

Sultan Sazlığı yöresinde sivrisinek türlerinde *Wolbachia* endobakterisinin moleküler yöntemlerle araştırılması ve genotiplendirilmesi*

Gamze YETİŞMİŞ, Önder DÜZLÜ, Alparslan YILDIRIM, Arif ÇİLOĞLU, Zuhâl ÖNDER, Abdullah İNCİ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Özet: Kayseri Sultan Sazlığı ekosisteminden toplanan 400 sivrisinek örneğinin 296'sı (%74.0) *Culex pipiens*, 63'ü (%15.75) *Aedes vexans* ve 41'i (%10.25) *Culiseta annulata* olarak belirlenmiştir. Ergin sineklerden bireysel DNA elde edilmiş ve *wsp* gen bölgesi yönünden PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. 119 (%40.2) *Cx. pipiens* dişisinde *Wolbachia* pozitifliği saptanırken, erkek *Cx. pipiens* örneklerinde pozitiflik belirlenmemiştir. *Ae. vexans* ve *Cs. annulata* örneklerinde de pozitiflik saptanmamıştır. *Wolbachia* pozitif örneklerden seçilen 10 izolatin filogenetik analizlerinde *EruWolCpip1-10* izolatları *Wolbachia* B süper grubu ve *wPip* grubu içinde belirlenmiştir. *EruWolCpip1-9* izolatlarının %100 identik oldukları ve *EruWolCpip10* izolatıyla %0.5 genetik farklılık gösterdikleri saptanmıştır. Daha önce Kayseri'de *Cx. pipiens*'ten izole edilmiş *WolKys1* ve Çankırı'da *Bovicola limbata*'dan elde edilmiş *TrERUWolLice1* izolatlarının, *EruWolCpip1-9* izolatlarıyla %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *EruWolCpip1-9* izolatlarının *wPip* grubundaki *Cx. pipiens*, *Peribadotes rhomboidaria*, *Agriocnemis femina femina* ve *Eurema hecabe Wolbachia* izolatlarıyla %100 benzer oldukları görülmüştür. *wPip* grubundaki genetik farklılık %0.28±0.11 belirlenirken, *wPip* grubu ile aynı süper gruptaki *Dei*, *Con* ve *Ori* grupları arasındaki genetik farklılık sırasıyla %16.9±2.3, %12.5±1.9 ve %19.9±2.5 bulunmuştur. A süper grubundaki *Haw*, *Riw*, *Mel*, *Aus*, *Mors*, *Uni*, *Pap* ve *Alba* grupları ile B süper grubundaki *wPip* grubu arasında genetik farklılık ise sırasıyla %23.5±3.0, %17.6±2.3, %19.1±2.5, %22.0±2.8, %21.0±2.7, %22.3±2.9, %22.0±2.8 ve %20.5±2.6 olarak saptanmıştır. Farklı coğrafyalardaki değişik artropodlarda aynı veya farklı süper gruplarda yer aldıkları belirlenmiş *Wolbachia* izolatları ile kendi izolatlarımız arasındaki genetik farklılığın önemli düzeyde olabileceği hipoteziyle yapılmış bu çalışma sonucunda, aynı grubun izolatları arasındaki farklılığın çok önemli olmadığı, ancak farklı süper gruplardaki izolatlar arasındaki genetik farklılığın bir hayli önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar hipotezimizi doğrular nitelikte bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Genotiplendirme, sivrisinek, Sultan Sazlığı ekosistemi, Türkiye, *Wolbachia*.

Molecular investigation and genotyping of *Wolbachia* endobacteria in mosquito species in Sultan Marshes region

Summary: Out of 400 mosquito specimens collected from Sultan Marshes ecosystem in Kayseri, 296 (74.0%) were identified as *Culex pipiens*, 63 (15.75%) as *Aedes vexans*, and 41 (10.25%) as *Culiseta annulata*. Individual DNA was extracted from adult mosquitos and PCR analysis was performed in terms of the *wsp* gene region. While *Wolbachia* positivity was detected in 119 (40.2%) female *Cx. pipiens*, none of the male *Cx. pipiens* specimens were positive. No positivity was detected in *Ae. vexans* and *Cs. annulata* samples. In the phylogenetic analyzes of the 10 isolates selected from *Wolbachia* positive samples, the *EruWolCpip1-10* isolates were clustered in the *Wolbachia* B supergroup and *wPip* group. It was found that *EruWolCpip1-9* isolates were 100% identical among themselves and these isolates genetically differed by 0.5% with *EruWolCpip10* isolate. The previous isolates of *WolKys1* isolated from *Cx. pipiens* in Kayseri region and *TrERUWolLice1* isolated from *Bovicola limbata* in Çankırı region have 100% similarity with *EruWolCpip1-9* isolates. It was also determined that the *EruWolCpip1-9* isolates were 100% identical with the *Cx. pipiens*, *Peribadotes rhomboidaria*, *Agriocnemis femina femina* and *Eurema hecabe Wolbachia* isolates in the *wPip* group. Furthermore, while the genetic difference within the *wPip* group was 0.28±0.11%, the genetic difference between the *Dei*, *Con* and *Ori* groups which placed in the same super group with the *wPip* group was found as 16.9±2.3, 12.5% ±1.9% and 19.9±2.5%, respectively. The genetic difference between *Haw*, *Riw*, *Mel*, *Aus*, *Mors*, *Uni*, *Pap* and *Alba* groups in the A super group, and the *wPip* group in the B super group were determined as 23.5±3.0%, 17.6±2.3%, 19.1±2.5%, 22.0±2.8%, 21.0±2.7%, 22.3±2.9%, 22.0±2.8% and 20.5±2.6%, respectively. This study was carried out with the hypothesis that the genetic difference between *Wolbachia* isolates obtained from different arthropod species in different geographical regions and classified in the same or different super groups, and our isolates may be significant. As a result, while the genetic difference between the isolates in the same groups was found less significant, the genetic difference in different super groups was determined much more significant. These results confirmed our hypothesis.

Keywords: Genotyping, mosquito, Sultan Marshes ecosystem, Turkey, *Wolbachia*.

* Bu çalışma aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup 25-29 Eylül 2017 tarihinde Eskişehir'de düzenlenen 20. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Parazitoloji kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Giriş

Wolbachia türleri, Rickettsiaceae familyasına ait gram negatif endosimbiont alfa protoebakterilerdir. Bu bakteriler insektlerde, araknidlerde, krustaselerde ve filaryal nematodlarda endosimbiont olarak bulunabilmektedir (39). İnsektlerdeki prevalans oranı oldukça yüksek olup insekt türlerinin yaklaşık %65'i bu bakteriyle enfektedir. *Wolbachia* türleri, konaklarının üreme sistemleri üzerine etki ederek sitoplazmik uyumsuzluk, partenogenezis, erkeklerde feminizasyon gibi etkilere sebep olmaktadır (4, 19, 28).

16S rDNA, protein-coding gen (*groEL*) ve *Wolbachia* surface protein (*wsp*) gen bölgelerine göre yapılan sınıflandırmada bu bakterinin, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* ve *Neorickettsia* türlerinin bulunduğu Anaplasmataceae ailesinde yer aldığı bildirilmiştir (28, 39). Filogenetik çalışmalarda *Wolbachia* soyunun "süper grup" olarak adlandırılan sekiz ana kümede (A-H) yer aldığı görülmüştür (26). A ve B süper gruplarının arthropodlarda (45), C ve D süper gruplarının filaryal nematodlarda (3), E süper grubunun kanatsız insektlerde (42), F süper grubunun termit ve akrep gibi arthropodlarda (2), G süper grubunun örümceklerde ve H süper grubunun ise termitlerde ve *Dipetalonema gracile*'de bulunduğu rapor edilmiştir (34, 36).

Bu çalışmada, farklı coğrafyalardaki aynı arthropod türlerinden izole edilmiş *Wolbachia* türlerinin genetik olarak birbirlerinden farklı olabileceği hipotez edilmiştir. Bu hipotez doğrultusunda, Kayseri Sultan Sazlığı ekosistemindeki sivrisinek türlerinde *Wolbachia* bakterisinin PZR ile araştırılması ve saptanan pozitif örneklerin *wsp* gen bölgesi yönünden moleküler analizlerinin yapılarak GenBank kayıtlarının gerçekleştirilmesi ve GenBank'ta Türkiye'den ve dünyadan daha önce bildirilmiş mevcut bazı *Wolbachia* izolatlarıyla olan filogenetik yakınlıklarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma sahası ve sivrisinek örneklerinin toplanması: Çalışmada, Kayseri yöresi Sultan Sazlığı ekosisteminde 2014 ve 2015 yıllarının Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında, her ay 2 kez 2 farklı odaktan olmak üzere 12 farklı noktadan toplam 400 sivrisinek örnekleme yapılmıştır. Ergin sivrisineklerin yakalanması amacıyla karbondioksitli (kuru buz hazneli) ışık tuzakları (All-Weather LED EVS Traps, 2780, BioQuip Products CA 90220, ABD) kullanılmıştır. Tuzaklar 17.³⁰-19.⁰⁰ saatleri arasında aktive edilmiş ve ertesi gün 07.⁰⁰-08.³⁰ saatleri arasında geri toplanmıştır.

Sivrisinek örneklerinin tür teşhisleri: Bilgisayar destekli stereo mikroskop (SZX16, Olympus, Japonya) altında tür ayırımına ilişkin çeşitli kaynaklar (15, 18, 23, 31) ve elektronik ortamda yazılı Avrupa Sivrisinekleri Tür

Ayırım Anahtarı (38) kullanılarak sivrisinek örnekleri teşhis edilmiştir.

DNA izolasyonu ve konsantrasyonların belirlenmesi:

Teşhis edilen sivrisinek örneklerinden bireysel olarak DNA ürünlerinin elde edilmesi amacıyla AxyPrep Multi-source Genomic DNA Miniprep kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, ABD) üreticinin açıklamalarına göre kullanılmıştır. Elde edilen örnekler moleküler analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA amplifikasyonu ve elektroforez: Elde edilen DNA örnekleri *Wolbachia wsp* gen bölgesinden yaklaşık 600 bp'lik gen bölgesini çoğaltan *wsp* 81F (5'-TGGTCCAAT AAGTGATGAAGAAAC-3') ve *wsp* 691R (5'-AAAAATTAA ACGCTACTCCA-3') primerleri (51) kullanılarak PZR reaksiyonuna tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda, 2.5 µl 10X PZR solüsyonu, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM her bir primer, 0.5 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD) ve 50ng/µl DNA olarak hazırlanmıştır. Termal döngü cihazında (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ısı profili; ön denatürasyon 94°C'de 5 dk 35 siklus, denatürasyon 94°C'de 1dk, bağlanma 55°C'de 1dk, uzama 72°C'de 1dk ve final uzama 72°C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır.

Wsp genlerinin klonlanması ve plazmid izolasyonu:

Wolbachia pozitif olduğu belirlenen örneklerden 10 tanesi seçilmiş ve DNA ürünleri plazmid aracılığıyla klonlanmıştır. Örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (K1231, Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Ticari kitin talimatları doğrultusunda hazırlanan karışımdan ligasyon ve transformasyon basamaklarını takiben LB katı besi yerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmidini içerip içermediğini anlamak için koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR'de pJET1.2 ileri (5'-CGACTCACTATAGG GAGAGCGGC-3') ve pJET1.2 geri (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') primerleri kullanılmıştır. Koloni PZR sonucu elde edilen ampikonlar %1.5'lük agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir. Pozitif bulunan kolonilerden plazmid izolasyonu için AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (AP-MD-P-25, Axygen, ABD) prosedürü takip edilmiştir. Saflaştırılan rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler (pJET1.2) ile PZR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval (ER0381, Thermo Scientific, ABD) ve XbaI (ER0681, Thermo Scientific, ABD) enzimleri kullanılmıştır.

Klonlanan *wsp* genlerinin tür tayini için sekans ve filogenetik analizleri: *Wsp* gen bölgesi için elde edilmiş olan plazmid DNA örneklerinin pJET1.2 ileri ve geri primerleriyle çift yönlü olarak MacroGen (Hollanda) firmasına sekansları yaptırılmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar quality (phred)

skorlarına göre Geneious 6.1.8 (24) programı ile dikkatlice analiz edildikten sonra aynı yazılım ile ileri ve geri dizilimlerin ikili kıyaslamaları yapılarak vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, hedef gen bölgesi belirlenmiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların Geneious 6.1.8 (24) genetik analiz yazılımı üzerinden blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak GenBank'ta mevcut homologları ile çoklu hizalama analizleri yapıldıktan sonra GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. Sekanslar arasındaki genetik uzaklıklar Mega 6.0.6 (41) programı kullanılarak kimura 2 parametre (K2P) modeli ile hesaplanmıştır. *Wolbachia* nesilleri arasındaki filogenetik yakınlıklar neighbor joining (NJ) metodu kullanılarak tahmin edilmiştir. NJ analizleri K2P doğrulama modeli (37) ile gerçekleştirilmiştir. NJ ağacının güvenilirliği Mega 6.0.6 (41) programı kullanılarak 1000 bootstrap replikasyon analizleriyle (14) belirlenmiştir.

Bulgular

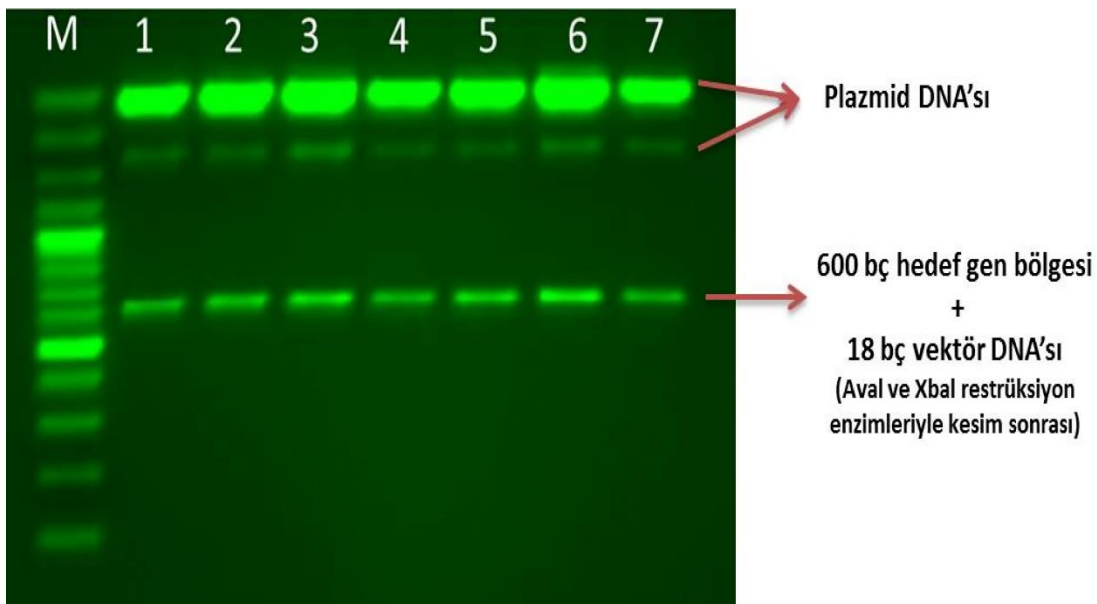
Teşhisi yapılan sivrisinek türleri ve *wsp* gen bölgesinin amplifikasyon sonuçları: Konvansiyonel PZR analizleriyle incelenen 400 sivrisinek örneğinde tespit edilen *Wolbachia* endobakterisinin dağılımı ve teşhisleri yapılan

sivrisinek türleri Tablo 1'de verilmiştir. Bireysel olarak incelemesi yapılan sivrisinek türlerinden sadece *Cx. pipiens* örneklerinde (119/296) %40.2 oranında *Wolbachia* pozitifliği belirlenmiştir. Pozitif belirlenen *Cx. pipiens* örneklerinin hepsi dişi sivrisineklerdir. İncelenen *Ae. vexans* ve *Cs. annulata* örneklerinin hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. Tür teşhisleri yapıp PZR analizleri sonucu *Wolbachia* pozitif belirlenen *Cx. pipiens* örneklerinden seçilen bazı izolatlardan *wsp* geninin amplifikasyonu sonucunda jel üzerinde yaklaşık 600 bç büyüklüğünde bant gösterdikleri tespit edilmiştir.

***Wsp* gen bölgesinin klonlama sonuçları:** LB katı besiyerinde üreyen kolonilerde hedef gen bölgesinin vektöre girdiği ve transformasyon etkinliği vektör spesifik primerlerle koloni PZR yapılarak teyit edilmiştir. Koloni PZR sonucu *wsp* gen bölgesine ait DNA'ların vektörlere başarılı bir şekilde girdiği görülmüştür. Koloni PZR sonuçlarını takiben plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş olup saflaştırılan plazmidlerin Aval ve XbaI enzimleriyle (Thermo Scientific, ABD) kesilmesi sonucu tek bir bant profili elde edildiği görülmüştür (Şekil 1). Böylece saflaştırılan rekombinant plazmidlerin klonlanan *wsp* genlerini içerdikleri doğrulanmıştır.

Tablo 1. İncelenen sivrisinek örneklerinde *Wolbachia* prevalansı.
Table 1. *Wolbachia* prevalence in the examined mosquito.

Sivrisinek Türü	İncelenen Örnek Sayısı		<i>Wolbachia</i> Yaygınlığı				Toplam
	Erkek	Dişi	Erkek		Dişi		
			n	%	n	%	
<i>Culex pipiens</i>	38	258	-	-	119	40.2	296
<i>Aedes vexans</i>	21	42	-	-	-	-	63
<i>Culiseta annulata</i>	13	28	-	-	-	-	41
Toplam	72	328	-	-	119	29.75	400



Şekil 1. Saflaştırılan plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu agaroz jelde kesim yerlerinin görünümü. M-Marker (100 bç); 1-7: Rekombinant plazmidler.

Figure 1. Appearance of restriction patterns of purified plasmids on the agarose gel. M-Marker (100 bp); 1-7 Recombinant plasmids.

	490	500	510	520	530	540	550	560
1. <i>Culex pipiens</i> (DQ842461)	AAAAGGAACCGAA			GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
2. <i>Culex pipiens</i> 2 (EF539842)	AAAAGGAACCGAA			GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
3. <i>Culex pipiens pallens</i> (X050185)				TCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
4. <i>Culex pipiens</i> 3 (KM401551)		GAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
5. <i>Culex pipiens</i> 4 (KM401555)		AGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
6. <i>Culex</i> (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip2</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
7. <i>Culex</i> 2 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip3</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
8. <i>Culex</i> 3 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip4</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
9. <i>Culex</i> 4 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip5</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
10. <i>Culex</i> 5 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip6</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
11. <i>Culex</i> 6 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip7</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
12. <i>Culex</i> 7 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip8</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
13. <i>Culex</i> 8 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip9</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
14. <i>Culex</i> 9 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip10</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
15. <i>Culex</i> 10 (<i>pipiens</i> <i>EruWolCpip1</i>)		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
16. <i>Aedes albopictus</i> _AF020059		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
17. <i>Agriocnemis femina femina</i> (Brauer)AY173941		AAAAGGAACCGAA		GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT			
18. <i>Cadra cautella</i> _AF020075	AGAAGACTGCGGAACTGATACAACCTGACCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT						
19. <i>Cadra cautella</i> _AF020076	ATCAGGAAAGGAC	AACATAGTCCCTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
20. <i>Culex pipiens</i> _AF020061	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
21. <i>Culex pipiens</i> _DQ900652	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
22. <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> _AF301012	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
23. <i>Culex quinquefasciatus</i> _AF020060	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
24. <i>Drosophila auraria</i> _AF020062	-AAAGCCACAGA	CATTTCATATCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
25. <i>Drosophila melanogaster</i> _AF020063	GAAAGCAAGAGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
26. <i>Drosophila melanogaster</i> _AF020064	GAAAGCAAGAGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
27. <i>Drosophila melanogaster</i> _AF020065	GAAAGCAAGAGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
28. <i>Drosophila sechellia</i> _AF020073	AGAAGACTGCGGAACTGATACAACCTGACCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT						
29. <i>Drosophila simulans</i> _AF020067	GAAAGCAAGAGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
30. <i>Drosophila simulans</i> _AF020068	AGAAGACTGCGGAACTGATACAACCTGACCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT						
31. <i>Drosophila simulans</i> _AF020069	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
32. <i>Drosophila simulans</i> _AF020070	-AAAGCCACAGA	CATTTCATATCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
33. <i>Drosophila simulans</i> (Noumea_strain)_AF020074	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
34. <i>Eurema hecabe</i> _AB278203	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
35. <i>Glossina austeni</i> _AF020077	AGCAGGAAAAGAA	AAGGATAGTCCCTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
36. <i>Glossina morsitans centralis</i> _AF020078	GAAAGCAATGGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
37. <i>Glossina morsitans morsitans</i> _AF020079	GAAAGCAATGGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
38. <i>Laodelphax striatellus</i> _AF020080	AAAGGAAAAGAA	AAGGATAGTCCCTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
39. <i>Muscidifurax uniraptor</i> _AF020071	GAAAGCAATGGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
40. <i>Nasonia vitripennis</i> _AF020081	GAAAGCAATGGT	GATTAAGTCCATTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
41. <i>Peribatodes rhomboidaria</i> _EU288014	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
42. <i>Phlebotomus papatasi</i> _AF020082	AGAAGACTGCGGAACTGATACAACCTGACCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT						
43. <i>Tagosodes orizicolus</i> _AF020085	ATCAGGAAAGGAC	AACATAGTCCCTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
44. <i>Tribolium confusum</i> _AF020083	AAAGGAAAAGAA	AAAGATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT						
45. <i>Trichogramma deion</i> _AF020084	AGCAAAAAGAC	AAGGATAGTCCCTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
46. <i>Culex pipiens</i> 5 (WolKys1_JX474753)	AAAAGGAACCGAA	GTTTCATGATCCTTTA	AAAGCATCTTTTATGGCTGGTGGTGCATTTGGTTAT					
47. <i>Aedes albopictus</i> _EU727139	CTCACTTGGATAGCGAACTACTGGTGCAGATAACAAAGTAGTACCAAAAGATGCATACAAAGTCTTTACAGCA							
48. <i>Trissolcus (rufiventris) HQ447079</i>	AGCTCGTTATTTGGCTCTTATGGTG							
49. <i>Trissolcus</i> 2 (<i>flavipes</i> HQ447078)	ATTTCTGGCTCTTATGGTG							
50. <i>Trissolcus</i> 3 (<i>grandis</i> HQ447075)	TCCGGCTCTTATGGTG							

Şekil 2. Sultan Sazlığı ekosisteminden toplanmış *Cx. pipiens* örneklerinde belirlenen *Wolbachia* izolatları ile Dünya'daki ve Türkiye'deki diğer bazı *Wolbachia* izolatlarının parsiyal *wsp* gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin hizalamaları.

Figure 2. Pairwise alignments of the nucleotide sequences for the partial *wsp* gene region of *Wolbachia* isolates in the *Cx. pipiens* samples collected from the Sultan Marshes ecosystem and some *Wolbachia* isolates in the world and Turkey.

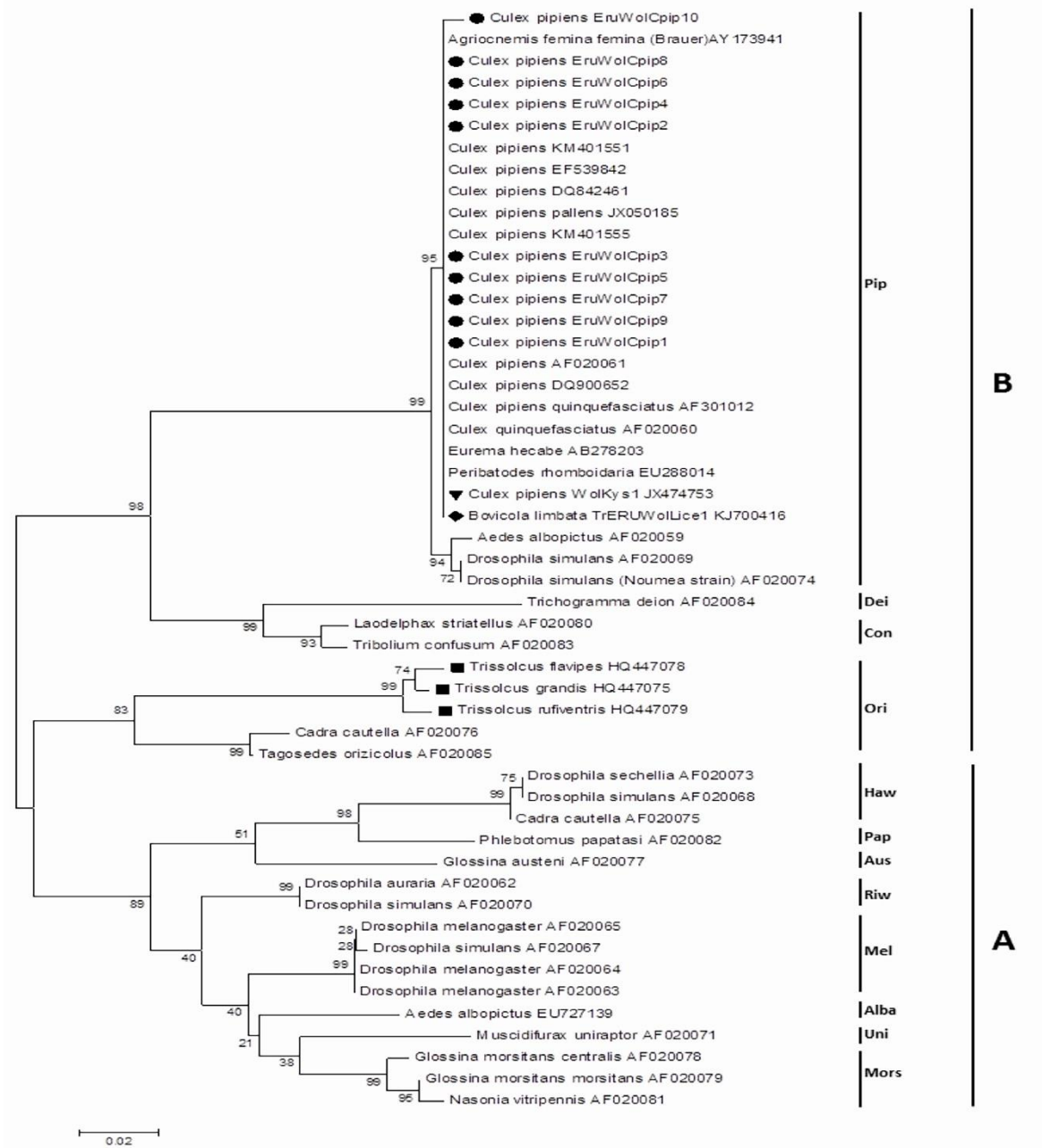
Wsp geninin sekans ve filogenetik analiz sonuçları:

Sekanslama sonucu *wsp* gen bölgesi yönünden sekansları belirlenen *Wolbachia* izolatlarının KT964223-KT964232 aksesyon numaralarıyla GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir. *Wsp* gen bölgesine göre farklı insekt gruplarında belirlenen *Wolbachia* nesilleri arasında bu nesilleri çeşitli gruplara ayıran nükleotid varyasyonları belirlenmiştir (Şekil 2). *Wolbachia* izolatlarının *wsp* gen bölgesine göre Neighbor joining metodu ile oluşturulan filogenetik ağacında (Şekil 3) Sultan Sazlığı ekosisteminden toplanmış *Cx. pipiens* örneklerinde belirlenen *Wolbachia* izolatlarının B süper grubu, *wPip* grubunda yer aldığı tespit edilmiştir. *EruWolCpip1-9* izolatlarının kendi aralarında %100 benzer oldukları ve bu izolatların *EruWolCpip10*

izolatıyla %0.5 genetik farklılık gösterdikleri saptanmıştır. Türkiye'den daha önce Kayseri yöresindeki *Cx. pipiens* örneğinden izole edilmiş ve GenBank'a girilmiş olan *WolKys1* (JX474753) izolatının *EruWolCpip1-9* izolatlarıyla %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde *EruWolCpip1-9* izolatlarının *wPip* grubunda yer alan *Cx. pipiens* (DQ900652, AF301012, AF020060-61), *Peribatodes rhomboidaria* (EU288014), *Agriocnemis femina femina* (Brauer) (AY173941) ve *Eurema hecabe* (AB278203) *Wolbachia* izolatlarıyla da %100 benzer oldukları belirlenmiştir. Daha önce Çankırı yöresindeki Ankara keçilerinden toplanmış *Bovicola limbata* bit örneklerinden izole edilmiş ve *wPip* grubunda yer alan *TrERUWolLice1* (KJ700416) izolatının da

EruWolCpip1-9 izolatlarıyla %100 benzerlik gösterdiği görülmüştür. WPip grubu içindeki ortalama genetik farklılık 0.28 ± 0.11 olarak belirlenirken, wPip grubu ile aynı süper grup (B) içerisinde yer alan Dei, Con ve Ori grupları arasındaki ortalama genetik farklılık ise sırasıyla

16.9 ± 2.3 , 12.5 ± 1.9 ve 19.9 ± 2.5 bulunmuştur. A süper grubunda yer alan Haw, RiW, Mel, Aus, Mors, Uni, Pap ve Alba grupları ile B süper grubundaki wPip grubu arasındaki genetik farklılık ise sırasıyla 23.5 ± 3.0 , 17.6 ± 2.3 , 19.1 ± 2.5 , 22.0 ± 2.8 , 21.0 ± 2.7 , 22.3 ± 2.9 , 22.0 ± 2.8 ve 20.5 ± 2.6 olarak saptanmıştır.



Şekil 3. Kayseri Sultan Sazlığı ekosistemindeki *Culex pipiens* örneklerinde saptanan *Wolbachia* izolatlarının *wsp* gen bölgesine göre filogenetik analizleri. Filogenetik ağaç Neighbor Joining-Kimura 2 Parameter modeli (1000 bootstrap) kullanılarak oluşturulmuştur. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir. ●: Sultan Sazlığı *Wolbachia* izolatları, ■: Türkiye’de *Trissolcus* türlerinde *Wolbachia* izolatı, ▼: Kayseri’de *Culex pipiens*’te *Wolbachia* izolatı, ◆: Kayseri’de *Bovicola limbata*’da *Wolbachia* izolatı. Figure 3. Phylogenetic analysis of the *wsp* gene from *Wolbachia* isolates in *Culex pipiens* of Sultan Marshes ecosystem in Kayseri. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method using the Kimura’s 2- parameter model with 1000 bootstrap. The scale bars in each panel indicate 0.02 substitutions per site. ●: *Wolbachia* isolates from Sultan Marshes, ■: *Wolbachia* isolates from *Trissolcus* species in Turkey, ▼: *Wolbachia* isolates from *Culex pipiens* in Kayseri region, ◆: *Wolbachia* isolates from *Bovicola limbata* in Kayseri region.

Tartışma ve Sonuç

Wolbachia endobakterisi insektleri patojenlere karşı koruyabilmekte ve konaklarının fizyolojilerini pozitif yönde etkileyebilmektedir. Buna karşın bu bakteriler insektlerin hastalık etkenlerini nakletme kapasitelerini de sınırlayabilmektedirler (21). Bu özelliklerinden ötürü son yıllarda vektör kontrolünde kullanıma potansiyelleri hakkında yapılmış çalışmalarda artış görülmüştür (8, 10, 43). Özellikle buldukları konakta sitoplazmik uyumsuzluk mekanizması sayesinde konaklarının üreme sistemlerinde değişikliklere sebep olmaktadır. Vektör kontrolünde potansiyel olarak üzerinde en çok durulan nokta insekt üreme sistemi üzerinde yapılan deneysel modifikasyon çalışmalarıdır (8, 22). Uyumsuz insekt tekniği olarak isimlendirilen metotta laboratuvar şartlarında *Wolbachia* ile enfekte olmayan dişi insektlerin enfekte erkeklerle çiftleştirildiklerinde embriyonik ölümlerin gerçekleştiği rapor edilmiştir (50). Enfekte ve enfekte olmayan insektlerden oluşan bir popülasyonda yalnızca enfekte dişiler başarılı bir şekilde enfekte veya enfekte olmayan erkeklerle çiftleşebilmektedir. Aynı şekilde farklı genotipteki *Wolbachia* suşlarını taşıyan insektler çiftleştiklerinde de sitoplazmik uyumsuzluk görülebilmektedir. Buna karşın çok çeşitli suşlarla süperenfekte dişi insektler bütün erkek insektlerle çiftleşebilmekte ve enfekte nesiller meydana gelebilmektedir (8, 43, 50). Yapılan çalışmalarda *Wolbachia* ile enfekte sivrisineklerde larva ve pupa gelişim sürelerinin, ergin sivrisineklerin vücut kütlelerinin ve kanatlarının gelişimlerinin olumsuz etkilendiği, doğurganlık ve fertilitelerinde azalmaların olduğu bildirilmiştir (8, 10, 43, 50). Vektör kontrolünde kullanılan geleneksel kontrol stratejilerinin (pestisit kullanımı, patojenlere karşı ilaç ve aşı kullanımı vb.) yanında daha düşük maliyetli ve daha çevreci bir yöntem olan *Wolbachia* ile enfekte insekt nesillerinin devamlılıklarının sağlanması da vektör kaynaklı patojenlerin endemik olduğu alanlarda kullanılabilir (22).

Wolbachia endosymbiontlarının en yaygın görüldüğü insekt türlerinden biri olan sivrisineklerde bu bakterinin genel olarak medikal öneme sahip olan *Cx. pipiens*, *Aedes albopictus* ve *Ae. aegypti* türlerinde görüldüğü rapor edilmiştir (1, 28, 32, 48). Ancak Tayland'da yapılan bir çalışmada (47) bu sivrisinek türlerinin yanı sıra daha önce bildirilmemiş *Ae. lineatopennis*, *Ae. vexans*, *Ae. vittatus*, *Cx. pallidothorax* ve *Cx. whitmorei* türlerinde de *Wolbachia* pozitifliği rapor edilmiştir. Dünya'da ve Türkiye'de sivrisineklerde *Wolbachia* türlerinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır. Behbahani (5) İran'da topladıkları 44 *Cx. pipiens quinquefasciatus* örneğinin tamamının *Wolbachia* ile enfekte olduğunu, 34 *Cx. tritaeniorhynchus* ve 20 *Cx. theileri* örneğinde ise enfeksiyon bulunmadığını rapor etmiştir. Güney Hindistan'da yapılan bir başka çalışmada Sunish ve ark. (40) PZR ile inceledikleri 750 ergin *Cx. pipiens quinquefasciatus* türünde %91.2 oranında

Wolbachia prevalansı bildirmişler ve sekans analizleri sonucu *Cx. quinquefasciatus Wolbachia* suşlarının *wsp* gen bölgesine göre farklı coğrafik bölgelerdeki *Cx. pipiens* izolatlarıyla %99 benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Fransa'nın dört farklı bölgesinden toplanan 178 *Cx. pipiens* örneğinin tamamının (%100) *wPip* grubu *Wolbachia* türleriyle enfekte olduğu rapor edilmiştir (12). Hindistan'da Ravikumar ve ark. (34)'nın 6 soydaki toplam 20 sivrisinek türünde yaptığı bir çalışmada *wsp* gen bölgesine özgü primerler kullanılarak PZR ile *Wolbachia* araştırması yapılmıştır. Çalışmada (34) *Aedes* soyundaki 5 türün %20'sinin, *Culex* soyundaki 8 türün %50'sinin, *Armigeres* soyundaki 2 türün tamamının (%100) ve *Toxorhynchites* soyundaki tek türün (%100) *Wolbachia* ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada (34) *Anopheles* ve *Lutiza* soylarındaki türlerin hiçbirinde ise *Wolbachia* enfeksiyonu saptanmadığı rapor edilmiştir. Kuzey Amerika'da yapılan benzer bir çalışmada ise 5 soydaki (20 *Aedes*, 19 *Anopheles*, 40 *Culiseta*, 135 *Culex* ve 82 *Ochlerotatus*) 14 sivrisinek türünde *Wolbachia* endobakterisi araştırılmıştır (33). Çalışmada incelenen 296 sivrisinek örneğinde *Wolbachia* enfeksiyonunun sadece *Cx. pipiens* türünde saptandığı (%45.6) bildirilmiştir (33). Kenya'nın farklı köylerinden toplanan *Anopheles*, *Mansonia*, *Aedes* ve *Culex* soylarındaki 9 sivrisinek türünde (toplam 165 örnek) *wsp* gen bölgesine göre PZR ile yapılan incelemede *Cx. quinquefasciatus* (10/24, %41.7), *Mansonia uniformis* (5/19, %26.3), *M. africana* (6/22, %27.3), *Ae. bromeliae* (12/16, %75) ve *Ae. metallicus* (1/2, %50) türlerinde *Wolbachia* enfeksiyonu saptandığı bildirilmiştir (29). Kittayapong ve ark. (25)'nin yaptığı çalışmada, yabani sivrisinek türlerinde *ftsZ* ve *wsp* gen bölgelerine göre PZR ile *Wolbachia* prevalansı araştırılmış ve 89 sivrisinek örneğinde %28.1 oranında pozitiflik belirlendiği rapor edilmiştir. Ricci ve ark. (35), İtalya ve Afrika'nın farklı bölgelerinden topladıkları farklı soylardaki toplam 4028 sivrisinek örneğinde (2479 *Culex* spp., 1186 *Aedes* spp., 359 *Anopheles* spp., 3 *Coquillettia richiardii*, 1 *Culiseta annulata*) 16S rRNA ve *wsp* gen bölgeleri açısından PZR ile *Wolbachia* varlığını araştırmışlar ve 29 *Ae. punctator*, 2326 *Cx. modestus*, 148 *Cx. pipiens*, 2 *Cx. torrentium* ve 3 *Coquillettia richiardii* örneklerinin tamamında *Wolbachia* pozitifliği saptamışlardır. Türkiye'de yapılmış tek çalışmada (49), Kayseri yöresinden toplanmış toplam 118 *Cx. pipiens* örneğinden oluşan genomik DNA havuzlarında *wsp* gen bölgesini amplifiye eden primerlerle PZR yapılmış ve havuzların %60'nın *Wolbachia* ile enfekte olduğu rapor edilmiştir. Mevcut çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, bu konuda yapılmış bazı çalışmalarda (29, 33, 34, 49) *Culex* soyundaki sivrisinek türlerinde saptanan *Wolbachia* prevalanslarıyla paralellik gösterdiği dikkati çekmiştir. Ayrıca, mevcut çalışmamızda incelenmesi yapılan 3 farklı soydaki (*Aedes*,

Culex, *Culiseta*) sivrisinek örneklerinden sadece *Cx. pipiens* örneklerinde *Wolbachia* pozitifliğinin saptanmasının, Rasgon ve Scott (33)'ın Kuzey Amerika'da yaptıkları çalışma sonucuyla birebir benzerlik gösterdiği görülmüştür. Ancak gerek mevcut çalışmamızda gerekse Rasgon ve Scott (33)'ın yaptıkları çalışmada *Wolbachia* pozitifliğine *Cx. pipiens* haricindeki diğer türlerde rastlanmamasının sebebinin, diğer türlerdeki örnek sayılarının *Cx. pipiens* örnek sayılarına oranla daha düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çeşitli insekt türleri üzerinde yapılmış bazı çalışmaların [örn, *Cx. pipiens* (6, 13); *Ae. albopictus* (9); *Drosophila simulans* (7); iki plant-hopper türü (27)] sonuçlarına benzer olarak *Cx. pipiens* türlerinde saptanan *Wolbachia* türleri sadece dişi bireylerde belirlenmişken erkek sivrisinek türlerinde pozitiflik bulunmamıştır. Dişi ve erkek sivrisineklerdeki bu farklılık çeşitli sebeplere bağlı olarak şekillenebilmektedir. Berticat ve ark. (6) bu durumun erkek ve dişi sivrisineklerin organlarının büyüklük farklılıklarından kaynaklandığını rapor etmiştir. Bir başka teori ise *Wolbachia* türlerinin yumurta yoluyla vertikal olarak nakledilmesi sonucu bu farklılıkların oluştuğudur (11).

Son yıllarda insektlerde *Wolbachia* endobakterisinin etkileri üzerine yapılan çalışmalar konusunda bir eğilim görülmektedir (1, 22, 29). Özellikle moleküler düzeydeki ilerlemelere bağlı olarak *Wolbachia* türlerinin dağılımları, moleküler karakterleri ve genetik farklılıkları konusunda güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *16S rRNA*, *orf7*, *ANK* ve *wsp* gibi gen bölgeleri üzerine yapılan çalışmalar, farklı konaklardaki *Wolbachia* suşlarının genotiplendirilmesi konusunda PZR tabanlı moleküler testlerin (konvansiyonel PZR, touchdown PZR, RT-PZR vb.) bu konuda kullanımının önünü açmıştır (29, 33, 44, 46, 51). Buna karşın *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *16S rRNA*, *orf7* ve *ANK* gen bölgelerinin, A ve B süper gruplarındaki farklı ve geniş *Wolbachia* gruplarının genotiplendirilmesinde yetersiz kalabildiği bildirilmiştir (45, 51). Bu gen bölgelerinin bu tür dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla özellikle son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanan *wsp* gen bölgesi ise farklı arthropod türlerindeki *Wolbachia* suşlarının moleküler sınıflandırılmasında çok fayda sağlamaktadır (51). *Wsp* geni diğer gen bölgelerine oranla farklı insekt türleri arasında çok daha yüksek oranda değişken bölgeler ihtiva etmektedir. Bu gen bölgesinden elde edilen sekanslar, *Wolbachia* suşları arasındaki evrimsel yakınlıkların saptanmasında çok daha bilgilendirici sonuçlar içermektedir (16, 51). Bunun yanında farklı insekt gruplarındaki *Wolbachia* türleri arasında, *wsp* gen bölgesinin 16S rRNA gen bölgesine göre 10 kat daha fazla filogenetik farklılık içerdiği rapor edilmiştir (29, 51). *Wsp* gen bölgesindeki yüksek düzeyli bu farklılıklar, *Wolbachia* suşlarının bireysel olarak ve/veya grup düzeyinde tanınmasını ve filogenetik yakınlıklarının belirlenmesini sağlayan spesi-

fik PZR primerlerinin dizayn edilmesine olanak sağlamaktadır (51). Çalışmamızda sivrisineklerdeki *Wolbachia* türlerinin genotiplendirilmesinde ve araştırılmasında, filogenetik analizlerdeki avantajları ve kolay kullanımı dolayısıyla *wsp* gen bölgesi tercih edilmiştir. Çalışmamızda, kendi *Wolbachia* izolatlarımız ile kıyaslama yapmak amacıyla filogenetik analizlere dahil ettiğimiz ve dünyadan daha önce sivrisinek, kız böceği, kelebek, bit, meyve sineği, arı, zirai böcekler, çebe sineği, tatarcık ve un böceği gibi farklı arthropodlardan bildirilmiş *Wolbachia* izolatlarının kullanılmasıyla oluşturulan filogenetik ağaçta A süper grubunda sekiz, B süper grubunda ise dört grup oluştuğu görülmüştür. Araştırma sahamız olan Sultan Sazlığı ekosistemindeki *Cx. pipiens* örneklerinden elde edilen *Wolbachia* izolatlarının (EruWolCpip1-10) B süper grubu, wPip grubunda yer aldığı saptanmıştır. Bu sonucun, B süper grubu wPip grubunda yer alan farklı coğrafik bölgelerdeki ve Türkiye'deki *Cx. pipiens* örneklerinde rapor edilen *Wolbachia* suşlarıyla uyumlu olduğu ve elde ettiğimiz tüm izolatların Dünya'dan ve Türkiye'den bildirilmiş benzer wPip grubu izolatlarla filogenetik olarak %99.5-100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir (1, 12, 30, 49, 51). Ayrıca yine sekanslarını elde ettiğimiz tüm izolatların Çankırı yöresindeki Ankara keçilerinden toplanmış *Bovicola limbata* bit örneklerinden elde edilmiş TrERUWolLice1 (KJ700416) izolatıyla da aynı wPip grubunda yer aldığı ve tüm izolatlarla %99.5-100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlarla Türkiye'de daha önce *Cx. pipiens* ve *Bovicola limbata* gibi insekt türlerinde yapılmış benzer çalışmaların (20, 49) paralellik göstermesi ve genotiplendirilmesi yapılan *Wolbachia* izolatlarının B süper grubu ve wPip grubunda bulunduğu belirlenmiş olması bu genotipin Türkiye'de farklı insekt gruplarında yaygın olabileceğini göstermektedir. A ve B süper gruplarında bulunan her grupta önemli düzeyde genetik farklılıkların bulunduğu, özellikle de B süper grubundaki türlerde A süper grubundakilere oranla genetik farklılığın çok daha önemli olduğu bildirilmiştir (51). Buna benzer şekilde çalışmamızda, wPip grubu içindeki ortalama genetik farklılık %0.28±0.11 olarak belirlenirken, wPip grubu ile aynı süper grup (B) içerisinde yer alan Dei, Con ve Ori grupları arasındaki ortalama genetik farklılık oldukça önemli (%16.9-19.9) bulunmuştur. Aynı şekilde A süper grubunda yer alan Haw, RiW, Mel, Aus, Mors, Uni, Pap ve Alba grupları ile B süper grubundaki wPip grubu arasındaki genetik farklılığın da yine önemli seviyede (%17.6-23.5) olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten EruWolCpip1-10 izolatlarımızın, Türkiye'den daha önce sünelerin (*Eurygaster integriceps*) doğal düşmanları olarak bilinen *Trissolcus rufiventris*, *T. flavipes* ve *T. grandis* türlerinden izole edilen *Wolbachia* izolatlarıyla (17) da önemli düzeyde genetik farklılık (%19.9±2.5) taşıdıkları saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla, Kayseri Sultan Sazlığı ekosistemindeki sivrisinek türlerinde *wsp* gen bölgesi yönünden *Wolbachia* endobakterisinin varlığı araştırılmış ve moleküler karakterleri ortaya konmuştur. Çalışmamızda *Wolbachia* bakterisi yalnızca *Cx. pipiens* türlerinde saptanmış, *Ae. vexans* ve *Cs. annulata* türlerinde ise bulunmamıştır. *Cx. pipiens* örneklerinden izole edilen *Wolbachia* izolatlarının *wPip* grubundaki izolatlarla filogenetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Sivrisineklerde hangi türlerin *Wolbachia* ile doğal enfekte olduğu ve enfeksiyon oranlarının seviyesi, farklı coğrafyalardaki enfekte sivrisineklerde *Wolbachia* endobakterisinin genetik farklılıklarının ne düzeylerde olduğu gibi konularda yapılan saha çalışmaları, vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde, özellikle sitoplazmik uyumsuzluk tabanlı kontrol stratejilerinin geliştirilmesine ve çözüme ulaşmada temel teşkil edecektir.

Teşekkür

Araştırmacılar, TYL-2014-5176 kod numaralı proje desteği için Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Almeida F, Moura AS, Cardoso AF ve ark. (2011): Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Infect Genet Evol*, **11**, 2138-43.
2. Baldo L, Prendini L, Corthals A ve ark. (2007): *Wolbachia* are present in southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Curr Microbiol*, **55**, 367-373.
3. Bandi C, Anderson TJ, Genchi C ve ark. (1998): Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc*, **265**, 2407-2413.
4. Barr AR (1980): Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens*. *L. Nature*, **283**, 71-72.
5. Behbahani A (2012): *Wolbachia* infection and mitochondrial DNA comparisons among *Culex* mosquitoes in South West Iran. *Pak J Biol Sci*, **15**, 54-57.
6. Berticat C, Rousset F, Raymond M ve ark. (2002): High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc Biol Sci*, **269**, 1413-16.
7. Bourtzis K, Dobson SL, Braig HR ve ark. (1998): Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature*, **391**, 852-853.
8. Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z ve ark. (2014): Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Trop*, **132**, 150-163.
9. Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR ve ark. (1999): *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol*, **29**, 153-160.
10. Doudoumis V, Alam U, Aksoy E ve ark. (2013): Tsetse-*Wolbachia* symbiosis: Comes of age and has great potential for pest and disease control. *J Invertebr Pathol*, **112**, 94-103.
11. Duron O, Labbe P, Berticat C ve ark. (2006): High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Evolution*, **60**, 303-314.
12. Duron O, Raymond M, Weill M (2011): Many compatible *Wolbachia* strains coexist within natural populations of *Culex pipiens* mosquito. *Heredity*, **106**, 986-993.
13. Echaubard P, Duron O, Agnew P ve ark. (2010): Rapid evolution of *Wolbachia* density in insecticide resistant *Culex pipiens*. *Heredity*, **104**, 15-19.
14. Felsenstein J (1985): Confidence intervals on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
15. Glick J (1992): Illustrated key to the female *Anopheles* of southwestern Asia and Egypt (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, **24**, 125-153.
16. Goward CR, Scawen MD, Murphy JP ve ark. (1993): Molecular evolution of bacterial cell-surface proteins. *Trends Biochem Sci*, **18**, 136-140.
17. Guz N, Kocak E, Akpınar E ve ark. (2012): *Wolbachia* infection in *Trissolcus* species (Hymenoptera: Scelionidae). *Eur J Entomol*, **109**, 169-174.
18. Harbach RE (1985): Pictorial keys to the genera of mosquitoes, subgenera of *Culex* and the species of *Culex* (*Culex*) occurring in southwestern Asia and Egypt, with a note on the subgeneric placement of *Culex deserticola* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, **17**, 83-107.
19. Hurst GDD, Jiggins FM, von der Schulenburg JHG ve ark. (1999): Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **266**, 735-740.
20. İnci A, Dik B, Mumcuoğlu YK ve ark. (2014): Detection and molecular characterization of the *Wolbachia* endobacteria in chewing lice species collected from the angora goats in Central Anatolia Region of Turkey. 5th International Conference on Phthiraptera, Utah, United States. 2-7 August, p.76.
21. Iturbe-Ormaeche I, Walker T, O'Neill SL (2011): *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep*, **12**, 508-518.
22. Johnson KN (2015): The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses*, **7**, 5705-17.
23. Kasap H, Kasap M (1983): Türkiye *Anophelinae* türleri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, **40**, 39-52.
24. Kearse M, Moir R, Wilson A ve ark. (2012): Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**, 1647-49.
25. Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V ve ark. (2000): Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, **37**, 340-345.
26. Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K ve ark. (2007): Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**, 654-657.
27. Noda H, Koizumi Y, Zhang Q ve ark. (2001): Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem Mol Biol*, **31**, 727-737.
28. O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM ve ark. (1992): 16srRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 2699-02.

29. **Osei-Poku J** (2012): *The evolution and genetics of vector competence in mosquito disease vectors*. PhD thesis, Clare College, University of Cambridge, Cambridge: 211.
30. **Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS ve ark.** (2003): *Detection and phylogenetic affiliation of Wolbachia sp. from Indian mosquitoes Culex quinquefasciatus and Aedes albopictus*. *Curr Sci*, **84**, 1136-39.
31. **Postiglione M, Tabanli S, Ramsdale CD** (1973): *The anopheles of Turkey*. *Rivista di Parassitologia*, **34**, 127-159.
32. **Rasgon JL, Scott TW** (2003): *Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in the californian Culex pipiens mosquito species complex: Parameter estimates and infection dynamics in natural populations*. *Genetics*, **165**, 2029-38.
33. **Rasgon JL, Scott TW** (2004): *An initial survey for Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. *J Med Entomol*, **41**, 255-257.
34. **Ravikumar H, Ramachandraswamy N, Sampathkumar S ve ark.** (2010): *A preliminary survey for Wolbachia and bacteriophage WO infections in Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. *Trop Biomed*, **27**, 384-393.
35. **Ricci I, Cancrini G, Gabrielli S ve ark.** (2002): *Searching for Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): Large polymerase chain reaction survey and new identifications*. *J Med Entomol*, **39**, 562-567.
36. **Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA** (2004): *Wolbachia pipientis in Australian spiders*. *Curr Microbiol*, **49**, 208-214.
37. **Saitou N, Nei M** (1987): *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol Biol Evol*, **4**, 406-425.
38. **Schaffner E, Angel G, Geoffroy B ve ark.** (2001): *The mosquitoes of Europe (CD-Rom)*. Institut de Resherche Pour le Développement, Montpellier, France.
39. **Sungpradit S, Nuchprayoon S** (2010): *Wolbachia of arthropods and filarial nematodes: Biology and applications*. *Chula Med J*, **54**, 605-621.
40. **Sunish IP, Rajendran R, Paramasivan R ve ark.** (2011): *Wolbachia endobacteria in a natural population of Culex quinquefasciatus from filariasis endemic villages of South India and its phylogenetic implication*. *Trop Biomed*, **28**, 569-576.
41. **Tamura K, Stecher G, Peterson D ve ark.** (2013): *MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Mol Biol Evol*, **30**, 2725-29.
42. **Vandekerckhove TT, Watteyne S, Willems A ve ark.** (1999): *Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium Wolbachia from then ovel host Folsomia candida (Hexapoda, Collembola) and its implications for Wolbachial taxonomy*. *FEMS Microbiol Lett*, **180**, 279-286.
43. **Walker T, Moreira LA** (2011): *Can Wolbachia be used to control malaria?* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **106**, 212-217.
44. **Walker T, Klasson L, Sebahia M ve ark.** (2007): *Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of Wolbachia from the Culex pipiens group*. *BMC Biol*, **5**, 39.
45. **Werren JH** (1997): *Biology of Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, **42**, 587-609.
46. **Werren JH, Windsor DM** (2000): *Wolbachia infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium?* *Proc R Soc Lond B*, **267**, 1277-85.
47. **Wiwatanaratnabutr I** (2013): *Geographic distribution of wolbachial infections in mosquitoes from Thailand*. *J Invertebr Pathol*, **114**, 337-340.
48. **Yen JH, Barr AR** (1971): *New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in Culex pipiens*. *L. Nature*, **232**, 657-658.
49. **Yıldırım A, İnci A, Duzlu O ve ark.** (2013): *Detection and molecular characterization of the Wolbachia endobacteria in the Culex pipiens (Diptera: Culicidae) specimens collected from Kayseri province of Turkey*. *Vet J Ankara Univ*, **60**, 189-194.
50. **Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I ve ark.** (2009): *Incompatible insect technique: incompatible males from a Ceratitiscapitata (Diptera: Tephritidae) genetic sexing strain*. *Entomol Exp Appl*, **132**, 232-240.
51. **Zhou W, Rousset F, O'Neill SL** (1998): *Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences*. *Proc R Soc Lond Ser B*, **265**, 509-515.

Geliş tarihi: 02.02.2017 / Kabul tarihi: 28.07.2017

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye.
e-mail: onderduzlu@erciyes.edu.tr