

Kayseri yöresinde *Culex pipiens* biyotipleri ve *Culex torrentium*'un Real time PCR ile araştırılması ve moleküler karakterizasyonu*

Gözde ŞAHİNGÖZ DEMİRPOLAT, Abdullah İNCİ, Alparslan YILDIRIM, Önder DÜZLÜ, Zuhul ÖNDER, Arif ÇİLOĞLU

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

Özet: Bu çalışmada, Haziran-Ağustos 2014 tarihleri arasında Kayseri yöresinde çeşitli bölgelerden toplanmış sivrisinek örneklerinde *Culex pipiens* kompleks biyotipleri ve *Cx. torrentium* moleküler olarak araştırılmıştır. Saha çalışmaları boyunca toplam 1052 dişi sivrisinek örnekleme yapılmış ve bunların 315'i (%29.9) morfolojik teşhis analizleriyle *Cx. pipiens* kompleks ve/veya *Cx. torrentium* olarak teşhis edilerek ayrılmıştır. Ayrılan örneklerle ait genomik DNA izolatlarının ilk basamak Real time PCR analizlerinde tamamının *Cx. pipiens* kompleks nesillerine ait oldukları saptanmış, *Cx. torrentium* pozitifliği belirlenmemiştir. İkinci basamak Real time PCR analizlerinde *Cx. pipiens* komplekste belirlenen izolatların, 311'inin *Cx. pipiens* form *pipiens* nesillerine ait oldukları tespit edilmiş, *Cx. pipiens* form *molestus* pozitifliği görülmemiştir. Kalan 4 örnek, analizlerde her iki biyotip yönünden de amplifikasyon göstermemiştir. Real time PCR sonuçlarının konfirmasyonu ve hibrit nesillerin araştırılması amacıyla tüm örneklerle ait izolatların ACE-2 ve CQ11 microsatellite DNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde *Cx. pipiens* form *pipiens* olarak belirlenen tüm izolatların ilgili DNA markerları ile *pipiens* biyotipine özgü bant profilleri sergilediği görülmüş ve izolatların konfirmasyonu sağlanmıştır. Real time PCR analizlerinde biyoformlar yönünden amplifikasyon göstermeyen 4 izolatın microsatellite DNA analizleriyle *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* hibritleri oldukları tespit edilmiştir. *Cx. pipiens* form *pipiens* ve hibrit nesillere ait birer izolatın mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gen bölgesine göre barkodlaması yapılmış ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki izolatın sekans analiz sonuçlarına göre yeni bir haplotip oldukları belirlenmiş ve haplotip bazında *Cx. pipiens* komplekse ait GenBank'ta kayıtlı homolog nesillerle filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: *Culex pipiens* biyotipleri, *Culex torrentium*, Kayseri, moleküler karakterizasyon, Real time PCR.

Investigation of *Culex pipiens* biotypes and *Culex torrentium* by Real time PCR in Kayseri region and molecular characterization of the isolates

Summary: The biotypes of *Culex pipiens* complex and *Cx. torrentium* were molecularly investigated in the mosquito specimens collected from different regions of Kayseri between June and August 2015 in this study. A total of 1052 female mosquito specimens were sampled during the field surveys and 315 (29.9%) out of these were morphologically identified and reserved as *Cx. pipiens* complex and/or *Cx. torrentium*. The first step Real time PCR analyses of genomic DNA isolates from these reserved specimens revealed that all the specimens were belong to *Culex pipiens* complex and there was no *Cx. torrentium* positivity. Among the isolates determined in *Culex pipiens* complex, 311 were determined as belong to lineages of *Cx. pipiens* form *pipiens* according to second step Real time PCR analyses and there was no positivity for *Cx. pipiens* form *molestus*. The remaining 4 isolates showed no amplification for both two biotypes. ACE-2 and CQ11 microsatellite DNA analyses were carried out on the isolates from all specimens in order to confirm the real time PCR results and investigate the hybrid lineages. All the isolates determined as *Cx. pipiens* form *pipiens* showed specific banding pattern for *pipiens* biotype with the related DNA markers in the analyses result in the confirmation of the isolates. The 4 isolates that did not show amplification for both biotypes in Real time PCR assays were designated as the hybrids of *Cx. pipiens* form *pipiens* and *Cx. pipiens* form *molestus* with the microsatellite DNA analyses. DNA barcoding and phylogenetic analyses were performed on one isolate belong to each *Cx. pipiens* form *pipiens* *pipiens* and hybrids based on mitochondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) gene region. Both isolates were determined as new haplotypes according to the sequence analyses and their phylogenetic relations based on haplotypes with the available homolog lineages belong to *Cx. pipiens* complex in GenBank were revealed.

Keywords: *Culex pipiens* biotypes, *Culex torrentium*, Kayseri, molecular characterization, Real time PCR.

* 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

Culex pipiens komplekste yer alan sivrisinekler tüm dünyada yayılış göstermekte olup birçok önemli hastalığın naklinde potansiyel vektörlük yapmaktadırlar (35). *Culex* soyu içerisinde *Culex* alt soyuna bağlı Avrupa’da 7 türün varlığı bilinmekte olup (21), bunların arasında *Cx. pipiens* en yaygın holarktık tür olarak nitelenmektedir (41). Palaeartik biyotipleri *Cx. pipiens pipiens* ve *Cx. pipiens molestus* ile birlikte *Cx. pipiens*’in yer aldığı *Cx. pipiens* kompleks ayrıca Avrupa’da görülmeyen *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* ve *Cx. globocoxitus* türlerini de kapsamaktadır (14). Bu kompleks taksa içerisinde *Cx. pipiens* Linnaeus, 1758 ve *Cx. quinquefasciatus* Say, 1823 nesillerinin sırasıyla ılıman ve tropikal bölgelerde en yaygın sivrisinek türleri olduğu bilinmektedir (35). *Culex pipiens* sensu stricto L. 1758 olarak bilinen kompleksin, “pallens” Coquillett 1898, “molestus” Forskål 1775 ve “pipiens” olmak üzere üç intraspesifik formu bulunmaktadır (25, 39).

Culex pipiens’in iki biyoformu olan “pipiens” ve “molestus” formlarına bağlı nesiller davranış ve fizyolojik açıdan bazı farklılıklar göstermelerine karşın morfolojik olarak benzerdirler (35). Dişilerde morfolojik farklılıkların bulunmaması ve hibrit nesillerin varlığı bu taksanın teşhisinde zorluk teşkil etmektedir. Ancak günümüzde bu kompleks içindeki tür ve biyoformların ayrımı için çeşitli moleküler araçlar geliştirilmiştir (3, 4, 30, 36). Subtropik iklim kuşağı ve Palaeartik bölgede yayılış gösteren *Cx. torrentium*, *Cx. pipiens*’in kardeş-taksonu olarak ifade edilmektedir (37). Her iki türe ait nesiller erginlerin habitatu, üreme alanları ve büyük ölçüde benzer morfoloji gibi benzer ekolojik karakteristikleri göstermektedir. İki tür arasındaki tek morfolojik ayrım kriteri erkek hypopygium’unun yapısıdır (40).

Bu çalışma ile Kayseri yöresinden toplanan sivrisinek örneklerinde *pipiens* kompleks içerisinde yer alan *Cx. pipiens* biyotipleri ile *Cx. torrentium* Real time PCR ile araştırılmış, Real time PCR’da belirlenen *Cx. pipiens* biyotiplerinin konfirmasyonu ve hibrid nesillerin varlığı referans yöntem *microsatellite analizleri* ile belirlenmiş ve elde edilen izolatların çeşitli gen bölgelerinin sekans analizleri ile moleküler karakterizasyonları ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot

Sivrisinek örneklerinin toplanması: Çalışma Haziran-Ağustos 2014 tarihleri arasında sivrisineklerin yoğun gözleendiği Kayseri’nin çeşitli odaklarında yürütülmüştür. Ergin dışı sivrisineklerin yakalanması amacıyla karbondioksitli (Kurubuz hazneli) CDC ışık tuzakları (All-Weather LED EVS Traps, 2780, BioQuip Products CA 90220, USA) kullanılmıştır.

Morfolojik teşhis: Sivrisinek örnekleri bilgisayar destekli stereo mikroskop altında çeşitli tür ayırımına ilişkin kaynaklar (7, 10, 19) ve elektronik ortamda yazılı Avrupa Sivrisinekleri Tür Ayırım Anahtarı (34) kullanılarak teşhis edilmiştir. Ayrılan örneklerin entegre dijital kamera sistemiyle morfolojik özellikleri görüntülenmiş ve veriler kayıt altına alınmış, sonrasında %70 etil alkol içerisinde alınarak moleküler analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu: Yüzde 70’lik etil alkol solüsyonu içerisinde muhafaza edilen örneklerin her biri önce steril DNA’se RNA’se free mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve üzerlerine sıvı azot ilave edilerek steril pestle ile toz haline getirilmiştir. Daha sonra genomik DNA izolasyonları, ticari kitler (Axygen® AxyPrep™ Multisource Genomic Miniprep DNA) ile üreticinin açıklamalarına göre yapılmıştır. Elde edilen DNA’lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir ve daha sonra genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/µl) belirlenmiştir.

TaqMan Real Time PCR analizleri: Bireysel örneklerden elde edilen genomik DNA izolatları ilk basamakta *Cx. pipiens* kompleks ve *Cx. torrentium* teşhisi için sırasıyla CQ11 ve *ace2* gen bölgelerini hedef alan spesifik primer ve problarla, ikinci basamakta ise *Cx. pipiens* kompleksde belirlenen izolatların biyoformlarının belirlenmesi için CQ11 gen bölgesini hedef alan iki ayrı TaqMan prob tabanlı Real time PCR (qPCR) tekniği ile analiz edilmiştir (33). Real time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. Real time PCR analizi sonunda örneklerdeki pozitiflikler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (Eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

ACE-2 ve CQ11 microsatellite analizleri: Real time PCR analizleri sonucu moleküler olarak teşhisi sağlanan ve tür/biyoform bazında kategorize edilen izolatların konfirmasyonu ve hibrit nesillerin araştırılması amacıyla Acetylcholineesterase 2 (ACE-2) ve CQ11 microsatellite gen lokusları amplifiye edilmiş ve bant profillerine göre değerlendirme (30, 36) yapılmıştır.

Mitokondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) geninin amplifikasyonu, sekans ve filogenetik analizler: Real time PCR analizleri ile teşhisleri yapılan ve ACE-2/CQ11 Microsatellite analizleriyle konfirmasyonları sağlanan izolatların mitokondrial cytochrome oxidase I (mt-COI) geninin parsiyel 709 bp gen bölgesi, LCO1490 ve HCO2198 primerleri ile referans protokole (20) göre PCR’da amplifiye edilmiştir. Microsatellite analizleri ve Mt-COI gen bölgesi PCR ürünleri (10 µl) %1.5’luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz

programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir. Tüm moleküler analizlerde uygulanan testlerin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol referans örnekler, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

Tür/biyoform ve/veya hibrit olarak karakterize edilen ve uygun konsantrasyonda olan izolatlardan seçilen Mt-COI gen bölgesi ampikonları ilgili gen bölgesi nükleotid sekanslarının özgün ve kayıpsız olarak elde edilebilmesi amacıyla klonlanmış ve rekombinant plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmid DNA'lar vektör spesifik primerler ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 8.1.4 (24) yazılımı ile vektör DNA'sı içerisine insert olmuş hedef gen bölgesi sekansları belirlenmiş ve forward ve reverse dizilimlerin ikili hizalamaları yapılarak izolatlar için final dizilimler elde edilmiştir. Sekans analizlerinden önce, PCR primer dizileri hedef mt-COI gen bölgesi sekanslarından kesilerek uzaklaştırılmış ve 658 bp standart barkod bölge elde edilmiştir. İzolatlar için sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlar için ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 8.1.4 (24) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatların haplotip karakterizasyonları GenBank veri tabanında mevcut homolog izolatlarla birlikte DnaSP 5.10.01 (29) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik yapıların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde uygun model belirlenmesinde jModelTest 2 (9) kullanılmış ve en düşük Bayesian Bilgi Kriteri (BIC) değerine sahip Hasegawa, Kishino and Yano + Gamma distributed (HKY+G) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.4 (24) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (22) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç) "burn in" olarak çıkarılmıştır.

Bulgular

Morfolojik teşhis sonuçları: Araştırma sahasından toplanan toplam 1052 dişi sivrisinek örneğinden 315'i (%29.9) morfolojik teşhis ile *C. pipiens* kompleks ve/veya *Cx. torrentium* olarak teşhis edilmiştir.

TaqMan Real time PCR sonuçları: Real time PCR analizleri sonucu tüm örneklerin *Cx. pipiens* kompleks'te yer aldığı belirlenmiş, *Cx. torrentium* pozitifliği saptanmamıştır. *Cx. pipiens* biyoformlarının araştırıldığı

Real time PCR analizlerinin ikinci basamağında *Cx. pipiens* kompleks içerisinde belirlenen 315 örneğin 311'i *Cx. pipiens* form *pipiens* olarak belirlenmiş, dört örnek ise her iki biyoform yönünden moleküler analizlerde amplifikasyon göstermemiştir.

ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analiz sonuçları: Biyoformlar yönünden analizler sonucu *Cx. pipiens* form *pipiens* olarak belirlenen tüm izolatların ilgili DNA markerları ile *pipiens* biyotipine özgü bant profilleri sergilediği saptanmış ve izolatların konfirmasyonu sağlanmıştır. Her iki form yönünden de amplifikasyon göstermeyen dört izolatın ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analizleriyle sergilemiş oldukları bant profillerine göre *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* hibritleri olduğu belirlenmiştir.

Mt-COI gen bölgesi amplifikasyon ve sekans analizi sonuçları: Morfolojik ve moleküler teşhisle karakterize edilen izolatların sekans ve filogenetik analizleri için mt-COI gen bölgesini hedef alan primerlerle amplifikasyonları gerçekleştirilmiş ve analizler sonucu hedef büyüklükte ampikonlar belirlenmiştir. *Cx. pipiens* form *pipiens* ve hibrit izolatlardan seçilen birer izolatın sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Mt-COI gen bölgesi yönünden sekans analizleriyle karakterize edilen izolatlar, biyoform/hibrit karakterizasyonları, izolasyon kaynakları ve GenBank aksesyon numaralarıyla birlikte Tablo 1'de verilmiştir.

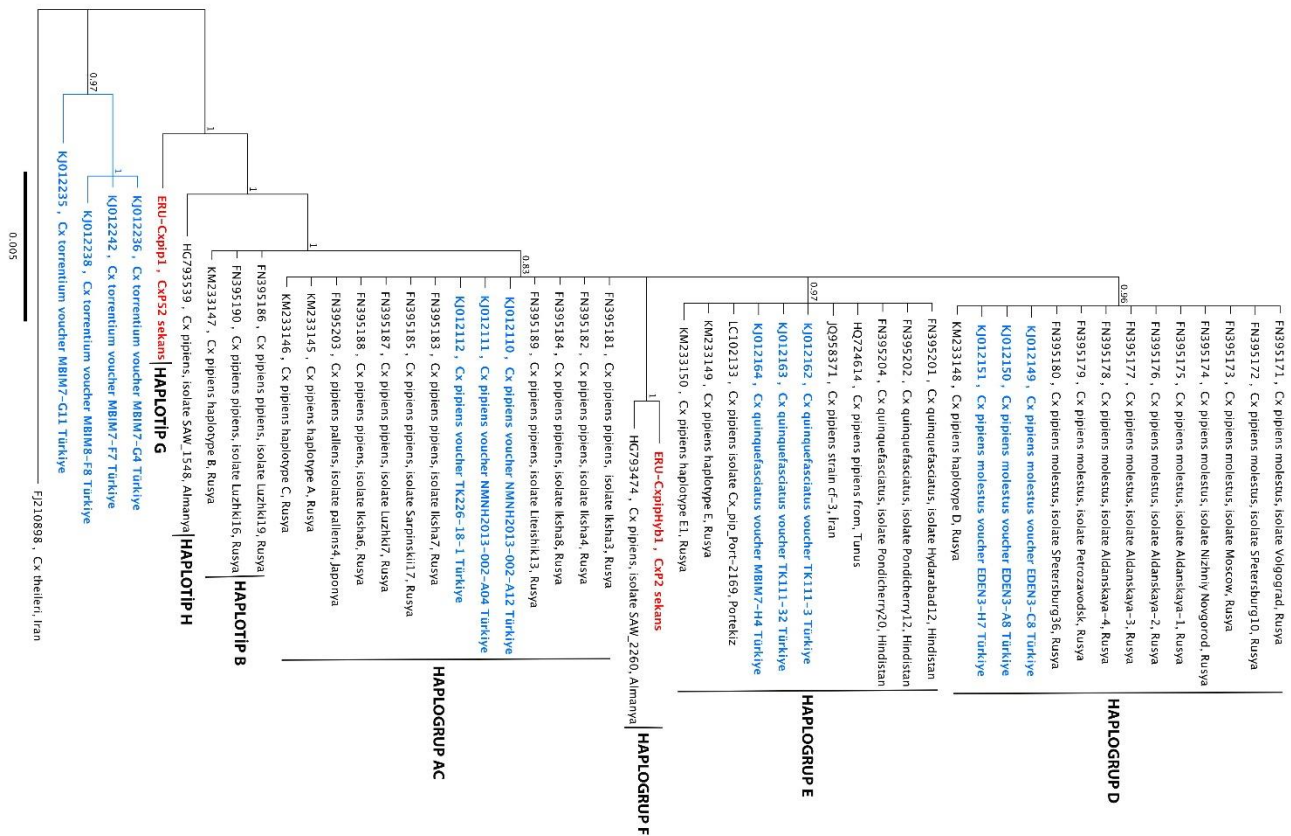
Mt-COI gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları: Mt-COI filogenetik analizlerine çalışmada elde edilen izolatlarla birlikte GenBank'ta mevcut olan ve Türkiye, Rusya, Hindistan, Japonya ve Almanya'nın çeşitli bölgelerinden izole edilmiş, farklı haplotip ve gruplarda yer alan toplam 48 izolat dahil edilmiştir. Monofiletik dış grup olarak *Cx. theileri* (GenBank aksesyon: FJ210898) kullanılmıştır. Bayesian filogenisine göre oluşturulan ağaç üzerinde (Şekil 1) görüleceği üzere analize dahil edilen izolatların 4 haplogrup (AC, D, E, F) ve 3 haplotip (B, H, G) içerisinde kümelendiği belirlenmiş ve bayesian filogenetik çözünürlüğü yüksek posterior olasılıklarla (>0.83) desteklenmiştir. Araştırmada karakterize edilen iki izolat arasındaki intraspesifik sekans heterojenitesi %2.7±0.7 belirlenmiştir. Real time PCR ve mikrosatellite analizleriyle *Cx. pipiens* form *pipiens* olduğu belirlenen ERU-Cxpip1 izolatının yeni bir haplotip olduğu ve haplotip veya haplogrup bazında karakterize edilmiş olan filogenetik ağaç üzerindeki nesillerden (Şekil 1) genetik olarak daha uzak karakterde olduğu ve dış daldaki yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. İlgili izolat en yüksek benzerliği %98.8 ile Almanya'dan izole edilmiş ve biyoform karakteri üzerine veri bulunmayan *Cx. pipiens* SAW_1548 izolatıyla (GenBank aksesyon: HG793539) göstermiştir. Real time PCR ve mikrosatellite analizleri sonucu hibrit olduğu saptanan

ERU-CxpiHyb1 izolatının en yüksek benzerliği (%99.5) Almanya'dan izole edilmiş ve biyoform karakteri üzerine veri bulunmayan *Cx pipiens* SAW_2260 izolatıyla (GenBank aksesyon: HG793474) gösterdiği ve ilgili izolatla birlikte küme oluşturarak Haplogrup AC'ye yakın olmak üzere ayrı bir haplogrup (Haplogrup F) oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Bununla birlikte ERU-Cxpi1 ve

ERU-CxpiHyb1 izolatlarının Türkiye'den rapor edilmiş *Cx. pipiens* izolatlarıyla, sırasıyla %1.6±0.5 ve %1.4±0.5, *Cx. pipiens* form *molestus* izolatlarıyla %1.4±0.5 ve %1.6±0.5, *Cx. quinquefasciatus* izolatlarıyla %1.7±0.5 ve %1.7±0.5 ve *Cx. torrentium* izolatları ile de %2.6±0.6 ve %4.3±0.9 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir.

Tablo 1. Mt-COI gen bölgesine göre karakterize edilen izolatların biyoform, DNA izolasyon kaynağı ve GenBank aksesyon numaraları. Table 1. Bioform, DNA isolation source and GenBank accession numbers of the isolates characterized by the Mt-COI gene region.

İzolat	Biyofom/Hibrit	DNA izolasyon kaynağı	GenBank Aksesyon
ERU-Cxpi1	<i>Cx. pipiens</i> form <i>pipiens</i>	Ergin dişi	KU949592
ERU-CxpiHyb1	Hibrit (<i>Cx. pipiens</i> form <i>pipiens</i> + <i>Cx. pipiens</i> form <i>molestus</i>)	Ergin dişi	KU949593



Şekil 1. *Culex pipiens* izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde, Türkiye'den bildirilmiş izolatlar mavi ve kalın karakterde gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir. Figure 1. Mt-COI gene region of *Cx. pipiens* isolates phylogenetic relationships according to Bayesian inference (BI) analysis. The isolates identified in the study were shown in red color and bold character, the isolates reported from Turkey were shown in blue color and bold character. The numbers in front of the Nodes indicate the Bayesian probability. The scale line shows the nucleotide change per site.

Tartışma ve Sonuç

Culex pipiens ve *Cx. torrentium*'un birçok önemli hastalık için kesin vektörlükleri (14) göz önüne alındığında, her iki türe ait nesillerin dağılımı ve epidemiyolojisi üzerine detaylı bilgiye ihtiyaç olduğu görülmektedir. Türkiye'de *Cx. pipiens* kompleks üzerine yapılan çalışmaların genellikle ergin ve larva dönemleri bazında morfolojik teşhise dayalı prevalans çalışmaları tarzında olduğu görülmektedir (1, 31). Bunun yanında yine *Cx. pipiens* kompleks nesillerinin tularemi (12), kanatlı sıtması (23), *D. immitis* (23) ve Batı Nil Virüsü (13) gibi patojenlere vektörlük potansiyelleri, *Wolbachia* endosimbiontunun araştırılması (42) ve kan beslenmesinde konak tercihlerinin moleküler analizleri (26) üzerine moleküler düzeyde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Buna karşın Türkiye'de *Cx. pipiens* kompleks üyelerinin genotiplendirilerek karakterizasyonlarının sağlandığı iki çalışmanın (13, 18) varlığı gözükmemektedir. Günay ve ark. (18), Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen ve morfolojik analizlerle *Culex* soyunda belirlenen *Cx. (Barraudius) modestus*, *Cx. laticinctus*, *Cx. mimeticus*, *Cx. perexiguus*, *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens form molestus* (Laboratuvar kolonisi olarak belirtilmiş), *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. theileri*, *Cx. torrentium*, *Cx. tritaeniorhynchus* ve *Cx. hortensis* türlerinin mt-COI gen bölgesine göre barkodlamalarını ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. Fakat coğrafik olarak yalnızca tropikal bölgelerde yayılış gösteren ve Avrupa'da bulunmadığı rapor edilen (35) ve yine morfolojik olarak *Cx. pipiens* kompleks tür veya biyoformlarından ayrılmayan *Cx. quinquefasciatus* türünün ilgili çalışmada (18) Türkiye'den ilk kayıt olarak bildirilmiş olması da ileri konfirmasyona ihtiyaç göstermektedir. Nitekim mt-COI parsiyel sekans analizleriyle *Cx. pipiens* kompleks tür ve/veya biyoformlarının hibrit nesiller de göz önüne alındığında kesin sınırlarla ayrılmadığı ve filogenetik yapılarının kompleks yapı sergilediği bilinmektedir (35, 41). Nitekim araştırmamızda filogenetik analizlerde kullanılan izolatlarla ait mt-COI sekansları arasındaki ilişki incelendiğinde Günay ve ark. (18) tarafından karakterize edilen *Cx. quinquefasciatus* nesillerinin mt-COI geninin 658 bp barkod bölgesi bazında farklı ülkelerden bildirilmiş *Cx. pipiens* (GenBank aksesyon: JQ958371, LC102133) ve *Cx. pipiens form pipiens* (GenBank aksesyon: HQ724614 [mitokondrial bütün genom]) nesilleriyle %100 identiklik göstermiş olması da mt-COI barkod gen bölgesinin bu komplekste yer alan tür ve/veya biyoformların kesin sınırlarla ayrımında yetersizliğini göstermiştir. Bu açıdan çeşitli referanslarda da bildirildiği üzere barkod ve sekans analizlerinden önce ilgili kompleksteki tür veya biyoformların mevcut moleküler tekniklerle genotiplendirilmeleri gerekmektedir (3, 4, 30, 35, 36). Benzer olarak Ergünay ve ark. (13) da Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen sivrisinek örneklerinde Batı Nil Virüsü'nü araştırdıkları çalışmalarında mt-COI sekans analizleri ile

Cx. quinquefasciatus türünün varlığını rapor etmişlerdir. Tüm bu verilerin hibrit nesiller de göz önüne alınarak bu komplekse ait tür ve/veya biyoformlar ile *Cx. torrentium* için mevcut referans genotipleme yöntemleri ile konfirmasyona ihtiyacı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, *Cx. pipiens* biyoformları ile *Cx. torrentium* nesillerinin ayrımında yüksek özgünlük ve duyarlılıkta olan TaqMan Real time PCR yöntemi kullanılmıştır. Nitekim Rudolph ve ark. (33), tarafından da belirtildiği üzere ilgili tekniğin anabilim dalında mevcut ve Litvanya Doğa Araştırma Merkezinden temin edilmiş olan referans izolatlarla spesifite denemelerinde yüksek özgünlükte olduğu görülmüştür. Çalışmada morfolojik teşhise *Cx. pipiens* kompleks olarak ayrılan örneklerin tamamının *Cx. pipiens* kompleks'te yer aldığı belirlenmiş, *Cx. torrentium* pozitifliği saptanmamıştır. *Cx. pipiens* kompleks tür ve/veya biyoformları ile *Cx. torrentium*'un moleküler teşhisi ve ayrımlarında ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analizleri, ITS-2 PCR ve sekans analizleri, mt-COI parsiyel PCR RFLP analizleri ve *Wolbachia* polimorfizmine göre tiplendirme gibi çeşitli moleküler girişimler sıklıkla kullanılmaktadır (3, 4, 11, 35, 36.). Bunların arasında ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analizleri tür ve/veya biyoform bazında sergilediği çözümleyici DNA bant profilleri ile teşhiste ve hibrit türlerin ortaya konmasında temel tekniklerden birini oluşturmuştur (30, 35, 36). Nitekim araştırmada referans izolatlarla birlikte değerlendirilen örneklerle ait ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analizleri, Real time PCR'da *Cx. pipiens form pipiens* olarak belirlenen örneklerin ilgili biyoforma özgü bant profilleri sergilediğini ortaya koymuş ve sonuçları konfirme etmiştir. Buna karşın Real time PCR analizlerinde *Cx. pipiens* kompleks yönünden pozitif belirlenen ancak biyoformlar yönünden ise amplifikasyon göstermeyen 4 izolatın ACE-2 ve CQ11 mikrosatellite analizleriyle form *pipiens* ve form *molestus* hibritleri olduğu saptanmıştır. Bu iki biyoform arasındaki hibrit nesiller ayrıca Amerika Birleşik Devletleri (15), Portekiz (17), Hollanda (32), Yunanistan (16) ve Fas'ın (2) çeşitli bölgelerinden de rapor edilmiştir. Hibrit nesillerin ortaya çıkışı çeşitli araştırmacıların (16, 35) da dikkat çektiği gibi her ne kadar farklı biyoekolojik özellikleri olsa da bu iki forma ait nesillerin simpatrik olarak uygun üreme odaklarında birlikte bulunabilirliği ve kolonizasyon gösterebilmesi ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte *Cx. pipiens* kompleksindeki bu hibridizasyonun sivrisineklerin vektör kapasitesini değiştirdiği, köprü vektörler (bridge-vectors) olarak tabir edilen bu hibrid nesillerde vektör etkinliğinin arttığı kaydedilmektedir (15, 16, 35). Bu bağlamda sivrisinek populasyonlarında genetik yapının analiz edilmesi epidemiyolojik açıdan ve çeşitli patojenler açısından vektör potansiyellerini belirleme ve risk faktörlerini ortaya koyma amacıyla oldukça önem arz etmektedir.

Araştırmada *Cx. pipiens* form *pipiens* ERU-Cxpip1 izolatının yeni bir haplotip olduğu ve GenBank'ta mevcut haplotip veya haplogrup bazında karakterize edilmiş olan tüm *Cx. pipiens* nesillerinden genetik olarak daha uzak karakterde olduğu saptanmıştır. *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* hibriti olduğu belirlenen ERU-CxpipHyb1 izolatının aynı şekilde yeni bir haplotip olduğu ortaya çıkarılmış olup ilgili izolatın Almanya'dan izole edilmiş ve biyoform karakteri üzerine veri bulunmayan *Cx pipiens* SAW_2260 izolatıyla (GenBank aksesyon: HG793474) birlikte grup oluşturarak Haplogrup AC'ye yakın olmak üzere ayrı bir haplogrup oluşturduğu görülmüştür. Filogenetik sonuçlarda görüleceği üzere *Cx. pipiens* komplekste tür ve/veya biyoform bazında karakterize edilmiş haplotiplerin genetik olarak farklı yapı sergilediği ve buna bağlı farklı yerleşimlerde kümelenme gösterdikleri dikkati çekmiştir. Nitekim mt-COI barkodlamasının *Anopheles*, *Ochlerotatus* ve *Culex* soylarındaki belirli tür ve/veya haplotiplerin kesin teşhiste yeterli olmadığı rapor edilmiştir (5, 8, 27, 28, 38). Diğer yandan barkodlama yaklaşımlarının yaygın diğer bazı kısıtlamaları da bulunmaktadır. Farklı mitokondrial DNA genomlarına sahip türlerin hibridizasyonu neticesinde mitokondrial genlerde şekillenen rekombinasyon, kompleks sekans yapılarının ortaya çıkmasına yol açabilmekte ve bu da yetersiz tanıyla sonuçlanabilmektedir (6).

Sonuç olarak bu çalışma ile Kayseri yöresinde *Cx. pipiens* kompleks biyoformları ve *Cx. torrentium*'un varlığı, yaygınlığı ve genotipik karakterleri üzerine moleküler veriler sağlanmıştır. Ayrıca çalışmada Türkiye için ilk olmak üzere *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* hibritlerinin varlığı belirlenmiş ve ilgili haplotiplerin moleküler karakterizasyonları sağlanmıştır. Bu son bulgu ile sivrisinek kaynaklı patojenlerin bulaşma dinamiklerinde köprü-vektör (bridge-vector) olarak nitelenen hibrit popülasyonların oluşturduğu risk potansiyelleri göz önüne alındığında, Türkiye'de *Cx. pipiens* kompleks üyelerinin moleküler epidemiyolojisi ve vektörlük potansiyelleri üzerine geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.

Teşekkür

Araştırmacılar bu çalışmaya TYL-2014-5509 kodlu yüksek lisans tez projesi ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve referans izolatların temini için Litvanya Doğa Araştırma Merkezi'nden Prof. Dr. Gediminas VALKIUNAS, Dr. Rasa BERNOTIENE ve diğer personele teşekkür eder.

Kaynaklar

1. **Aldemir A, Boşgelmez A** (2006): *Population dynamics of adults and immature stages of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Gölbaşı District, Ankara*. Turk J Zool, **30**, 9-17.
2. **Amraoui F, Tijane M, Sarih M ve ark.** (2012): *Molecular evidence of Culex pipiens form molestus and hybrids pipiens/molestus in Morocco, North Africa*. Parasit Vectors, **5**, 83.
3. **Aspen S, Savage HM** (2003): *Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the Culex pipiens complex based on nucleotide sequence differences in the acetylcholinesterase gene Ace.2*. J Am Mosq Control, **19**, 323-328.
4. **Bourguet D, Fonseca D, Vourch G ve ark.** (1998): *The acetylcholinesterase gene Ace: A diagnostic marker for the Pipiens and Quinquefasciatus forms of the Culex pipiens complex*. J Am Mosq Control, **14**, 390-396.
5. **Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L ve ark.** (2013): *A multi-locus approach to barcoding in the Anopheles strodei subgroup (Diptera: Culicidae)*. Parasit Vectors, **6**, 111.
6. **Chan A, Chiang LP, Hapuarachchi HC ve ark.** (2014): *DNA barcoding: Complementing morphological identification of mosquito species in Singapore*. Parasit Vectors, **7**, 569.
7. **Cranston PS** (1987): *Keys to the adults, male hypopygia, fourth-instar larvae and pupae of the British mosquitoes (Culicidae) with notes on their ecology and medical importance*. Freshw Rev, 152.
8. **Cywinska A, Hunter FF, Hebert PD** (2006): *Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes*. Med Vet Entomol, **20**, 413-424.
9. **Darriba D, Taboada GL, Doallo R ve ark.** (2012): *jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing*. Nat Methods, **9**, 772.
10. **Darsie RF Jr, Samanidou-Voyadjoglou A** (1997): *Keys for the identification of the mosquitoes of Greece*. J Am Mosq Control, **13**, 247-254.
11. **Di Luca M, Toma L, Boccolini D ve ark.** (2016): *Ecological distribution and CQ11 genetic structure of Culex pipiens complex (Diptera: Culicidae) in Italy*. PLoS One, **11**, e0146476.
12. **Duzlu O, Yildirim A, Inci A ve ark.** (2016): *Molecular investigation of Francisella-like endosymbiont in ticks and Francisella tularensis in ixodid ticks and mosquitoes in Turkey*. Vector Borne Zoonotic Dis, **16**, 26-32.
13. **Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O ve ark.** (2014): *Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey*. PLoS Negl Trop Dis, **8**, e3028.
14. **Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD ve ark.** (2011): *"Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of Culex pipiens complex mosquitoes in epidemiology*. Infect Genet Evol, **11**, 1577-85.
15. **Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA ve ark.** (2004): *Emerging vectors in the Culex pipiens complex*. Science, **303**, 1535-38.
16. **Gomes B, Kioulos E, Papa A ve ark.** (2013): *Distribution and hybridization of Culex pipiens forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010*. Infect Genet Evol, **16**, 218-225.
17. **Gomes B, Sousa CA, Novo MT ve ark.** (2009): *Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal*. BMC Dev Biol, **9**, 262.

18. **Gunay F, Alten B, Simsek F ve ark.** (2015): *Barcoding Turkish Culex mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors.* Acta Trop, **143**, 112-120.
19. **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.
20. **Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR** (2003): *Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **270**, 96-99.
21. **Hubalek Z** (2008): *Mosquito-borne viruses in Europe.* Parasitol Res, **103**, 29-43.
22. **Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001): *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees.* BMC Bioinformatics, **17**, 754-755.
23. **Inci A, Yildirim A, Njabo KY ve ark.** (2012): *Detection and molecular characterization of avian Plasmodium from mosquitoes in central Turkey.* Vet. Parasitol, **188**, 179-184.
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.* BMC Bioinformatics, **28**, 1647-49.
25. **Knight KL, Stone A** (1977): *A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae).* Entomological Society of America (2d ed.), Washington, USA.
26. **Korkmaz S, Yıldırım A, Düzlü Ö ve ark.** (2016): *Kayseri yöresinden toplanmış Culex pipiens komplekse ait sivrisinek (Diptera: Culicidae) örneklerinin kan beslenme identifikasyonu.* Türkiye Parazitoloj Derg, **40**, 199-204.
27. **Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R ve ark.** (2007): *DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae).* J Med Entomol, **44**, 1-7.
28. **Laurito M, Oliveira TM, Almiron WR ve ark.** (2013): *COI barcode versus morphological identification of Culex (Culex) (Diptera: Culicidae) species: A case study using samples from Argentina and Brazil.* Mem Inst Oswaldo Cruz, **1**, 110-122.
29. **Librado P, Rozas J** (2009): *DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.* Bioinformatics, **25**, 1451-52.
30. **Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A ve ark.** (1998): *A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in Culex pipiens.* Insect Mol Biol, **7**, 107-120.
31. **Öter K** (2007): *İstanbul'da Görülen Sivrisinek Türlerinin Tespiti.* İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.
32. **Reusken CB, de Vries A, Buijs J ve ark.** (2010): *First evidence for presence of Culex pipiens biotype molestus in the Netherlands, and of hybrid biotype pipiens and molestus in northern Europe.* J Vector Ecol, **35**, 210-212.
33. **Rudolf M, Czajka C, Borstler J ve ark.** (2013): *First nationwide surveillance of Culex pipiens complex and Culex torrentium mosquitoes demonstrated the presence of Culex pipiens biotype pipiens/molestus hybrids in Germany.* PLoS ONE, **8**, 71832.
34. **Schaffner E, Angel G, Geoffroy B ve ark.** (2011): *The mosquitoes of Europe.* CD-ROM.
35. **Shaikevich EV, Vinogradova EB, Bouattour A ve ark.** (2016): *Genetic diversity of Culex pipiens mosquitoes in distinct populations from Europe: Contribution of Cx. quinquefasciatus in Mediterranean populations.* Parasit Vectors, **9**, 47.
36. **Smith JL, Fonseca DM** (2004): *Rapid assays for identification of members of the Culex (Culex) pipiens complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae).* Am J Trop Med Hyg, **70**, 339-345.
37. **Vinogradova EB, Shaikevich EV, Ivanitsky AV** (2007): *A study of the distribution of the Culex pipiens complex (Insecta: Diptera: methods of identification).* Comp Cytogenet, **1**, 129-138.
38. **Wang G, Li C, Guo X ve ark.** (2012): *Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding.* PLoS One, **7**, e47051.
39. **Ward RA** (1992): *Third supplement to "A catalog of the mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae).* Mosquito Systematics, **24**, 177-230.
40. **Weitzel T, Braun K, Collado A ve ark.** (2011): *Distribution and frequency of Culex pipiens and Culex torrentium (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers.* J Eur Mosq Control Assoc, 22-37.
41. **Werblov A, Klimpel S, Bolius S ve ark.** (2014): *Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species Culex pipiens and Culex torrentium (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths.* PLoS One, **9**, e102158.
42. **Yıldırım A, İnci A, Düzlü 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.

Geliş tarihi: 15.03.2017 / Kabul tarihi: 28.07.2017

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye.
e-mail: ainci@erciyes.edu.tr