonunda siyah benek ve bantlardan oluşan düzensiz ve karışık desen vardır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *Anopheles melanoon* yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı.

*An. maculipennis* yumurtalarında da yüzme yüzgeçleri iyi gelişmiştir ve belirgin olarak yumurta merkezinde daha büyüktür. Bu özelliğiyle *An. melanoon* ile benzerlik gösterse de yumurta koriyonundaki desen yapısı açıkça farklıdır. *An. maculipennis* yumurta koriyonunda her iki uçta siyah benek ve orta bölümün her iki yanında belirgin iki koyu bant vardır. Bant bölgeleri dışındaki bölgeler daha açık gri renk desenindedir.



Şekil 4.22. *Anopheles maculipennis* yumurtalarında yüzgeç ve koriyon yapısı.

## 4.2. DNA İzolasyonu ve COI ve ITS2 Gen Bölgesi Dizileri

Morfolojik tür tespitleri sonrası gerçekleştirilen moleküler çalışmalar sonucunda farklı türlere ait örneklerden toplamda 65 DNA izolasyonu yapılmıştır. Farklı lokalite örneklerinden izole edilmiş bu 65 DNA'nın tamamı *Anopheles* türlerinin mtDNA COI ve rDNA ITS2 gen bölgesi dizilerini elde etmek için kullanılmıştır. Fakat bazı DNA'lardan moleküler analizlerde kullanılabilecek uygunlukta ve güvenilirlikte COI ve ITS2 gen bölgesi dizileri elde edilememiştir. Bu yüzden hem ITS2 hem de COI gen bölgesi dizi sayısı, izolasyonu yapılmış olan DNA sayısından daha az olmuştur. Moleküler analizlerde toplamda 47 adet COI ve 34 adet ITS2 bölgesi dizisinden oluşan bir veri seti elde edilmiştir. *An. hyrcanus* ve *An. superpictus*'a ait olan DNA'lardan birçok farklı reaksiyon şartları denenmiş olmasına rağmen ITS2 gen bölgesi dizisi elde edilememiştir.

Elde edilen COI dizileri GenBank'ta bulunan *An. melanoon* (Azerbaycan, GenBank erişim numarası KM224658.1), *An. hyrcanus* (Çin, GenBank erişim numarası KU743223.1), *An. plumbeus* (Belçika, GenBank erişim numarası KM258215.1), *An. claviger* (Belçika, GenBank erişim numarası KM258240.1),

*An. maculipennis* (Belçika, GenBank erişim numaraları KM258235.1, KM258234.1), *An. sacharovi* (Azerbaycan, GenBank erişim numarası KM224664.1) ve *An. superpictus* (Tacikistan, GenBank erişim numaraları JX255703.1, JX255708.1, JX255706.1) DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

ITS2 dizileri GenBank'ta bulunan *An. melanoon* (Türkiye ve İtalya GenBank erişim numaraları JN112971.1, AY238410.1), *An. plumbeus* ( Rusya, GenBank erişim numarası AJ555483.1), *An. claviger* (İtalya, GenBank erişim numarası KP749460.1), *An. maculipennis* (İran, GenBank erişim numarası EF612527.1) ve *An. sacharovi* (Türkiye ve İran GenBank erişim numaraları JN112986.1, EU346655.1) DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan değerlendirmede PZR ile çoğaltılan COI gen bölgesine ait bölgede GC oranı *An. maculipennis* türünde % 31,63, *An. melanoon*'da % 32,06, *An. sacharovi*'de % 33,18, *An. claviger*'de % 32,13, *An. hyrcanus*'da % 31,08, *An. plumbeus*'de 32,48 ve *An. superpictus*'da % 31,87 olarak bulunmuştur. ITS2 gen bölgesine ait bölgede GC oranı ise *An. maculipennis* türünde % 51,37, *An. melanoon*'da % 50,56, *An. sacharovi*'de % 47,89, *An. claviger*'de % 55,11 ve *An. plumbeus*'de % 51,72 olarak bulunmuştur.

#### **4.3. Anopheles Türleri İçin Haplotip ( $H_d$ ), Nükleotit Çeşitliliği ( $\pi$ ) ve Nükleotit Farklılıklarının Ortalaması ( $K$ )**

Farklı türlere ait örneklerle yapılan çalışmalarda elde edilen COI gen bölgesi dizilerinin moleküler analizleri sonucunda 23 haplotip belirlenmişken, ITS2 bölgesi dizileri türlerin tamamında haplotip çeşitliliği vermemiş ve her bir tür için tek bir ITS2 bölgesi haplotipi tespit edilmiştir. COI gen bölgesi dizileri için haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid ( $\pi$ ) çeşitliliği ile nükleotit farklılıklarının ortalamaları ( $K$ ) hesaplanmış ve değerler (Çizelge 4.1) sunulmuştur. Elde edilen COI sonuçlarına göre türlerin haplotip çeşitliliği 0 ile 0.93333, nükleotid çeşitliliği ise 0 ile 0,01288 arasındaki değerlerde kalmıştır. En fazla haplotip çeşitliliği *An. superpictus* ( $H_d= 0.93333$ ) türünde tespit edilmişken, nükleotit farklılıklarının ortalaması diğer türlere göre düşük ( $K=1.80$ ) bulunmuştur. Buna karşılık nükleotit farklılıklarının ortalamasının en yüksek ( $K= 8.40$ ) olduğu tür ise *An. maculipennis* türü olmuştur. *An. plumbeus* türünde ise sadece tek bir COI haplotipi vardır ve haplotip çeşitliliği sıfırdır. *An. maculipennis* ve *An. claviger* türlerinde de haplotip çeşitliliği yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.1. *Anopheles* türlerinin mtCOI gen bölgesi için tespit edilen haplotip ( $H_d$ ) ve nükleotid çeşitliliği ( $\pi$ ), nükleotit farklılıklarının ortalaması ( $K$ ) değerleri.

Tür	Haplotip Çeşitliliği ( $H_d$ )	Nükleotid Çeşitliliği ( $\pi$ )	Nükleotit farklılıklarının ortalaması ( $K$ )
<i>An. claviger</i>	0,73333	0,00562	3,66667
<i>An. hyrcanus</i>	0,50000	0,00077	0,50000
<i>An. plumbeus</i>	0,00000	0,00000	0,00000
<i>An. maculipennis</i>	0,70000	0,01288	8,40000
<i>An. melanoon</i>	0,73333	0,00307	2,00000
<i>An. sacharovi</i>	0,70000	0,00399	2,60000
<i>An. superpictus</i>	0,93333	0,00276	1,80000

#### 4.4. *Anopheles* Türleri Arasında Genetik Uzaklık ve UPGMA Uzaklık Ağacı

Tür düzeyinde yapılan moleküler çalışmalardan elde edilen mtCOI geni verileri türlerin ikili (pairwise) karşılaştırılmalarında kullanılmış ve türler arasındaki moleküler uzaklık derecesini ifade eden  $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$ : değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

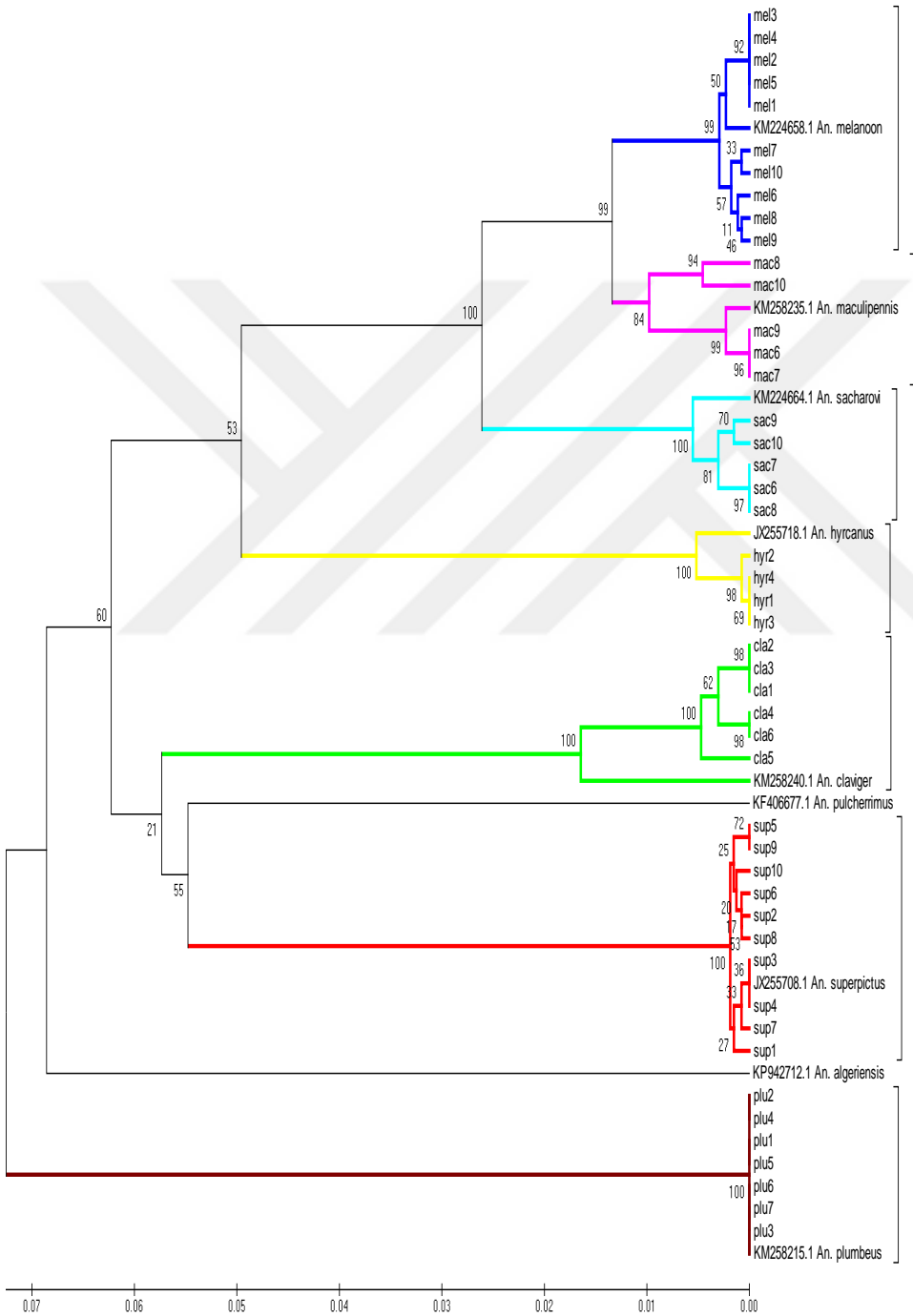
Türlerin ikili karşılaştırmaları sonucunda *An. sacharovi* ile *An. plumbeus* türleri arasında genetik olarak farklılaşmanın en fazla dolayısıyla birbirlerine en az benzeyen türler oldukları belirlenmiştir ( $\gamma_{ST}$ : 1,000). Genetik olarak farklılaşmanın en az dolayısıyla birbirlerine en fazla benzeyen türlerin ise *An. melanoon* ile *An. maculipennis* türleri olduğu belirlenmiştir. Bu iki tür *An. maculipennis* kompleksi içerisinde ve sibling türlerdir. Morfolojik benzerlik ile genetik benzerlik örtüşmüştür. Yine benzer şekilde *Maculipennis* kompleksi türlerinden *An. sacharovi* türünün, kompleksin diğer iki türü olan *An. maculipennis* ve *An. melanoon* türlerine olan genetik uzaklığı diğer türlerdeki genetik uzaklığından çok daha düşüktür. Dolayısıyla morfolojik olarak aynı olduğu kabul edilen bu üç türün birbirlerine olan genetik uzaklıkları da daha azdır. Diğer türlerde ise birbirleri arasındaki genetik uzaklıklar beklenildiği şekilde oldukça yüksektir.

Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda elde edilen mtDNA COI ve rDNA ITS2 geni haplotip frekansları, diğer ülkelerde aynı moleküler belirteçler ve türler için yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle birlikte değerlendirilmiştir. Böylece

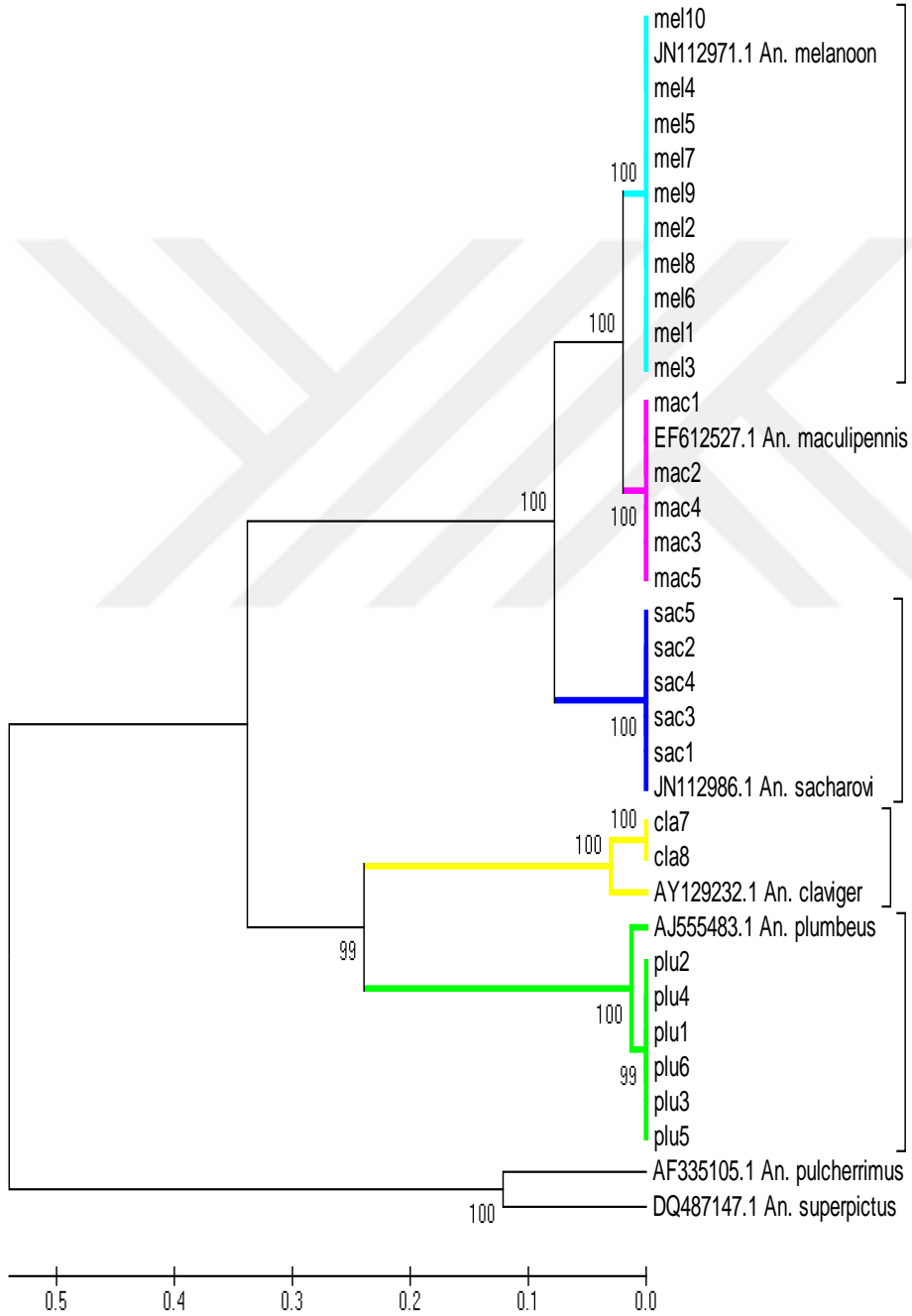
türler için haplotip frekanslarına dayalı  $\Gamma_{ST}$  ikili karşılaştırma değerleri kullanılarak MEGA 5 programıyla türlerin birbirlerine olan genetik uzaklıklarını gösteren UPGMA uzaklık ağacı hem COI geni için (Şekil 4.23) hem de ITS2 bölgesi (Şekil 4.24) için oluşturulmuştur. COI geni için oluşturulan UPGMA ağacında *Maculipennis* türleri aynı grup içerisinde yer almışken diğer türlerin her biri ayrı grup oluşturmuştur. GenBank verilerinden hedef türler için elde edilmiş olan veriler de COI geni için oluşturulan UPGMA ağacında tespit ettiğimiz her bir türle aynı dalda pozisyonlanmıştır. Benzer durum ITS2 bölgesi için oluşturulan UPGMA ağacında da gerçekleşmiştir. Çalışmalarımızda örneklenemediğinden COI gen bölgesi verisi de elde edilemeyen *An. algeriensis* ve *An. pulcherrimus* türleri için GenBank'tan elde edilen veriler de COI geni için oluşturulan UPGMA ağacında diğer türlerden ayrı olarak konumlanmıştır (Şekil 4.23).

Çizelge 4.2. COI geni verilerine göre *Anopheles* türlerinin ikili genetik uzaklık ( $F_{ST}$  ve  $\gamma_{ST}$ ) değerleri.

Türlerin İkili Karşılaştırılması	$\Gamma_{ST}$	$F_{ST}$
<i>An. hyrcanus</i> - <i>An. claviger</i>	0.93527	0.96608
<i>An. plumbeus</i> - <i>An. claviger</i>	0.96681	0.97822
<i>An. plumbeus</i> - <i>An. hyrcanus</i>	0.99653	0.99705
<i>An. maculipennis</i> - <i>An. claviger</i>	0.87300	0.91422
<i>An. maculipennis</i> - <i>An. hyrcanus</i>	0.87283	0.92294
<i>An. maculipennis</i> - <i>An. plumbeus</i>	0.93600	0.95205
<i>An. melanoon</i> - <i>An. claviger</i>	0.93508	0.96076
<i>An. melanoon</i> - <i>An. hyrcanus</i>	0.94520	0.97915
<i>An. melanoon</i> - <i>An. plumbeus</i>	0.97608	0.98890
<i>An. melanoon</i> - <i>An. maculipennis</i>	0.61645	<b>0.68862</b>
<i>An. sacharovi</i> - <i>An. claviger</i>	0.93402	0.95938
<i>An. sacharovi</i> - <i>An. hyrcanus</i>	0.95681	0.97440
<i>An. sacharovi</i> - <i>An. plumbeus</i>	<b>0.97954</b>	0.98495
<i>An. sacharovi</i> - <i>An. maculipennis</i>	0.76842	0.83631
<i>An. sacharovi</i> - <i>An. melanoon</i>	0.87836	0.92966
<i>An. superpictus</i> - <i>An. claviger</i>	0.93391	0.95945
<i>An. superpictus</i> - <i>An. hyrcanus</i>	0.95495	0.98275
<i>An. superpictus</i> - <i>An. plumbeus</i>	0.97690	0.98929
<i>An. superpictus</i> - <i>An. maculipennis</i>	0.90730	0.93401
<i>An. superpictus</i> - <i>An. melanoon</i>	0.95794	0.97613
<i>An. superpictus</i> - <i>An. sacharovi</i>	0.94996	0.97165



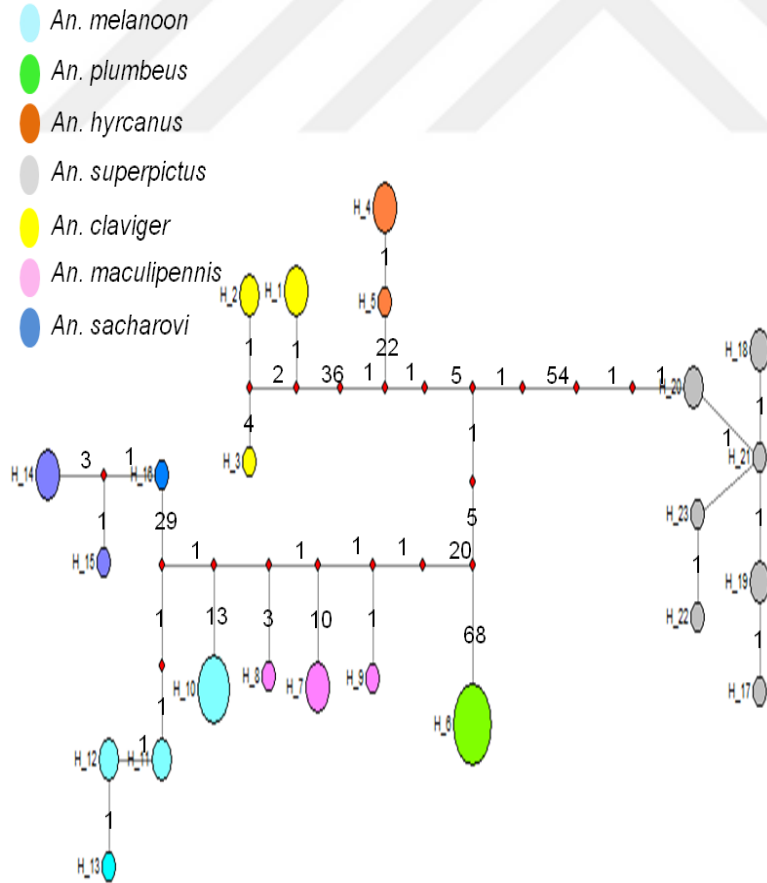
Şekil 4.23. *Anopheles* Türlerine göre mtDNA COI geni haplotip frekanslarının  $\Gamma_{ST}$  ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı.



Şekil 4.24. *Anopheles* Türlerine göre rDNA ITS2 geni haplotip frekanslarının Gamma<sub>ST</sub> ikili karşılaştırma değerlerine dayalı UPGMA uzaklık ağacı.

#### 4.5. *Anopheles* Türleri İçin Haplotip Ağacı

Çalışmalar sonucunda hizalanmış mtDNA COI geni dizi analizi veri setleri ile network 5.0.0.1 programı kullanılarak COI geni haplotipleri belirlenmiş ve böylece haplotip ağları oluşturulmuştur. mtDNA COI gen bölgesine ait analizler sonucunda *An. superpictus*'a ait barkodlanmış 10 örnekten 7 haplotip, *An. melanoon*'a ait barkodlanmış 10 örnekten 4 haplotip, *An. claviger*'e ait barkodlanmış 6 örnekten 3 haplotip, *An. sacharovi*'e ait barkodlanmış 5 örnekten 3 haplotip ve *An. maculipennis*'e ait barkodlanmış 5 örnekten 3 haplotip, *An. hyrcanus*'a ait barkodlanmış 4 örnekten 2 haplotip ve *An. plumbeus*'a ait barkodlanmış 7 örnekten 1 haplotip tespit edilmiştir. Ortaya çıkan haplotip ağı Şekil 4.25'de verilmiştir.



Şekil 4.25. *Anopheles* Türlerinin COI gen bölgeleri için elde edilen NJ ağacı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye yıllarca sıtmanın çok etkili olduğu bir ülke olarak sıtma eradikasyonu için önemli mücadeleler vermiştir. Yapılan bu mücadele çalışmalarında sıtma vektörü *Anopheles* türleri de doğal olarak önemli araştırma objesi olmuştur. Bu kapsamda Türkiye *Anopheles* türlerinin morfolojik özelliklerine göre tespiti, sıtma vektörü türlerin ve dağılım alanlarının belirlenmesi, biyolojileri, etolojileri ve ekolojileri kapsamında pek çok çalışma yapılmıştır.

Akalın (1936)'ın çalışmalarıyla *An. maculipennis* Meigen, 1818 kompleksine ait bazı türlerin varlığı bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda, yeni kayıtlar olarak *Anopheles* türleri tespit edilmiş ve Türkiye *Anopheles* faunası oluşturulmaya başlamıştır. Parrish (1959)'in Türkiye sivrisinek faunası kapsamında yapmış olduğu yayında, 13 *Anopheles* tür ya da alttürünün varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada *Anopheles maculipennis* kompleksi kapsamında yumurta morfolojisi özelliklerine göre *An. maculipennis*, *An. maculipennis melanoon* ve *An. maculipennis messeae* tespit edilmiştir. Gökberk (1961), Türkiye *Anopheles* faunasının *An. algeriensis*, *An. claviger*, *An. hyrcanus*, *An. marteri*, *An. sergenti*, *An. maculipennis*, *An. sacharovi*, *An. superpictus* ve *An. multicolor* türlerinden oluştuğunu bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca *An. sacharovi* türünün *An. maculipennis* kompleksinin diğer türlerinden bazı morfolojik özellikleriyle ayrılabilirdiğini tespit etmiş ve Türkiye'deki zoocoğrafik dağılımını bildirmiştir. Gökberk (1970) yılında bu listeye yeni bir tür kaydı olarak Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde tespit edilen *An. pulcherrimus* türünün varlığını bildirmiştir. Aynı yıl Gökberk ve Ramsdale (1970) tarafından yapılan çalışmada, *An. maculipennis*, *An. maculipennis melanoon* ve *An. maculipennis messeae* türlerinin Türkiye'deki varlığını analiz etmişlerdir. Ramsdale (1970)'in yapmış olduğu çalışmada *An. messeae* ve *An. subalpinus* türlerinin yumurta özelliklerinin çok benzediği ve dolayısıyla Türkiye'de bu türlerin hangisinin gerçekte var olduğunun belirlenmesinin önemli olduğunu vurgulamışlar ve çalışma sonucunda *An. subalpinus* türünün Türkiye'deki varlığı hem yumurta morfolojisine göre hem de sitogenetik özelliklerine göre ilk kez tespit edilmiştir. Böylece, Türkiye'de daha önce kaydı verilen *An. messeae* türünün şüpheli bir kayıt olabileceği sonucuna varmışlardır. Sonraki yıllarda, Postiglione vd., (1973) yaptıkları çalışmada, ülkemizdeki *Anopheles* cinsi türlerinin dağılımını ve daha önce varlığı bildirilen *Anopheles* türlerinin sistematik geçerliliğini tartışmışlardır. Bu çalışma sonucunda Türkiye *Anopheles* faunasının *An. marteri sogdianus*, *An. plumbeus*,

*An. claviver*, *An. algeriensis*, *An. maculipennis*, *An. subalpinus*, *An. sacharovi*, *An. hyrcanus*, *An. pulcherrimus*, *An. superpictus* türlerinden oluştuğu kabul edilmiştir. Türkiye’de daha önce kaydı verilen *An. melanoon* ve *An. messeae* türlerinin bulunmadığını ve bu kayıtların hatalı teşhisler sonucunda yapılmış olabileceğini vurgulamışlardır. Buna karşılık Erel, (1973)’in çalışmasında bu 10 türe ek olarak *An. multicolor*, *An. segentii* türleriyle *An. maculipennis messeae*, *An. maculipennis melanoon*, *An. hyrcanus mahmudi* alttürleri Türkiye faunası olarak sunulmuştur. Kasap ve Kasap (1983)’ın derleme çalışmasında da Postiglione vd., (1973)’de bildirilmiş olan 10 *Anopheles* türünün varlığı aynı şekilde bildirilmiş ve geçen 10 yıllık bir sürede Türkiye *Anopheles* faunasında bir değişiklik yapılmamıştır. Merdivenci (1984) ise Türkiye’de yapılmış olan pek çok çalışma sonuçlarını değerlendirmiş ve çalışmasında Türkiye *Anopheles* faunasının *An. maculipennis subalpinus*, *An. maculipennis melanoon*, *An. maculipennis sacharovi*, *An. marteri*, *An. plumbeus*, *An. claviger*, *An. algeriensis*, *An. hyrcanus*, *An. pulcherrimus* ve *An. superpictus* türlerinden oluştuğunu, *An. sergenti* ve *An. multicolor* türlerinin de Türkiye’de bulunabileceğini kabul etmiştir. Alten vd., (2000)’nin sıtma vektörleri üzerine yapmış oldukları derleme çalışmada da yine daha önce tespiti yapılan *An. marteri*, *An. plumbeus*, *An. claviver*, *An. algeriensis*, *An. maculipennis*, *An. subalpinus*, *An. sacharovi*, *An. hyrcanus*, *An. pulcherrimus* ve *An. superpictus* türleri *Anopheles* faunası olarak sunulmuştur. Bu kapsamda yapılan son derleme çalışmada (Ramsdale vd., 2001) da Alten vd., (2000)’de verilen tür listesine uygun olarak benzer türlerin varlığı bildirilmiştir. Ancak, bu son çalışmada *An. hyrcanus* türünün bir tür grubu olabileceği üzerinde durulmuş ve *An. melanoon*, *An. sergentii* ve *An. multicolor* türlerinin şüpheli ya da doğrulanmamış türler olduğu tespit edilmiştir. Kısaca özetlenen bu çalışmalar Türkiye *Anopheles* faunası kapsamında gerçekleştirilen morfolojik çalışmaların *An. algeriensis*, *An. claviger*, *An. superpictus* gibi türlerin morfolojik karakterleriyle pek çok çalışmada tespit edilebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, *An. maculipennis* kompleksi türlerinin ve *An. hyrcanus* grubu türlerinin kesin olarak ortaya koymakta yeterli olamamıştır. Benzer sistematik sorunlar Palearktik Bölgede birçok ülkede de yaşanmıştır ve 2000’li yıllardan sonra artan bir şekilde bu sorunların çözümünde moleküler tekniklerin yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Ülkemizde de bu kapsamda çalışmalar yapılmış ve moleküler teknikler kullanılarak Türkiye *Anopheles* türlerinin belirlenmesi ve yeniden değerlendirilmesi kapsamında çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan ilki Şimşek vd., (2011)’nin *An. maculipennis* kompleksi için yapmış oldukları

çalışmalardır. Bu çalışmada, Akdeniz Bölgesi'nden toplanan *Maculipennis* kompleksi örneklerinin ITS2 dizi verileri kullanılarak tür tespitleri yapılmıştır ve Akdeniz Bölgesi'nde *An. maculipennis s.s.*, *An. melanoon* ve *An. sacharovi* tanımlanmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'de *An. melanoon* türünün varlığı moleküler olarak ilk kez kesinleştirilmiştir. Sevgili ve Simsek (2012)'in çalışmasında ise örnekleme alanı genişletilmiş ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde 70 lokaliteden *An. maculipennis* kompleksine ait örnekler çalışmada kullanılmış ve elde edilen 200 ITS2 bölgesi dizileri GenBank'taki mevcut dizilerle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda da bir önceki çalışmada olduğu gibi örneklerin 106'sı *An. maculipennis s.s.*, 5'i *An. melanoon* ve 89'u *An. sacharovi* olarak tanımlanmıştır. Günay, (2015) çalışmasında COI gen dizi verilerini kullanarak Türkiye *Anopheles* faunası kapsamında daha önce tespit edilen türlerin dışında *An. messeae* türünün varlığını bildirmiştir. Morfolojik farklılık gösteren *An. hyrcanus* grubu örneklerin COI geni verilerine göre analizleri sonucunda *An. hyrcanus* ve *An. pseudopictus* taksonları tespit edilmiştir. Ancak, COI dizi verilerine göre hesaplanan taksonlar arasındaki genetik uzaklık (%1.4) olarak bulunduğu sonucunun *An. pseudopictus* taksonununun *An. hyrcanus* türünden ayrı bir tür olarak değerlendirmeye yeterli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu araştırmada ülkemizde bulunan *Anopheles* türlerine ait örnekler hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanarak analiz edilmiştir. Morfolojik değerlendirmelerde 4. evre larva örnekleri, ergin dişi örnekleri ve bazı türlerin yumurta örnekleri kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar kapsamında ise hem ITS2 bölgesi dizilerinden hem de COI geni dizilerinden oluşan veri setlerinden yararlanılmıştır. Ülkemizin farklı bölgelerinden örneklenmiş ve laboratuvar ortamında morfolojik incelenmeleri yapılan örneklerin *An. maculipennis* kompleksi örnekleri ile *An. plumbeus*, *An. claviger*, *An. hyrcanus* ve *An. superpictus* türlerine ait örnekler olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik değerlendirmeler sonucunda çalışmamızda, daha önceki çalışmalarda Türkiye'de varlığı bildirilmiş olan *An. marteri*, *An. algeriensis* ve *An. pulcherrimus* türlerine ait örneklerin toplanmadığı anlaşılmıştır. Bazı ergin dişi ve 4. evre larvaların morfolojik değerlendirmeleri sonucunda *An. claviger* türüne ait olduğu tespit edilen örneklerin diğer *Anopheles* örneklerinden kolaylıkla ayrıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte ülkemizde daha önce tespit edilmemiş olmasına rağmen *An. claviger* grubu üyesi olarak kabul edilen ve Batı Akdeniz Bölgesi'nde yayılım gösteren *An. petragani* Del Vecchio, 1939 örneklerinin örneklerimiz arasında

olup olmayacağı için daha detaylı karşılaştırmalar yapılmış ve 4. evre larva örnekleri incelenmesi sonucunda bu örneklerin tamamının *An. claviger* türüne ait örnekler olduğu bulunmuştur. *An. claviger* ve *An. petragrani* türleri morfolojik olarak 4. evre larvaların 4-C (Postclypeal seta) setası ve IV ve V abdomen segmentlerinin antepalpmate setalarıyla ayrılabilirlerdir. Bu değerlendirme sonucunda incelenen örneklerin tamamında 4-C ve antepalpmate setası özellikleri *An. claviger* morfolojik özellikleriyle uygun bulunmuş ve örnekler arasında *An. petragrani* türüne ait örnekler bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Becker vd., (2016)'nin Almanya'da elde ettikleri örneklerin morfolojik incelemeleri sonucunda hem *An. claviger* hem de *An. petragrani* türlerinin örnekleme alanında bulunduğunu tespit etmişlerdir ve simpatrik olarak bulunan örnekleri sadece 4. evre larvaların 4-C ve antepalpmate setası özelliklerine göre ayırabilmişlerdir. Zira bu iki tür ergin dişi ve erkek karakterleriyle morfolojik olarak ayıramamaktadır. Bununla birlikte, bu ayırt edici karakterler de bazı örneklerde çakışmaktadır. Bu nedenle de morfolojik teşhislerin moleküler teşhislerle doğrulanması gerekmektedir. Bu kapsamda yapılan en geniş kapsamlı çalışma Kampen vd., (2003) tarafından gerçekleştirilmiş ve Avrupa'nın bir çok ülkesi ile İsrail'den elde edilen *An. claviger* grubu örnekleri olarak ITS2 bölgesi dizi verilerinden yararlanılarak moleküler olarak analiz edilmiş ve örnekleme bölgelerinde *An. claviger* ve *An. petragrani* türlerinin dağılımını belirlemişlerdir. Becker vd., (2003)'de araştırma sonuçlarının moleküler verilerle destekleme gerekliliği nedeniyle morfolojik olarak tespit ettikleri *An. claviger* ve *An. petragrani* örneklerinin ITS2 bölgesi dizi verilerini de karşılaştırmışlar ve her iki türün de Almanya'da bulunduğunu kesinleştirmişlerdir. Bu çalışmada da, morfolojik olarak *An. claviger* türüne ait oldukları belirlenen örnekler moleküler analizlerde kullanılmış ve örneklerden elde edilen hem ITS2 hem de COI dizi verilerinin *An. claviger* için diğer çalışmalardan elde edilen ITS2 ve COI dizi verileriyle tamamen uyumlu bulunmuştur. Böylece ülkemizin çeşitli lokalitelerinden elde edilen örneklerin sadece *An. claviger* türüne ait olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde morfolojik (Ramsdale vd., 2001) ve COI dizi verileriyle moleküler (Günay, 2015) diğer değerlendirmelerde de ülkemizde sadece *An. claviger* türünün bulunduğu belirlenmiştir.

Ergin dişi ve 4. evre larvaların morfolojik değerlendirmeleri örneklerin bir kısmının *An. superpictus* türüne ait olduğunu göstermiştir. Bu örnekler özellikle de ergin dişi örnekleri diğer örneklerden kanat ve palpus karakterleriyle kolaylıkla

ayrılmıştır. Yapılan morfolojik değerlendirmeler sonucunda ergin örneklerinin diğer türlere ait örneklerle karıştırılmasının ve hatalı teşhis yapılmasının mümkün olmadığı sonucuna varılmıştır. Çünkü, *An. maculipennis* kompleksi türlerinin ya da *An. claviger* grubu türlerinin morfolojik olarak çok açık şekilde *An. superpictus* örneklerinden farklıdır. Buna karşılık eğer örneklenebilmiş olsaydı morfolojik karakterler açısından yapılan değerlendirmelerde *An. superpictus* türüne oldukça benzer olan *An. pulcherrimus* türü örneklerinin ayırımını yapmak diğer *Anopheles* örnekleri kadar kolay olmayacaktı. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda *An. superpictus* türüne benzerlikleri nedeniyle hatalı kayıtlarının verilmiş olduğunu düşündüğümüz *An. stephensi*, *An. sergentii* ya da *An. multicolor* türleriyle de *An. superpictus* örneklerinin karıştırılması olasıdır. Bu nedenle de, morfolojik olarak tespiti yapılan *An. superpictus* örneklerinin bir kısmı ile moleküler çalışmalar da yapılmış ve morfolojik olarak *An. superpictus* olarak tespit edilen örneklerin COI geni verilerine göre moleküler olarak da *An. superpictus* oldukları gösterilmiştir. Günay (2015)'in yaptığı çalışmada da *An. superpictus* örneklerinin COI geni verilerinin *An. stephensi* ve *An. pulcherrimus* türlerinin COI geni verilerinden tamamen farklı olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan İran'da morfolojik olarak çalışılan *An. superpictus* örneklerinin teşhis karakterlerinde önemli ölçüde varyasyonlar tespit edilmiştir (Oshaghi vd., 2008). Bu durum da *An. superpictus*'un bir tür grubu olabileceği düşüncesini ortaya çıkartmıştır. Bu nedenle İran'da farklı popülasyonların örnekleri için PZR-RFLP kullanılarak mtDNA COI-COII gen bölgelerinin moleküler analizleri yapılmıştır. Türlerin iki ayrı morfolojik biçimi (A ve B), tüm alanlarda simpatrik olarak bulunmuştur. *AluI* restirüksiyon enzimi ile çalışıldığında örneklerin en az üç genotipe (X, Y ve Z) ayrıldığı görülmüştür. DNA dizilerinin hizalanması sonucu genotipler arasındaki COI bölgesinde %12.3'lük bir varyasyon gözlemlenmiş ve İran'daki *An. superpictus* örneklerinin muhtemelen bir tür grubuna ait olduğu sonucuna varılmıştır (Oshaghi vd., 2008). Dolayısıyla, ülkemizde de benzer durumun söz konusu olabileceği öngörülerek daha fazla örnek ile *An. superpictus* için yeni morfolojik ve moleküler çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Hyrchanus grubunda yapılan çalışmalarla morfolojik olarak çok farklı karakter sergilemeyen ve bir kaçı sıtma vektörü olan 29 türün varlığı tespit edilmiştir. Bu tür grubunun *An. hyrcanus*, *An. pseudopictus* ve *An. chodukini* Martini türleri Batı Palearktik Bölge'de, diğerleri Doğu Palearktik ve Oriental Bölge'de bulunmaktadır (Harbach, 2004; Rueda, 2005). Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar

sonucunda da gruba dâhil dört türün İran'da, beş türün de Japonya'da bulunduğu saptanmıştır. Ülkemizde yapılan morfoloji temelli çalışmalarda sadece *An. hyrcanus* türü tespit edilmiştir (Parris, 1959; Postiglione vd., 1973; Kasap ve Kasap, 1983; Ramsdale vd., 2001). Ancak, morfoloji temelli çalışmalar tür örneklerinde önemli derecede varyasyonların olduğu belirtilmiş ve bu farklı morfolojik formları içeren bir şekilde '*An. hyrcanus*' şeklinde kullanım yapılmıştır (Ramsdale, 2001; Ramsdale vd., 2001). Bu çalışmada ise incelenen *An. hyrcanus* örnekleri morfolojik olarak diğer *Anopheles* türlerinden morfolojik olarak kolaylıkla ayrılmıştır. İncelenen örnek sayısı az ve Türkiye'nin çok farklı bölgelerinden örneklenmemiş olduğundan morfolojik formlar tespit edilmemiştir. Morfolojik tür tespiti yapılan örneklerden elde edilen COI geni dizi verilerin GenBank verileri ile karşılaştırmalarında da örneklerin *An. hyrcanus* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Fransa'da Poncon vd., (2008)'nin *An. hyrcanus* örnekleriyle yapmış oldukları çalışmalarda da farklı morfolojiye sahip örnekler elde edilmiş ve bu örneklerin moleküler ve morfolojik değerlendirilmesi sonucunda *An. pseudopictus* örneklerinin farklı bir tür olabilecek kadar moleküler farklılık göstermediği bulunmuştur. Günay (2015)'in ülkemizin farklı bölgelerinden elde ettiği örnekleri morfolojik olarak değerlendirdiği çalışmasında da hem *An. hyrcanus* türünü hem de *An. hycanus*'un farklı morfolojik özellikler gösteren ancak tür statüsüne yükseltilmemiş olan *An. pseudopictus* taksonunu belirlemiştir. Bu örneklerin moleküler değerlendirmesi sonucunda iki takson arasındaki genetik uzaklık %1.4 olarak bulunmuştur. Bu sonuç *An. pseudopictus* örneklerinin ayrı bir tür olarak tanımlanması için yeterli olmamıştır. Dolayısıyla, ülkemizde *An. hyrcanus* türünün farklı morfoloji gösteren popülasyonları için daha ayrıntılı morfolojik ve moleküler çalışmaların yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Ülkemizde *Anopheles founasini* tespiti için yapılan çalışmalarda en çok sistematik sorunla karşılaşılan tür grubu *An. maculipennis* kompleksi olmuştur. Yıllarca ülkemizde bu kompleksin hangi türlerinin mevcut olduğu ve bunların zoocoğrafik dağılım alanları ve sıtma vektörlüğü açısından önem dereceleri anlaşılammıştır. Yumurta morfolojisi özellikleri pek çok çalışmada tür ayırımında kullanılmış olsa da sonraki yıllarda yapılan çalışmaların hatalar içerdiği anlaşılmıştır. Akiner ve Caglar, (2010), Şimşek vd., (2011), Sevgili ve Şimşek (2012) ve Günay (2015)'in Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen *An. maculipennis* kompleksi örneklerinin morfolojik ve moleküler değerlendirilmeleri sonucunda *An. maculipennis*, *An. sacharovi*, *An. melanoon* ve *An. messeae*

türlerinin ülkemizde bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak, *An. messeae* örnekleri için elde edilen COI geni dizi verilerinin *An. daciae* türünün COI geni dizi verilerinden çok farklı olmaması nedeniyle hangi türün gerçekte ülkemizde var olduğu kesinleştirilememiştir. Bu çalışmada ise hem yumurta morfolojisi özelliklerine göre hem de ITS2 ve COI dizi verilerine göre *An. maculipennis*, *An. sacharovi*, *An. melanoon* türün varlığı gösterilmiştir. Yumurta morfolojisine göre *An. maculipennis* ve *An. sacharovi* örnekleri kolaylıkla ayrılabilir. Buna karşılık *An. melanoon* yumurtaları olarak tespit ettiğimiz *An. melanoon* yumurtaları başka çalışmalarda gösterilmiş olan *An. messeae* yumurtalarına daha çok benzemektedir. Ancak, çalışmamızda *An. messeae* yumurtalarına benzeyen yumurtaların elde edildiği dişilerin moleküler analizleri *An. melanoon* türünün dişileri olduklarını göstermiştir. Bu nedenle, yumurta morfolojisi özelliklerinin *An. maculipennis* kompleksi türlerinin ayırımında kısmen kullanılabilen bir özellik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Linton vd., (2007) tarafından Yunanistan *An. maculipennis* kompleksi türlerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 10 farklı kasabadan toplanan 257 örneğe ait ITS2 gen dizisi elde edilmiştir. Bu örneklerin moleküler tür tespitinde; 149 örneğin *An. maculipennis s.s.*, 23 örneğin *An. melanoon*, Florina bölgesinde 2 örneğin *An. messeae* ve 83 örneğin ise *An. sacharovi* olduğu belirlenmiştir. Romanya’da yapılan çalışmada; COI gen bölgesi baz alınarak ilk kez tanımlaması yapılmış olan *An. dacidae* ile *An. messeae* türü arasında genetik uzaklığın %1, *An. melanoon* ile *An. maculipennis* arasında ise % 3.4 olduğu saptanmıştır (Nicolescu vd., 2004). *An. messeae*, Paleartik Bölge’de kuzey bölgelerde bulunmaktadır (White, 1978; Ramsdale ve Snow, 2000). Bu yüzden bu türün Türkiye’deki Karadeniz Bölgesi’nde ve Trakya Bölgesi’nde var olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, *Maculipennis* kompleksi üyesi *An. daciae*, ilk olarak Romanya (Nicolescu vd., 2004) ve daha sonra İngiltere’den bildirilmiştir (Linton vd., 2005) fakat ülkemizde bulunamamıştır. Dolayısıyla, *An. maculipennis* kompleksinin bu iki türü için de ülkemizde daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği açıktır.

Sonuç olarak bu Yüksek Lisans Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler, Türkiye *Anopheles* faunasının tespiti için hem morfolojik hem de moleküler çalışmaların birlikte yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Özellikle, tür grupları için daha ayrıntılı ve kapsamlı örnekleme çalışmalarının yapılması, elde edilen örneklerin yakın coğrafyamızdaki türlere ait örneklerle karşılaştırılması ve ITS2, COI ve başka moleküler belirteçlerin birlikte kullanılarak analizi gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Akalın, M.S. 1936. Anadolu Maculipennis'leri. T.C. Merkez Hıfzısıhha Müessesesi Neşriyatı 3, Recep Ulusoğlu Basımevi, Ankara.
- Akiner, M.M., Çağlar, S.S. 2010. Birecik, Beyşehir ve Çankırı bölgelerinde *Anopheles maculipennis* grup türlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanarak araştırılması. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 34: 50-54.
- Aldemir, A. 1997. Mogan, Eymir Gölleri Çevresi ve İmrahor Vadisi'ndeki *Anopheles* ve *Aedes* (Diptera: Culicidae) Türlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, pp.127, Ankara.
- Aldemir, A., Boşgelmez, A., Çıngı, H. 2002. Gölbaşı Sivrisinekleri. Bizim Büro Basımevi, pp. 225, Ankara.
- Aldemir, A., Erdem, F., Demirci, B., Bedir, H., Koç, E., 2009. Species composition and seasonal dynamics of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in Kars plateau and six new records for Turkey. **5th Int. Cong. of Vector Ecology**, pp: 138, Antalya, Turkey.
- Alptekin, D. 1991. Arazi koşukkarında *Anopheles sacharovi* Favre ve Çukurova'da sık bulunan Culicinae (Culicidae: Diptera) türlerinin biyo-ekolojisi üzerine araştırmalar. Ç.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.
- Alptekin, D., Kasap, H. 1991. Çukurova'da sık bulunan Culicidae (Diptera) türlerinin gece beslenme aktiviteleri ve yoğunluğu. **Tr. Parazitol. Derg.**, 15: 137-143.
- Alten, B. 1993. Muğla İli, Ortaca ve Dalaman yörelerinde *Culex* türlerinin (Diptera: Culicidae) biyo-ekolojisi üzerine araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp.273 Ankara.
- Alten, B., Boşgelmez, A. 1996. Muğla İli, Ortaca ve Dalaman yörelerinde bulunan *Culex* (Diptera:Culicidae) türlerinin biyo-ekolojisi üzerine araştırmalar I. **Tr. J. of Zoology**, Ek Sayı 20: 27-51.

- Alten, B., Boşgelmez, A. 1997. Muğla İli, Ortaca ve Dalaman yörelerinde bulunan *Culex* (Diptera:Culicidae) türlerinin krepuscular-nocturnal davranışları, aktivasyon katsayıları ve vectör potansiyeli formülleri II. **Tr. J. of Zoology**, 21: 7-19.
- Alten, B., Çağlar, S.S. 1998. Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi. T.C. Sağlık Bakanlığı, Sıtma Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara.
- Alten, B., Çağlar, S.S., Özel, O. 2000. Malaria and its vectors in Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 7: 27–33.
- Alten, B., Çağlar, S.S., Simsek, F.M., Kaynas, S. 2003. Effect of insecticide-treated bednets for malaria control in southeast Anatolia-Turkey. **Journal Vector Ecology**, 28: 97–107.
- Al-Tikrity, A. B. 1964. The geographical distribution of *Anopheles* species and vectors of malaria in Iraq. **Bull. Endemic Dis. (Baghdad)**, 6: 91-117.
- Amerasinghe, F.P., Muktar, M., Herrel, N. 2002. Keys to the Anopheline mosquitoes (Diptera:Culicidae) of Pakistan. **J. Med. Entomol.**, 39 (1): 28-35.
- Amr, Z.S., Al-Khalli, Y., Arbaji, A. 1997. Larval mosquitoes collected from northern Jordan and the Jordan Valley. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 13: 375–378.
- Anthony, T.G., Harbach, R.E., Kitching, I.J. 1999. Phylogeny of the Pyretophorus Series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology**, 24: 193-205.
- Antonio-Nkondjio, C., Kerah, C.H., Simard, F., Awono-Ambene, P., Chouaibou, M., Tchuinkam, T., Fontenille, D. 2006. Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. **Journal of Medical Entomology**, 43: 1215-1221.
- Barber, M.A., Rice, J.B. 1937. A survey of malaria in Egypt. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 17: 413-436.

- Barkai, A., Saliternik, Z. 1968. Anopheline mosquitoes foundbreeding in Israel in 1963-1965 during the latest stage of the malaria eradication project. **Bulletin of Entomological Research**, 58 (2): 353-366.
- Bates, B.M. 1940. The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. **Annals Entomological Society of America**, 33: 343-356.
- Beatty, B.J., Marquardt, W.C. 1996. The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado, pp. 632, USA.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Dahl, C., Boase, C., Lane, J., Kaiser, A. 2003. Morphology, Ecology and Distribution of European Species. Mosquitoes and Their Control. ISBN 0-306-47360-7, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 191, New York.
- Becker, N., Pfitzner, W.P., Czajka, C., Kaiser, A., Weitzel, T. 2016. *Anopheles (Anopheles) petragrani* Del Vecchio 1939—a new mosquito species for Germany. **Parasitol Res.**, 115: 2671–2677.
- Boccolini, D., Di Luca, M., Marinucci, M., Romi, R. 2003. Further molecular and morphological support for the formal synonymy of *Anopheles subalpinus* Hackett and Lewis with *An. melanoon* Hackett. **European Mosquito Bulletin**, 16: 1–5.
- Bortel, W.V., Trung, H.D., Roelants, P., Harbach, R.E., Backeljau, T., Coosemans, M. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus s.l.* beyond distinguishing the members of the species complex. **Insect Molecular Biology**, 9: 335-340.
- Boşgelmez, A., Çakmakçı, L., Alten, B., Ayaş, Z., Işık, K., Sümbül, H., Kuytul, A., Koçal, A.Ş., Kaynaş, S., Temimhan, M., Şimşek, F.M. 1994. Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele. T.C. Turizm Bakanlığı Yayınlar Genel Müdürlüğü Altyapı Dairesi Başkanlığı, Yayın No: 1994-1, ISBN 975-7478-82-2, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Matbaası, pp. 759, Ankara.

- Boşgelmez, A., Çakmakçı, L., Alten, B., Kaynaş, S., Işık, K., Sümbül, H., Şimşek, F.M., Ayaş, Z., Temimhan, M., Göktürk, R.S., Savaşçı, S., Paslı, N., Kuytul, A., Koçal, A.Ş. 1995. Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele II. T.C. Turizm Bakanlığı Yayınlar Genel Müdürlüğü Altyapı Dairesi Başkanlığı, Yayın No: 1995-1, ISBN 975-7478-90-3, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Matbaası, pp.541, Ankara.
- Bullini, L., Coluzzi, M. 1978. Applied and theoretical significance of electrophoretic studies in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Parassitologia**, 20: 7-21.
- Chen, B., Butlin, R.K., Pedro, P.M., Wang, X.Z., Harbach, R.E. 2006. Molecular variations, systematics and distribution of the *Anopheles fluviatilis* complex in southern Asia. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 33-43.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer programme to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9: 1657–1660.
- Cohuet, A., F. Simard, J.C. Toto, P. Kengne, M. Coetzee, and D. Fontenille. 2003. Species identification within the *Anopheles funestus* group of malaria vectors in Cameroon and evidence for a new species. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 69: 200-205.
- Collins, F.H., Paskewitz, S.M. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology**, 5: 1–9.
- Demirhan, O., Kasap, M. 1995. Bloodfeeding behavior of *Anopheles sacharovi* in Turkey. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 2: 478–481.
- Demirhan, O., Kasap, M. 1996. Blood-sucking and parity rates of *Anopheles sacharovi* adults and seasonal densities of adult and pre adult population in Tarsus (Icel) region. **Tr. J. Zool.**, 20: 21–26.
- Dia, I., Konate, L., Samb, B., Sarr, J.B., Diop, A., Rogerie, F., Faye, M., Riveau, G., Remoue, F., Diallo, M., Fontenille. D. 2008. Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in

three physiographic zones in the Senegal River Basin. **Acta Tropica**, 105: 145-153.

Djadid, N.D., Gholizadeh, S., Tafsiri, E., Romi, R., Gordeev, M., Zakeri, S. 2007. Molecular indentification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. **Malaria Journal**, 6 (6): 1-10.

Dogan, H.M., Cetin, I., Egri, M. 2010. Spatiotemporal change and ecological modelling of malaria in Turkey by means of geographic information systems. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 104: 726–732.

Erel, D. 1973. Anadolu Vektörleri ve Mücadele Metotları. T.C. Sağlık ve Sosyal Yardımlaşma Bakanlığı, Hafzısıhha Okul Yayınları No: 47, pp.327, Ankara.

Falleroni, D. 1926. Fauna anofelica italiana e suo “habitat” (paludi, risaie, canali). Metodi di lotta contro la malaria. **Rivista di Malariologia**, 5: 553–593.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from Diverse Metazoan Invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 3(5): 294-299.

Fornadel, C.M., Norris, L.C., Norris, D.E. 2010a. Centers for Disease Control light traps for monitoring *Anopheles arabiensis* human biting rates in an area with low vector density and high insecticide-treated bed net use. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 838-842.

Fornadel, C.M., Norris, L.C., Glass, G.E., Norris, D.E. 2010b. Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern Zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 848-853.

Garros, C., Koekemoer, L.L., Coetzee, M., Coosemans, M., Manguin, S. 2004. A single multiplex assay to identify major malaria vectors within the African *Anopheles funestus* and the Oriental *An. minimus* groups. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70: 583-590.

- Gillies, M.T. 1964. The role of secondary vectors of malaria in north-east Tanganyika. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 58: 154-158.
- Gillies, M.T., DeMeillon, B. 1968. The Anophelinae South of the Sahara (Ethiopian Zoological Region). South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- Goff, G.L., Tsy, J.M., Robert, V. 2006. Molecular characterization of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Madagascar. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 259-260.
- Gökberk, C. 1970. 1st record of *Anopheles* in Turkey. *Anopheles pulcherrimus* Theobald 1902. **Türk Hij Tecr Biyol Derg.**, 30(1):20-7.
- Gökberk, M.D. 1961. *Anopheles sacharovi* (Favre 1903) in Turkey. **Mosquito News**, 21: 101-102.
- Gutsevich, A.V., Dubitzkiy, A.M. 1987. New species of mosquitoes in the fauna of the USSR. **Mosq. Syst**, 19: 1-92.
- Günay, F. 2015. Türkiye Sivrisinek Faunası Üzerine DNA Barkodlama Yöntemiyle Moleküler Analizler. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Hackett, L.W. 1934. The present status of our knowledge of the sub-species of *Anopheles maculipennis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 28 (2): 109-128.
- Hackett, L.W., Missiroli, A. 1935. The varieties of *Anopheles maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe. **Rivista di Malariologia**, 14: 45-109.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98.

- Harbach, R.E. 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, 94: 537-553.
- Harbach, R.E., Kitching, I.J. 2005. Reconsideration of Anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. **Systematics and Biodiversity**, 3: 345-374.
- Irdem, E. 1940. *Anopheles multicolor*, a mosquito new to Turkey. **Sihhiye Mecumasi**, 16: 86-94.
- Irdem, E. 1943. *Anopheles marteri*, a first record from Turkey. **Sihhiye Mecumasi**, 17: 440-442.
- Jarne, P., Lagoda, J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends Ecol. Evol.**, 11: 424-429.
- Jetten, T.H., Takken, W. 1994. A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. Anophelism without malaria in Europe. In: Annals of the Wageningen Agricultural University (Theo H., WilleM., Eds.), Wageningen Agricultural University Papers, pp. 54-155, the Netherlands.
- Kampen, H., Sternberg, A., Proft, J., Bastian, S., Schaffner, F., Maier, W.A., Seitz, H.M. 2003. Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger s.s.* and *Anopheles petragrani* (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 69(2): 195-199.
- Kasap, H., Kasap, M. 1983. Laboratory colonization of *Anopheles sacharovi*, the principal vector of human malaria in Turkey. **Mosquito News**, 43: 498-499.
- Kasap, H., Kasap, M. 1983a. Türkiye Anophelinae (Diptera: Culicidae) türleri. **Türkiye Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi**, 40(1): 39-52.
- Kasap, H., Kasap, M., Akbaba, M., Alptekin, D., Demirhan, O., Luleyap, U., Pazarbası, A., Akdur, R., Wade, J. 1992. Residual efficacy of pirimiphos

methyl (Actellic\_) on *Anopheles sacharovi* in Cukurova. Turkey. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 8: 47–51.

Kasap, H., Kasap, M., Alptekin, D., Lüleyap, U., Herath, P.R.J. 2000. Insecticide resistance in *Anopheles sacharovi* Favre in southern Turkey. **Bulletin of the World Health Organization**, 78: 686-692. Kasap, H., Kasap, M., Mimioglu, MM., Aktan, F. 1981. Çukurova ve çevresinde sivrisinek ve malaria üzerine araştırmalar. **Doğa Bilim Dergisi, Tip**, 5: 141-150.

Kasap, H., Kasap, M., Demirhan, O., Alptekin, D. 1987. Development of *Plasmodium vivax* in *Anopheles superpictus* under experimental conditions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42 (2): 117–124.

Kasap, M. 1979. Ankara Çevresinde Culicidae (Diptera) familyasına bağlı önemli türlerin ekolojisi üzerine çalışmalar. Hacettepe Üniversitesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Fakültesi, Doktora Tezi, pp. 137, Ankara.

Kasap, M. 1986. Seasonal variation in populations of *Anopheles maculipennis*, *Anopheles claviger* and *Culex pipiens* in Turkey. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 11: 11–14.

Kasap, M., Kasap, H. 1983b. Laboratory colonization of *Anopheles sacharovi*, the principal vector of human malaria in Turkey. **Mosquito News**, 43: 489–499.

Kettle, D. S. 1995. Medical and Veterinary Entomology. CAB International, pp. 725, UK.

Kent, R.J., Thuma, P.E., Mharakurwa, S., Norris, D.E. 2007. Seasonality, blood feeding behavior, and transmission of *Plasmodium falciparum* by *Anopheles arabiensis* after an extended drought in southern Zambia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76: 267-274.

Krzywinski, J., Wilkerson, R.C., Besansky, N.J. 2001. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. **Systematic Biology**, 50: 540-556.

- Lee, H., Lee, J.S., Shin, E.H., Lee, W.J., Kim, Y.Y., Lee, K.R. 2001. Malaria transmission potential by *Anopheles sinensis* in the Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**, 39: 1-10.
- Lehane, M. J. 1991. Biology of Blood-sucking Insects. Harper Collins Academic, pp. 288, UK.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452.
- Linton, Y.M., Lee, A.S., Curtis, C. 2005. Discovery of third member of Maculipennis group in SW England. **European Mosquito Bulletin**, 19: 5-9.
- Linton, Y.M., Samanidou-Voyadjoglou, A., Harbach, R.E. 2002a. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. **Insect Molecular Biology**, 11: 379-383.
- Linton, Y.M., Samanidou-Voyadjoglou, A., Smith, L., Harbach, R.E. 2001b. New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece based on DNA sequence data. **European Mosquito Bulletin**, 13: 31-36.
- Linton, Y.M., Smith, L., Harbach, R.E. 2002c. Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* Hackett and Lewis and *An. melanoon* Hackett. **European Mosquito Bulletin**, 13: 8-16.
- Linton, Y.M., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Samanidou-Voyadjoglou, A., Harbach, R.E. 2007. The *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Greece. **Journal of Natural History**, 41: 2683-2699.
- Luleyap, H., Alptekin, D., Kasap, H., Kasap, M. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. **Journal of Medical Entomology**, 39: 870-874.

- Marinucci, M., Romi, R., Mancini, P., Luca, D., Severini, C. 1999. Phylogenetic relationships of seven palearctic members of the *Maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis. **Insect Molecular Biology**, 8: 469-489.
- Marrelli, M.T., Floueter-Winter, M., Malafronte, R.S., Tadei, W.P., Olivera, R.L., Mendoza, C.F., Marinotti, O. 2005. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. **Medical and Bveterinary Entomology**, 19: 208-218.
- Marshall, J.C., Powell, J.R., Caccone, A. 2005. Short report: Phylogenetic relationships of the anthropophilic *Plasmodium falciparum* malaria vectors in Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 73: 749-752.
- Martens, P., Hall, L. 2000. Malaria on the Move: Human population movement and malaria transmission. **Emerging Infectious Diseases**, 6(2): 7-13.
- Martini, E., Missiroli, A., Hackett, L. W. 1931. Versuche zum Rassenproblem des *Anopheles maculipennis*. **Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene**, 35: 622-643.
- Merdivenci, A. 1984. Türkiye Sivrisinekleri. Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyo morfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılışı ve sağlık önlemleri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Yay. Rek. No.3215, Tas Matbaası, pp. 136-354, İstanbul.
- Mohanty, A., Swain, S., Kar, S.K., Hazra, R.K. 2009. Analysis of the phylogenetic relationship of *Anopheles* species, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) and using it to define the relationship of morphologically similar species. **Infect Genet Evolution**, 9: 1204-1224.
- Naddaf, S.R., Oshaghi, M.A., Vatandoost, H., Assmar, M. 2003. Molecular characterization of *Anopheles fluviatilis* species complex in the Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, 9: 31-39.
- Nicolescu, G., Linton, Y.M., Vladimirescu, A.F., Howard, T.M., Harbach, R.E. 2004. Mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae)

in Romania, with the discovery and formal recognition of a new species based on molecular and morphological evidence. **Bulletin of Entomological Research**, 94: 525–535.

- Norris, L.C., Norris, E.D. 2015. Phylogeny of anopheline (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. **Journal of Vector Ecology**, 40 (1) : 16-27.
- Oshaghi, M.A., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Shemshad, K.H., Pedram, M., Amani, H. 2008. The *Anopheles superpictus* complex: introduction of a new malaria vector complex in Iran. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, 101: 429–434.
- Özer, N., Alten, B., Çağlar, S.S. 2001. Distribution of malaria vectors in Turkey. **1<sup>st</sup> Balkan conference malaria and mosquito control**, pp. 56-61, Lithotopos, Serres, Greece.
- Parrish, D.W. 1959. The Mosquitoes of Turkey. **Mosquito News**, 19: 264-266.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., Vakalis, N.C. 2007. Molecular characterization of *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. **Medical Veterinary Entomology**, 21: 36-43.
- Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Vakalis, N. 2006. Presence of *Aedes albopictus* in Greece-Discrimination from endemic *Stegomyia* species. **15<sup>th</sup> European Sove Meeting**, pp.59, Serres, Greece.
- Pener, H., Kitron, J. 1985. Spatial and temporal changes in the distribution of *Anopheles sacharovi* in Israil. **Israil Journal Medical Entomology**, 22 (5): 536-543.
- Poncon, N., Toty, C., L'Ambert, G., Le Goff, G., Brengues, C., Schaffner, F., Fontenille, D. 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. **Malaria Journal**, 6: 18.
- Poncon, N., Toty, C., Kengne, P., Alten, B., Fontenille, D. 2008. Molecular evidence for similarity between *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) and *Anopheles pseudopictus* (Diptera: Culicidae) sympatric potential

vectors of malaria in France. **Journal of Medical Entomology**, 45: 576–580.

Postiglione, M., Smiraglia, B.C., Lavagnino, A., Gökberk, C., Ramsdale, C. 1970. A preliminary note on the occurrence in Turkey of the *An. subalpinus* form of the *An. maculipennis* complex. **Rivista Di Parassitologia**, 31: 155-159.

Postiglione, M., Tabanlı, B., Ramsdale, C. 1973. The *Anopheles* of Turkey. **Rivista Di Parassitologia**, 34: 127-159.

Postiglione, M., Tabanlı, S., Ramsdale, C.D. 1972. *Anopheles claviger* in Turkey. **Rivista di Parassitologia**, 33: 219-230.

Proft, J., Maier, W.A., Kampen, H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera:Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. **Parasitology Research**, 85: 837- 843.

Ramsdale, C.D. 1970. Ecological investigations of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. I. Dry season studies in villages near Kaduna, Nigeria. WHO/VBC/70.248 and WHO/Mal/70.735. II. Dry season studies with colony reared *An. gambiae* species B, Kaduna, Nigeria. WHO/VBC/70.249 and WHO/Mal/70.736.

Ramsdale, C.D. 2001. Internal taxonomy of the Hyrcanus Group of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and its bearing on the incrimination of vectors of malaria in the west of the Palaearctic Region. **European Mosquito Bulletin**, 10: 1-8.

Ramsdale, C.D., Alten, B., Çağlar, S.S., Özer, N. 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Turkey. **The European Mosquito Bulletin**, 9: 18-28.

Ramsdale, C.D., Haas, E. 1978. Some aspects of epidemiology of resurgent malaria in Turkey. **Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene**, 72: 570-580.

Ramsdale, C., Snow, K. 2000. Distribution of the genus *Anopheles* in Europe. **European Mosquito Bulletin**, 7: 1–26.

- Reinert, J. F. 2001. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 17(1): 51-55.
- Ribeiro, H., Ramos, H.C., Pires, C.A., Capela, R.A. 1980. Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera: Culicidae) IV- Two new anopheline records. **Garcia de Orta Ser. Zool.**, 9(1-2): 129-139.
- Romi, R., Boccolini, D., Hovanesyan, I., Grigoryan, G., Di Luca, M., Sabatinelli, G. 2002. *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae): a reemerging malaria vector in the Ararat valley of Armenia. **Journal of Medical Entomology**, 39: 446-450.
- Romi, R., Boccolini, D., Luca, M.D., Rosa, G.I., Marinucci, M. 2000. Identification of sibling species of *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. **Insect Molecular Biology**, 9: 509-513.
- Romi, R., Pierominici, G., Severini, C., Tamburro, A., Cocchi, M., Menichetti, D., Pil, E., Marchi, A. 1997. Status of malaria vectors in Italy. **Journal of Medical Entomology**, 34: 263-271.
- Rubio-Palis, Y. 1994. Variation of the vectorial capacity of some Anophelines in western Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50: 420-424.
- Rueda, L.M. 2005. Two new species of *Anopheles* (*Anopheles*) *Hyrceanus* Group (Diptera: Culicidae) from the Republic of South Korea. **Zootaxa**, 941:1-26.
- Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A., Wilkerson, R.C. 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Entomology**, 27: 361-382.
- Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Wilkerson, R.C. 2000. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. **Annals Entomological Society of America**, 93: 745-775.

- Schaffner, E., Raymond, M., Pasteur, N. 2000. Genetic differentiation of *Anopheles claviger* s.s. in France and neighbouring countries. **Medical and Veterinary Entomology**, 14: 264-271.
- Sedaghat, M.M., Linton, Y.M., Nicolescu, G., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos, A.K., Oshagi, M.A., Vatandoost, H., Harbach, R.E. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles) sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. **Systematic Entomology**, 28: 241-256.
- Sergieiev, V.P., Baranova, A.M., Orlov, V.S., Mihajlov, L.G., Koumetsov, R.L., Neujmin, N.I., Arsenieva, L.P., Shahova, M.A., Glagolova, L.A., Osipova, M.M. 1993. Importation of malaria into the USSR from Afghanistan, 1981-1989. **Bulletin of the World Health Organization**, 71: 385-388.
- Service, W.M. 1973. The bioogy of *Anopheles claviger* (Diptera: Culicidae) in southern England. **Bulletin of Entomological Research**, 63: 347-359.
- Sevgili, E., Şimşek, F.M. 2012. Distribution pattern and molecular identification of *Anopheles maculipennis* complex in eight river basins of Anatolia, Turkey. **North-Western Journal of Zoology**, 8 (2): 223-231.
- Snow, K.R. 1990. Mosquitoes. Naturalist's Hansbooks 14, Richmond Publishing Co., Ltd., pp. 66, England.
- Snow K.R. 1999. Malaria and mosquitoes in Britain: the effect of global climate change. **European Mosquito Bulletin**, 4: 17-25.
- Spillings, B.L., B.D. Brooke, L.L. Koekemoer, J. Chipwanya, M. Coetzee, and R.H. Hunt. 2009. A new species concealed by *Anopheles funestus* Giles, a major malaria vector in Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 81: 510-515.
- Stegnii, V. N., Kabanova, V. M. 1976. Cytological study of indigenous populations of the malarial mosquitoes in the territory of the USSR I. Identification of a new species of *Anopheles* in the Maculipennis complex by cytodiagnostic method. Medskaya **Parasitology**, 45: 192-198. English translation: **Mosquito Systematics**, 10(1): 1-12, 1978.

- Suzzoni-Blatger, J., Cianchi, R., Bullini, L., Coluzzi, M. 1990. Le complexe *maculipennis*: criteres morphologiques et enzymatiques de determination. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comperee**, 65: 37-40.
- Şahin, İ. 1983. Antalya ve çevresindeki sivrisinekler (Diptera:Culicidae) ve Filariose vektörü olarak önemleri üzerine araştırmalar I. Vektör sivrisinekleri belirlemek amacı ile yapılan çalışmalar. **Doğa Bilim Dergisi, Temel Bilim.**, 7: 107-114.
- Şahin, İ. 1984. Antalya ve çevresindeki sivrisinekler (Diptera:Culicidae) ve Filariose vektörü olarak önemleri üzerine araştırmalar II. Sivrisinek faunasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar. **Doğa Bilim Dergisi, A2**, 8 (3): 385-396.
- Şimşek, F.M. 1997. Gölbaşı İlçesi-Mogan-Eymir Gölleri'nde ve İmrahor Vadisi'nde *Culex* ve *Culiseta* (Diptera: Culicidae) Türlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, pp.155, Ankara.
- Şimşek, F.M. 2004a. Şanlıurfa İli Sınırları İçerisinde Bulunan Sivrisinek Türleri (Diptera: Culicidae) ve Sıtma Vektörlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 175, Ankara.
- Şimşek, F.M. 2006. Seasonal frequency and relative density of larval populations of mosquito species (Diptera: Culicidae) in the Sanliurfa province, Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, 30: 383–392.
- Şimşek, F.M. 2006. Şanlıurfa (Siverek)'da sıtma vektörü *Anopheles* (*Anopheles*) *claviger* (Diptera: Culicidae)'in ekolojik özellikleri üzerine araştırmalar. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 30 (2): 115-120.
- Şimşek, F.M., Kaynas, S., Alten, B., Çağlar, S.S. 2005. Laboratory colonization of the malaria vector *Anopheles* (*Cellia*) *superpictus* from Sanliurfa, Turkey. **European Mosquito Bulletin**, 19: 26–30.
- Şimşek, F.M., Kaynas, S., Toz, O.S., Ozbel, Y., Alten, B., Chan, A.S.T. 2010. Evaluation of the VecTest malaria antigen panel assay using *Anopheles*

*sacharovi* specimens in an endemic area, Sanliurfa province, Turkey. **Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 16: 231–234.

Şimşek, F.M., Ulger, C., Akiner, M.M., Tuncay Senol, S., Kiremit, F., Bardakci, F. 2011. Molecular identification and distribution of *Anopheles maculipennis* complex in the Mediterranean region of Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39: 258-265.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis version 5.0. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731-2739.

Templeton, A. R., Crandall, K. A., Sing, C. F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data, cladogram estimation. **Genetics**, 132: 619-633.

Torres, E.P., Foley, D.H., Bryan, H. 2006. Molecular systematics of Philippine malaria vector *Anopheles flavirostris*. **Medical and Veterinary Entomology**, 20: 44-52.

Van Thiel, P. H. 1933. Investigations on range and differentiation of *Anopheles maculipennis* races and their bearing on existence or absence of malaria in Italy. **Rivista di Malariologia**, 12: 281–318.

White, G.B. 1978. Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. **Mosquito Systematics**, 10: 3–44.

White, G.B., Magayuka, S.A., Boreham, P.F.L. 1972. Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae): binomics and vectorial activity of species A and species B at Segera, Tanzania. **Bulletin of Entomological Research**, 62: 295-317.

Yurttas, H., Alten, B. 2006. Geographic differantion of life table attributies among *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) populations in Turkey. **Journal of Vector Ecology**, 31: 275–284.

Zaim, M., Subbarao, S.K., Manouchehri, A.V., Cochrane, A.H. 1993. Role of *Anopheles culicifacies* s.l. and *An. pulcherrimus* in malaria transmission in Ghassreghand (Baluchistan), Iran. **Journal of the American Mosquito Control Association**, 9: 23–26.





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Çiler Köşlüoğlu  
Doğum Yeri Ve Tarihi : Aydın/Nazilli 25.04.1991

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Yabancı Diller : İngilizce

### İLETİŞİM

E-Posta Adresi : ciler09.1991@gmail.com  
Tarih :