

**DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *LIGULA INTESTINALIS*
L.'İN MOLEKÜLER TANIMLAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif İSLAM

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Nisan, 2019

Bu tez çalışması “18.FEN.BİL.36” numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
BAPK Birimi tarafından desteklenmiştir.

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *LIGULA INTESTINALIS* L.'İN
MOLEKÜLER TANIMLAMASI**

Elif İSLAM

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Nisan, 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Elif İSLAM tarafından hazırlanan “DNA Dizisi Tabanlı Olarak *Ligula intestinalis* L.'in Moleküler Tanımlaması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15 / 04 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

Üye : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK
Afyon Kocatepe Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

Üye : Doç. Dr. Deniz İNNAL
Burdur Mehmet Akif Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

M. Oğuz

M. Oğuz

M. Oğuz

D. İnnal

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI


Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

15/ 04/ 2019


Elif İSLAM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *LIGULA INTESTINALIS* L.'İN MOLEKÜLER TANIMLAMASI

Elif İSLAM

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Bu çalışmada, müze meteryali olarak etil alkol ortamında korunan *Ligula intestinalis* (Pseudophyllidea, Cestoda) türünün, COI gen dizisi üzerinden moleküler tanımlaması yapılmıştır. Elde edilen genetik veriler, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre teşhisi yapılan *Ligula intestinalis* türünün taksonomik konumunu doğrulamıştır. Bu süreçte COIA2 ve COIB2 primerleri kullanılmıştır. COI geninin 480 bp kısmi belirgin nükleotidleri, her örnekten doğrudan dizilenmiştir. Bir örnekteki bir C nükleotidi hariç, COI gen dizilerinde hiçbir nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir. COI geni hizalı nükleotid dizileri bakımından, bu araştırmanın *L.intestinalis* izolatları (MK286929-MK286934) ile bir AF153910.1 *L.intestinalis* izolatu arasında %7 farklılık bulunmuştur. Bu çalışma sonuçları ile etanolde fikse edilen ve uzun süre etanolde korunan *L.intestinalis* gDNA'larının hasar görmediği ve rutin olarak çoğaltılabildiği gösterilmiştir.

2019, viii + 35 sayfa

Anahtar Kelimeler: COI, DNA, *Ligula intestinalis*, polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LIGULA INTESTINALIS* L. BASED ON DNA SEQUENCES

Elif İSLAM

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetic

Supervisor: Prof. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

In this study, the molecular identification of the *Ligula intestinalis* (Pseudophyllidea, Cestoda) species, which is protected as a material in the ethyl alcohol environment, was carried out on the COI gene sequence. The genetic data obtained confirmed the taxonomic position of the *Ligula intestinalis* species, which was diagnosed according to anatomical and morphological characteristics. In this process, COIA2 and COIB2 primers were used. 480 bp partial certain nucleotides of the COI gene was sequenced directly from each sample. Except for a C nucleotide in a sample, no nucleotide variation was detected in the COI gene sequences. In terms of COI aligned nucleotide sequences, a difference of 7% was found between the *L. intestinalis* isolates (MK286929-MK286934) from this study and an AF153910.1 *L. intestinalis* isolate. *Ligula intestinalis*. The present data showed that *L.intestinalis* gDNAs fixed and preserved in ethanol for a long time were not damaged and routinely reproduced.

2019, viii + 35 pages

Keywords: COI, DNA, *Ligula intestinalis*, polymerase chain reaction

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK'e şükranlarımı sunarım.

Tez savunma sınavında jüri üyesi olarak görev alan ve tezdeki düzeltmelere katkıda bulunan Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Sayın Doç. Dr. Deniz İNNAL hocama çok teşekkür ederim.

Araştırma materyaline ait örneklerden DNA izolasyonu, dizilemesi ve veri analizi sürecine katkıda bulunan Sayın İlkay Selver BÜYÜKTOPÇU, Ahmet DEMİRLİÇAKMAK ve Humen CEBBARI'ye teşekkür ederim.

Ligula intestinalis örneklerinin anatomik-morfolojik olarak tanımlamasında kullanılmak üzere mikrotom kesitlerinin temininde katkıda bulunan Laborant Emre YILDIZ'a teşekkür ederim.

Çalışma sürecindeki her aşamada maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta annem, babam ve eşim olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışmasını "18.FEN.BİL.36" numaralı proje kapsamında destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Komisyon Birimine teşekkür ederim.

Elif İSLAM

AFYONKARAHİSAR, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 <i>Ligula intestinalis</i> 'in Taksonomik Konumu	2
2.2. Tür Tayin Anahtarı	2
2.3 <i>Ligula intestinalis</i> 'in Yaşam Döngüsü	3
2.4 <i>Ligula intestinalis</i> Enfeksiyonu Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar	4
2.5 <i>Ligula intestinalis</i> 'in Patojenik Özellikleri	6
2.6 <i>Ligula intestinalis</i> 'in Moleküler Tanımlaması Üzerine Çalışmalar	7
3. MATERYAL ve METOD.....	11
3.1 Parazit Örnekleri	11
3.2 DNA İzolasyonu	13
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
3.4 Dizileme, Veri Analizi ve Ağaç Yapımı	14
4. BULGULAR	15
4.1 <i>Ligula intestinalis</i> 'in Anatomik ve Morfolojik Özellikleri	15
4.2 DNA İzolasyon Verileri	15
4.3 Dizileme Verileri	18
4.4 Ağaç Verileri	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

bp	baz çifti
mM	mili molar
HCl	hidroklorik asit
NaCl	sodyum korür
pH	hidrojen iyonu değerinin logaritması
K	potasyum
DNA	deoksiribonükleik asit
PZR	polimer zincir reaksiyonu
MgCl ₂	magnezyum klorür
dNTP	di-nükleotid trifosfat
A	adenin nükleotidi
T	timin nükleotidi
G	guanin nükleotidi
C	sitozin nükleotidi
ng	nanogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Ligula intestinalis</i> 'in yaşam döngüsü (Dubinina 1980).....	4
Şekil 4.1 COI ve ITS gen bölge verileri desteğinde, Maximum Likelihood (ML) analiz yöntemi kullanılarak oluşturulan ağaç	26

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1 Araştırma örneklerinin alındığı <i>Ligula intestinalis</i> bireyleri	11
Resim 3.2 <i>Ligula intestinalis</i> örneklerini seçme işlemi	12
Resim 3.3 Rastgele seçilmiş <i>Ligula intestinalis</i> örnekleri	12
Resim 3.4 <i>L. intestinalis</i> dokularından DNA izolasyonu	13
Resim 4.1 Araştırmada kullanılan ve etil alkol ortamında korunan <i>Ligula intestinalis</i> örnekleri (orijinal)	16
Resim 4.2 L1-1 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	16
Resim 4.3 L2-1 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	17
Resim 4.4 L4-1 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	17
Resim 4.5 L2-2 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	17
Resim 4.6 L3-2 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	18
Resim 4.7 L10-2 nolu <i>Ligula intestinalis</i> örneğine ait enine kesit	18
Resim 4.8 <i>Ligula intestinalis</i> örneklerine ait COI gen dizisine ait ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA.....	19
Resim 4.9 Bu araştırma kapsamında elde edilen <i>L.intestinalis</i> izolatları (MK286929- MK286934) ile AF153910.1 <i>L. intestinalis</i> , AY549506.1 <i>Digramma interrupta</i> , AY549507.1 <i>Diphyllobothrium ditremum</i> , AY549510.1 <i>Ligula colymbi</i> , AY549511.1 <i>Ligula colymbi</i> , AY549512.1 <i>Ligula intestinalis</i> , AY549513.1 <i>Ligula intestinalis</i> , AY549516.1 <i>Ligula intestinalis</i> , AY549517.1 <i>Ligula</i> <i>intestinalis</i> , AY549520.1 <i>Ligula intestinalis</i> AF153910.1 <i>L.intestinalis</i> , <i>Ligula</i> <i>colymbi</i> , <i>Digramma interrupta</i> , <i>Diphyllobothrium ditremum</i> 'un COI ve ITS gen bölgelerinin hizalanması.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 <i>Ligula intestinalis</i> 'in COI genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler.....	14
Çizelge 3.2 GenBank'tan alınan ve filogenetik analizde kullanılan taksonomik birimler.....	14
Çizelge 4.1 Bu çalışmada kullanılan <i>L.intestinalis</i> örneklerine ait bilgiler	19
Çizelge 4.2 Bu çalışmada elde edilen <i>Ligula intestinalis</i> izolatları (MK286929- MK286934) ile AF153910.1 <i>L.intestinalis</i> izolatına ait COI nükleotid dizi varyasyonu.....	20

1 . GİRİŞ

Ligula intestinalis üç konaklı bir yaşam döngüsüne sahip pseudophyllid bir sestod türüdür. Parazitin yaşam döngüsünün baskın fazı, balıkların vücut boşluğunda yaşayan pleroserkoid evresidir. *L.intestinalis* kuzey yarıküredeki çeşitli balık türlerinde yaygın bir patojendir (Dubinina 1980).

Son yıllarda, polimeraz zincir reaksiyonu temelli DNA dizilemesi ve diğer moleküler yöntemler parazitlerin tanımlanmasında ve onların filogenetik özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin, farklı coğrafik bölgelerden 10 konak balık türüne ait *Ligula intestinalis* populasyonlarının genetik çeşitliliği basit dizi tekrar (ISSR) belirteçleri yöntemiyle araştırılmıştır (Bouزيد *et al.* 2008a). *Ligula intestinalis*'in nükleer 28S rDNA ve mitokondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gen dizilemesi, bu parazitin sınıflandırılması için kullanılmıştır (Li *et al.* 2000). *Ligula intestinalis* populasyonlarının dahili yazılım boşluğu (internal transcribed spacer, ITS), bu parazite ait populasyonların taksonomik konumu için güçlü destek sağlayıcısı olarak belirlenmiştir (Bouزيد *et al.* 2008b).

Günümüzdeki araştırmaların çoğu, bu parazit türünü *Ligula intestinalis* olarak algılamış ve atıfta bulunulmuştur (Taylor and Hoole 1989, Brown *et al.* 2002, Ergönül ve Altındağ 2005, Hajirostamloo 2008, İnnal *et al.* 2007). Bununla birlikte, bu tanımlamanın doğru olup olmadığı hala tartışmalıdır (Logan *et al.* 2004).

Bu çalışmanın amacı; Çatıören, Örenler ve Kunduzlar baraj göllerindeki *Chondrostoma nasus*, *Alburnus escherichii*, *Squalius cephalus* ve *Tinca tinca* balık türlerinden izole edilen ve müze materyali olarak korunan *Ligula intestinalis* örneklerinin mitokondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gen dizisini tanımlamaktır. Elde edilecek gen dizisi verileriyle, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre teşhisi yapılan *Ligula intestinalis* türünün taksonomik konumunu belirlemektir. Ayrıca daha geniş ölçekte, Avrupa-Akdeniz bölgesindeki *L.intestinalis* populasyonlarının genetik çeşitliliğinin mekânsal dağılımının belirlenmesi çalışmalarına katkıda bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Ligula intestinalis*'in Taksonomik Konumu

Linnaeus (1758)'un tanımladığı *Ligula intestinalis* türü üzerine ilk faunistik çalışma Cooper (1918) tarafından gerçekleştirilmiştir (Dubinina 1964). Günümüzde *Ligula* taksonundaki türler, morfolojik ve anatomik özelliklerine göre, iki genus (*Ligula* ve *Digramma*) ile dört tür (*L.intestinalis*, *L.colymbi* ile *D.interrupta*, *D.nemachili*) olarak sınıflandırılmıştır (Dubinina 1980).

Michigan Üniversitesi Zooloji Müzesi kayıtlarına göre oluşturulan *Ligula intestinalis*'in taksonomik konumu aşağıda verilmiştir (İnt. Kay.1).

- Kingdom: Animalia
- Eumetazoa
- Bilateria
- Protostomia
- Phylum: Platyhelminthes
- Class: Cestoda
- Order: Pseudophyllidea
- Family: Diphylobothriidae
- Genus: *Ligula*
- Species: *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758)

2.2 Tür Tayin Anahtarı

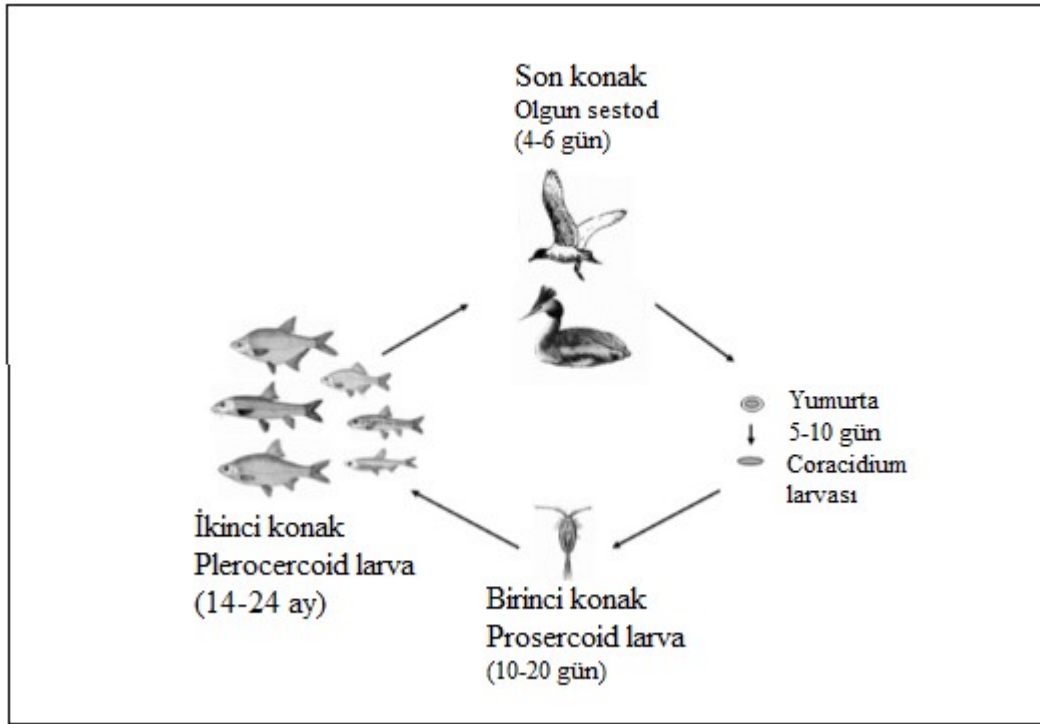
Tez konusu kapsamında incelenen *Ligula intestinalis* örneklerinin tür tespiti ve teşhisinde Bychowskaya-Pavlovskaya (1962)'den yararlanılmıştır. Bu kaynaklar desteğinde, tanımlaması yapılan tür ile ilgili tayin anahtarı aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

- 1a. Vücut dorso-ventral yönde yassılaşıymış, bilateral simetridi Plathelminthes ... 2
- 1b. Vücut silindirik yapıda, halkasız, bilateral simetridi, ışık geçirgen bir kutikula ile örtülü Nematelminthes
- 2a. Vücutun anteriöründe çekmen yok, konağa tutunmada rol oynayan salgı bezlerinin dışı açıldığı 2 veya 4 adet bezsi çıkıntı var. Vücutun posteriöründe kitin kancalarla donanmış bir tutkaç mevcut Monogenea
- 2b. Vücut kayış şeklinde uzamış, anteriörde bir tutunma organı var Cestoda 3
- 3a. Vücut segmentli. Skoleksin tepe kısmında apikal organ ile lateral kısımlarında iki adet bothrium taşıyan skoleks var. Halkaların her birinde bir veya iki çift ovaryum mevcut. Uterus ventralden dışarı açılır Pseudophyllidea 4
- 3b. Vücut segmentsiz, ovaryum vücutun posteriöründe ve tek Caryophyllidae
4. Pleuroserkoidlerdeki skoleks açıkça belirgin değil, skoleks üzerinde iz şeklinde iki adet bothrium var. Strobilada yalancı bir segmentasyon mevcut. Genital açıklık strobilanın ventralinde bir sıra halinde dizili. Ligulidae, *Ligula* 5
- 5a. Kassı yapılar boyuna ve enine olmak üzere iki tabaka halinde *Ligula intestinalis*
- 5b. Kassı yapılar boyuna ve enine olmak üzere üç tabaka halinde *Ligula pavlovskii*

2.3 *Ligula intestinalis*'in Yaşam Döngüsü

Bykhovskaya-Pavlovskaya (1962) ve Dubinina (1964), *Ligula intestinalis* türünün yaşam döngüsündeki birinci larval form olan proserkoid evre için ara konak görevi yapan kopepod türlerini *Cyclops sternuus*, *Acanthocyclops bicuspidatus*, *Eucyclops serrulatus* ve *Diaptomus gracilis* olarak belirlemişlerdir. Markevich (1951) bu parazit türün ikinci larval formu olan pleuroserkoid evrenin çeşitli tatlı su balıklarının (*Carassius carassius*, *Abramis brama*, *Blicca bjoerkna*, *Rutilus rutilus*, *Aalburnus alburnus*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Squalius cephalus*, *Gobio gobio* ve *Barbus barbus*) vücut boşluklarında görüldüğünü, son konak görevini ise martı, ördek, su dalgıcı, deniz dalgıcı gibi su kuşlarının üstlendiğine yer vermektedir.

Ligula intestinalis üç konaklı bir yaşam döngüsüne sahip pseudophyllid bir sestod türüdür. Parazitin yaşam döngüsünün baskın fazı, balıkların vücut boşluğunda yaşayan pleroserkoid evresidir. *Ligula* ile enfekte balıklar balıkçıl kuşlar tarafından yenir ve kuş bağırsağında ergin bireyler gelişir. Yumurtalar kuş dışkısı ile dış ortama atılır ve suda gelişir. Yumurtadan çıkan ve korasidyum denen larvaların gelişimini devam ettirebilmesi için uygun birinci ara konak olan bir kopepod tarafından yenmesi gerekir. Birinci ara konak olan kopepodların hemosölünde yaşam döngüsünün ilk parazit aşaması olan procerkoid gelişir. Balıklar ikinci ara konaklardır ve parazitli copepodları yiyerek enfekte olurlar (Olson *et al.* 2002).



Şekil 2.1 *Ligula intestinalis*'in yaşam döngüsü (Dubinina 1980).

2.4 *Ligula intestinalis* Enfeksiyonu ile İlgili Bazı Çalışmalar

Türkiye'deki farklı balık türlerinde parazit olarak yaşayan *Ligula intestinalis* enfeksiyonu üzerine ilk çalışmalar Başaran ve Kelle (1976) ile Cantoray ve Özcan (1975) tarafından yapılmıştır. Sonraki yıllarda gerek ülkemizde gerekse dünyada *L. intestinalis* enfeksiyon yaygınlığı ve parazit bolluğunun belirlenmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır (Arme and Owen 1968, Grabda-Kazubska *et al.* 1987, Burgu vd. 1988, Dechtiar and MacLean 1989, Molnar and Székely 1995, Appleby and Sterud

1996, Kır vd. 2004, Dörücü ve İspir 2005, Kır ve Tekin-Özan 2005, Tekin-Ozan vd. 2006, İnnal *et al.* 2007, Korkmaz ve Zencir 2009, Arslan vd. 2015). Çalışmalardan bazılarında, *L. intestinalis* enfeksiyonunun mevsimlere, balıkların yaş grupları ve eşey özelliklerine bağlı olarak gösterdiği değişimler belirlenmiştir (Kır vd. 2004, Kurupınar ve Öztürk 2009, Özbek ve Öztürk 2010, Demirtaş ve Altındağ 2011). Ayrıca, bu parazit türün, balık kondisyon faktörü, fizyolojik ve anatomik yapıları üzerine olan etkisi de incelenmiştir (Harris ve Wheeler 1974, Kırkağaç-Uzbilek ve Yavuzcan-Yıldız 2002, Ergönül ve Altındağ 2005, Museth 2005, İnnal ve Keskin 2005, Akmirza 2007, Tekin-Özan ve Barlas 2008).

Hartley (1947), besin içeriğinde *Cyclops*'ların yer aldığı, genç tatlı su balıklarındaki *Ligula* enfeksiyonunun yüksek, yaşlı bireylerdeki enfeksiyonun düşük yaygınlıkta olmasını ise, copepodla beslenmelerine bağlamaktadır. Benzer bulgular elde eden Dubinina (1964), *Abramis brama*'daki *Ligula* enfeksiyon yoğunluğunun en yüksek olduğu yaş aralığının 1+ ve 2+ olup, 3+ yaş ve üzeri bireylerde ise enfeksiyon yaygınlığında belirgin azalma tespit etmiştir. Araştırmacı, bu durumu, yaşlı *A. brama*'ların *Cyclops* yerine, bentoz ile beslenmelerine bağlamaktadır.

Dubinina (1964), *Ligula*'nın gelişiminde ortamın su kalitesinin de önemli olduğunu belirtmekte olup; sıcak, hafif dalgalı ve sığ suların *Ligula* için en iyi ortamlar olduğuna işaret etmektedir. Araştırmacı, belirtilen özelliklerdeki ortamların, copepodlar için de uygun ortamlar olduğunu, dolayısıyla enfekte bu canlılarla beslenen balıkların enfeksiyona yakalanma ihtimallerinin de yüksek olduğunu ifade etmektedir.

Harris ve Wheeler (1974) Thames Nehri (İngiltere)'ndeki *Alburnus alburnus*'larda ağır *Ligula intestinalis* enfeksiyonun genç balıklarda görüldüğünü, balıklardaki yaş artışıyla da enfeksiyonun azaldığını kaydetmiştir. Mevsim olarak, yazdan sonbahara doğru enfeksiyon olgusunda azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, genç konak balıkların, enfeksiyonu takip eden yılın sonbahar ve kış periyodunda öldükleri belirlenmiştir.

Arme and Owen (1968), *Ligula* pleuroserkoid büyüklüğüyle, balık büyüklüğünün orantılı olduğunu belirterek, enfeksiyonlu balıklarda ilk yıl parazit sayısının genellikle 1

adet olmasına karşın ikinci ve sonraki yıllarda parazit sayının 10 adede kadar yükseldiğini; yaşlı balıklarda ise 10 ila 30 adet arasında olduğunu, bazen 40 maksimum ise 50 adet olarak belirlemiştir. Wyatt ve Kennedy (1989), *Rutilus*'daki *Ligula* enfeksiyonunun maksimum seviyeye 0+/1+ yaşındaki bireylerinde kaydedilmiştir.

Molnar ve Szekely (1995), Macaristan'ın en önemli sulak alanlarından biri olan Balaton Gölü'nden incelenen 2 balık türünde *Ligula intestinalis* enfeksiyonuna rastlamıştır. *L.intestinalis* %1.8 enfeksiyon yaygınlığı ve 1.3 parazit bolluğu ile *Abramis brama*'da ilkbahar aylarında; *Neogobios fluviatilis*'te ise %30 enfeksiyon yaygınlığı ve 1 parazit/balık ile yaz döneminde görülmüştür.

2.5 *Ligula intestinalis*'in Patojenik Özellikleri

Patojenik bir parazit olan *Ligula intestinalis*'in konak balıklarda hemoglobin değerlerinde azalmaya neden olmaktadır. Kosheva (1956), *Ligula* ile enfekte *A.brama*'nın hemoglobin değerinin 14-35, sağlıklı balıklarda ise bu değer 42-55 olduğunu kaydetmiştir. Aynı araştırmacı, *Ligula* enfeksiyonu görülen *Rutilus rutilus*, *Blicca bjoernka*, *Abramis brama* bireylerinin, enfeksiyon taşımayanlarına göre karaciğerlerindeki glikojen seviyesinin daha düşük olduğunu belirtmiştir.

Kerr (1948), bu parazitin konak hipofiz bezinde gonadropik hormon salgısını önemli ölçüde baskıladığını, bunun sonucunda da gonad gelişiminin yavaşladığı belirtmektedir. Bunun sonucu olarak da, enfeksiyonlu erkek balıklarda gametogenez oluşumunun azaldığı, oluşan spermatozoitlerin sekonder safhaya ulaşamadıklarını; benzer şekilde enfeksiyonlu dişilerde de tam olgunlaşmış yumurtalara rastlanılmadığını ve yumurtaların erken vitellojenik safhada kaldıklarını belirtmektedir.

Taylor and Hoole (1989) ise, 4-6 aylık *R.rutilus* parmak balıklarındaki *Ligula* bireylerinin büyümelerine bağlı olarak, konak canlıının karın çeperinde incelleme olduğunu vurgulamıştır. Ayrıca, konak balığa ait organların ağırlığında ve kan parametre değerlerinde azalma, salgı bezleri ve gonadlarda küçülme gözlemiştir.

Günümüzde, tedavi süreci kapsamında *Ligulosis*'in kontrolü ile ilgili tam bir bilgi birikimi olmamakla birlikte en kesin çözüm olarak son konak canlıların ortamdaki uzaklaştırılması önerilmektedir. Ayrıca havuzlardaki zayıf, güçsüz balıkların toplanması, ağır enfeksiyon içeren ırmak, göl vb. su kaynaklarının tamamen boşaltılarak dezenfekte edilmesi ve yeni sağlıklı balıklar ile doldurulması tavsiye edilmektedir (Bauer 1959).

Museth (2005) Norveç'teki subalpin bir gölün otluk kıyı şeridi ile otluk olmayan açık bölgelerinde yaşayan yaşayan *Phoxinus phoxinus*'lardaki *Ligula intestinalis* enfeksiyon değerleri bakımından bir fark olmadığını kaydetmiştir. Benzer şekilde, *Ligula* enfeksiyon değerleri vertikal dağılımda da farklılık göstermemiştir. Araştırmacı, aynı ortamda yaşayan *Salmo trutta*'ların midesinden çıkan *Phoxinus phoxinus* örneklerinin çoğunlukla *Ligula* enfeksiyonlu olduğunu görmüştür. Museth (2005), *P. phoxinus* popülasyonunda yaş arttıkça *Ligula* enfeksiyonunun azaldığını, bunda genç bireylerin *Ligula* enfeksiyonuna bağlı ölümleriyle açıklamaktadır. Araştırmacı, *Ligula* plerocercoidleriyle parazitli konak balıkların karın bölgesindeki şişkinlikten dolayı fanyalı ağlarla daha kolay takıldıklarını vurgulamaktadır.

2.6 *Ligula intestinalis*'in Moleküler Tanımlaması Üzerine Çalışmalar

Bouzid vd. (2008a), farklı coğrafi bölgelerden, *Ligula intestinalis* popülasyonlarının genetik çeşitliliğini araştırmak için, 10 konakçı türüne ait dokuz basit dizi tekrar (ISSR) belirteçleri araştırmıştır. Üretilen ISSR kalıplarından seçilen 110 lokus, % 100 bir polimorfizm ve 0.776 Nei's indeksi (GST) ile analiz edilen örnekler arasında yüksek değişkenlik ortaya koymuştur. Başlıca genetik farklılaşma, beş geniş coğrafi bölgeyle (Avrupa, Çin, Kanada, Avustralya ve Cezayir) ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, Avrupa'daki izolatlar, farklı coğrafi bölgelerden ve farklı konaklardan alındığı halde, önemli bir genetik varyasyon bulunmamıştır. Sonuçta, ISSR yaklaşımının hızlı ve ucuz olduğu ve *L.intestinalis*'in genetik çeşitliliğini değerlendirmek için güvenilir göstergeler sağladığı gösterilmiştir (Bouzid *et al.* 2008a).

Li vd. (2000), *Ligula intestinalis* (Pseudophyllidea, Ligulidae)'in etanol içinde müze materyali halinde muhafaza edilen 5 ila 20 yıllık örneklerini kullanarak DNA izolasyonu ve moleküler tanımlaması yapmıştır. DNA, Çin Qinghai – Tibet Platosu, Rusya ve İngiltere'de hem tuz hem de tatlı su kütlelerinde yaşayan farklı balık konakçılarından toplanan örneklerden polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Nükleer 28S rRNA geninin 5' ucunun kısmi nükleotid sekanslarına dayanan filogenetik analizler ve mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt-birimi I (COI) geni, Avrupa karşılığı olarak aynı türdeki Çin Ligulalarını gruplayan morfolojik temelli taksonomiye *L.intestinalis* olarak desteklemektedir. Farklı bölgelerden toplanan 8 adet *L.intestinalis* örneğinin gerek 5' baz sonlu nuklear 28SrRNA geni ve gerekse mitokondriyal cytochrome c oxidase subunit I (COI) geni arasında nükleotid varyasyon tanımlanmamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, coğrafik izolasyon, konak özgünlüğü ve konak habitat farklılığı *Ligula*'nın sınıflandırılmasında taksonomik kriter olarak güvenilir değildir. Sonuçlar ayrıca göstermektedir ki, Avrupa ve Çin'deki coğrafik bölgeler arasında düşük bir genetik farklılık söz konusudur. Deneyler, kalıcı formalin fiksasyonuna tabi tutulan parazit tenyalardan rutin olarak DNA çoğaltılabildiğini de göstermiştir, bu da formalindeki fiksasyon zamanının, bu tip müze örneklerinde DNA bozunmasını etkileyen kritik bir faktör olmadığını düşündürmektedir.

Bouzid vd. (2008b), soyağacı ve genetik yapı, coğrafya ve konak balık tercihinine göre, tatlı su balıklarını etkileyen bir tenya olan *Ligula intestinalis* türünü analiz etmiştir. Veriler, makrocoğrafik ölçekte 18 farklı lokasyondaki 13 konak balık türünden 109 adet tenya üzerinden derlenmiştir. Genetik rekonstrüksiyon için iki mitokondriyal gen, sitokrom oksidaz altbirimi I ve sitokrom B, ve Intergenik Transkripsiyonlu Spacer 2'nin (ITS2) nükleer dizilimi kullanılmıştır. Yerel ve küresel coğrafi ölçeklerde farklı evrimsel çeşitlilik bulunmuştur. Yerel ölçekte homojen genetik yapı esas olarak bitişik aralık genişlemesine bağlanmıştır. Göç yapan kuşlar, tüm popülasyonun homojenleşmesinin en muhtemel nedeni olup, önemli genetik engellerin oluşturulmasını engellemektedir. Buna karşılık, küresel ölçekte, genetik olarak uzak ve iyi ayrılmış kümeler farklı coğrafi bölgelerde mevcuttur. Üreme izolasyonu, aynı son konakçıyı infekte eden ve simpatrik kladlar arasında bile bulunmuş olup, bu da biyolojik olarak belirlenmiş genetik engellerin var olduğunu ve muhtemelen farklı türlerin var olduğunu

düşündürmektedir. ITS2 sekanslarının önemli intragenomik değişkenlik gösterdiği bulunsa da, ilişkileri genellikle mitokondriyal genlerden elde edilen topoloji ile iyi bir uyum içinde olduğu ifade edilmiştir. Çünkü daha hızlı mutasyon olduğu anlaşılmıştır.

Logan vd. (2004), Diphyllbothriidae (Ligula, Digamma, Diphyllbothrium ve Schistocephalus) familyasına ait 20 pseudophyllid sestoğ örneğinin ITS-2 rRNA gen dizilerinin filogenetik analiz sonuçlarını şu şekilde değerlendirmişlerdir: 1-Ligulidlerin Diphyllbothriidae dahil edilmesi doğrudur. 2-Ligula intestinalis'e ait olan Ligula izolatları, bu türün ayrı bir takson kompleksi oluşturabileceğini gösteren parafiletik bir özellik taşımaktadır. Sonuçta, Diphyllbothriidae familyasının taksonomik revizyon gerektirdiğini göstermektedir (Logan et al. 2004).

Olson vd. (2002), Gudgeon (*Gobio gobio*) ve Roach (*Rutilus rutilus*) balıklarındaki Ligula (Cestoda: Pseudophyllidea) enfeksiyonlarının, özellikle doku tepkisi ve gonadal gelişimin inhibe edilmesi açısından, belirgin bir şekilde fark olduğunu belirlemiştir. Ayrıca, ITS bölgesi (ITS-1, 5.8S, ITS-2) ve büyük altbirim alanları (D1–D3) Galler'den minnow (*Phoxinus phoxinus*)'a ait bir örnekle; Lough Neagh, Kuzey İrlanda'daki Gudgeon (*Gobio gobio*) ve roach (*Rutilus rutilus*) balıklarından elde edilen parazitlerin dizileri belirlenip karşılaştırılmıştır. *R.rutilus* ve *G.gobio*'daki Ligulid parazitler arasında farklı suşları/türleri temsil edebileceği önerisini destekleyen yeterli farklılıklar gözlenmiştir. Aksine, *P.phoxinus*'taki Ligula'nın, *R.rutilus*'takilere çok benzediği belirlenmiştir. Lough Neagh'taki ayrı Ligula suşların ya da türlerinin bir arada bulunması, büyük olasılıkla *R.rutilus*'un bu sulara girmesi ve büyük tepeli bahri kuşlarının (*Podiceps cristatus*) sayısındaki artışla ilişkili bulunmuştur.

Li and Liao (2003), Ligulid tenyalarından 2 cins, *Ligula* Bloch, 1782 ve *Digamma* Cholodkovsky, 1914'ın geleneksel sınıflandırması hala tartışmalı olduğunu belirtmektedir. Nükleer 28S rRNA geninin 5'ucu, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birimi I (COI) geni ve nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz alt birimi 1 (ND 1) geni için dizilerin moleküler verileri ve ayrıca Nükleer ribozomal deoksiribonükleik asidin (DNA) ITS 1 geni, *Digamma*'yı karakterize etmek ve *Ligula* ile olan ilişkisini araştırmak için kullanılmıştır. Çalışma sonucuna göre, *Digamma* spp, hem 28S rRNA

hem de COI geninde *Ligula intestinalis* ile özdeş sekanslar sergilemiş ve ITS1 bölgesinde *L.intestinalis*'ten ve ND1 geninde % 7,4 farklılık göstermiştir. *Ligula* ve *Digramma*'da 28S ribozomal DNA, COI, ITS 1 ve hatta ND 1 genlerinde yüksek derecede genetik koruma bulunmuştur. *Digramma* ile 4 gen arasındaki düşük genetik sapma, *Digramma*'nın muhtemelen bağımsız bir cins olmadığını göstermektedir. Bu nedenle *Ligula* ve *Digramma*'nın, *Ligula* cinsi içerisinde 2 tür ve Çin'in çeşitli yerlerinden toplanan *Digramma* bireylerinin aynı türlere ait olduğu düşünülmüştür. Ayrıca ITS 1 ve ND1 dizilerinin *Ligula* ve *Digramma*'yı ayırmak için yararlı genetik belirteçler olarak gösterilmiştir.

Luo vd. (2003), *Digramma* (Cestoda: Pseudophyllidea) cinsinin, sadece proglotis başına üreme organlarının sayısı ile *Ligula* cinsinden farklı olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte araştırmacılara göre, *Digramma*'daki geçiş formlarının ortaya çıkışı, genel geçerliliği ile ilgili çok karışıklık ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmada, daha önce *Digramma* ve *Ligula* olarak adlandırılan cestolar, Yangtze Nehrinin alt ve orta kısımlarındaki göllerden ve ayrıca Çin'in Qingzang platosundaki Çinghay Gölü'nden toplanmıştır. Ribozomal DNA'nın (ITS rDNA) tüm iç kopyalanmış spaceri ve 28S rDNA'nın 5' ucu, *Digramma* ve *Ligula* örnekleri arasında karşılaştırılmıştır. İki cins arasındaki düşük nükleotid varyasyonu, *Digramma* cinsindeki sestodların *Ligula* cinsine parafiletik olduğunu ve *Digramma*'nın *Ligula*'nın bir eşanlamlısı olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte, daha önce tanımlanmış olan *Digramma* sestodasının, *Ligula* cinsindeki farklı türleri temsil edip etmediği daha fazla araştırmayı gerektirdiği vurgulanmaktadır.

Lagru vd. (2018), Yeni Zelanda'nın Güney Adası, Hawea Gölü'ndeki yaygın zorba, *Gobiomorphus cotidianus* ve quinnat somonu, *Oncorhynchus tshawytscha*'dan ortaya çıkan tenya *Ligula* sp'nin olgusunu bildirmiştir. Parazitler oldukça büyük boyutlarda kaydedilmiştir (60-300 mm). Bununla birlikte, balık popülasyonlarındaki düşük prevalanslar, enfeksiyonun nadir veya lokal olduğunu düşündürmüştür. ITS1 ve ITS2 dizileri, bu örneklerin *Ligula* cinsine ait olduğunu doğrulamıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Parazit Örnekleri

Kurupınar ve Öztürk (2009) ile Özbek ve Öztürk (2010) tarafından, Çatıören, Kunduzlar ve Örenler Baraj Gölleri'ndeki inci balığı (*Alburnus escherichii*), Karaburun balığı (*Chondrostoma nasus*), kadife balığı (*Tinca tinca*) ve tatlisu kefal balığı (*Squalius cephalus*)'nın karın boşluğundan izole edilen ve %70 etanol içinde depolanmış halde müze materyali olarak korunan *Ligula intestinalis* örnekleri araştırma materyali olarak kullanıldı. Örneklerin bulunduğu coğrafik yer, konak balık ismi ve toplanma tarihi çizelge 4.1'de sunuldu.

Pleroserkoid *Ligula intestinalis* örneklerinden morfolojik olarak tür tanımlaması için, transversal kesit alınarak iç organların yapı ve konumlarının bilinmelidir. Bu nedenle, pleroserkoidlerden mikrotom ile transversal kesit almak gerekir. Mikrotomla kesit işlemi için, 1 cm uzunluğundaki pleuroserkoid parçaları sırası ile %100 absölü alkol, absölü alkol-ksilol (1:3, 1:1, 3:1) ve %100 ksilol serilerinden geçirildi. Daha sonra parafin ile bloklanıp, donması için 1 gün bekletildi. Numune bloklardan kızaklı mikrotom ile 7µ kalınlığında transversal kesit alındı. Pleroserkoid kesitleri hematoksilin eosin ile boyandıktan sonra, daimi preparat haline getirildi. Preparatlar oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek kurutulmuş ve ışık mikroskobunda incelendi.



Resim 3.1 Araştırma örneklerinin alındığı *Ligula intestinalis* bireyleri



Resim 3.2 *Ligula intestinalis* örneklerini seçme işlemi



Resim 3.3 Rastgele seçilmiş *Ligula intestinalis* örnekleri

3.2 DNA İzalasyonu

Analizler için stoktaki örnekler arasından 6 *Ligula intestinalis* bireyi rastgele seçildi. Örneklerle ait genomik DNA, EurX GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılarak elde edildi (<https://eurx.com.pl/manuals/en/E3551-TissueBacterial.pdf>). İzole gDNA'nın miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi.



Resim 3.4 *L. intestinalis* dokularından DNA izolasyonu

3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu reaksiyonu için 30 µl hacimde şu ortam hazırlandı: 1 µl genomik DNA, her primerden 10 mM, 15 mM MgCl₂, her bir dNTP den 20 mM ve 5 U TaqPolimeraz (Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase). PZR işlemi COIA2 5'CATATGTTTTGATTTTTTGG3' ve COIB2 5'AKAACATAATGAAAATGAGC3' primerleri ile gerçekleştirildi (Bouزيد *et al.* 2008b, Çizelge 3.1). Primerler ve konumları Çizelge 3.2 de listelendi. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU reaksiyonu şu şekilde

gerçekleştirildi: 95°C de 5 dakika, takiben 35 döngü, 95°C de 45 saniye, 57°C de 45 saniye ve 72°C de 1 dakika, ve son bir final uzatması olarak 72°C de 5 dakika. Daha sonra sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR tamamlandı. gDNA jelden kesildi ve EurX GeneMATRIX Agarose Out DNA pürifikasyon kiti (Polonya) kullanılarak saflaştırıldı.

Çizelge 3.1 *Ligula intestinalis*'in COI genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler

Hedef gen	Primerler	Dizileme (5'-3' yönü)	Kaynak
COI	COIA2	CATATGTTTTGATTTTTTGG	Bouزيد <i>et al.</i> 2008b
(mtDNA)	COIB2	AKAACATAATGAAAATGAGC	Bouزيد <i>et al.</i> 2008b

Çizelge 3.2 GenBank'tan alınan ve filogenetik analizde kullanılan taksonomik birimler

Parazit tür	Gen Dizisi	Kayıt no	Kaynak
<i>Ligula intestinalis</i>	COI	AF153910	Li <i>et al.</i> 2000
<i>Hymenolepis diminuta</i>	28S rDNA	K03537	Qu <i>et al.</i> (1986)
<i>Taenia crassiceps</i>	COI	NC002547	Rostami <i>et al.</i> 2013

3.4 Dizileme, Veri Analizi ve Ağaç Yapımı

Saflaştırılmış PZR ürünleri doğrudan COIA2 ve COIB2 primerleri ile ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Macrogen Hollanda laboratuvarı) kullanılarak dizilendi.

Nükleotid dizileri Mega 7.0 çoklu dizi hizalama ClustalW2 yazılımı kullanılarak hizalandı ve elle ayarlandı. 5.8S rRNA gen dizilerinin homoloji araştırması FASTA programı (EMBL; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>) ve BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. Genetik mesafeler, Mega 7.0'da çift yönlü silme yöntemi Kimura iki parametrelili model kullanılarak hesaplandı.

Farklı lokaliteye ait *Ligula intestinalis* ile dış grup olarak kullanılan *Hymenolepis diminuta* ve *Taenia crassiceps* üzerinden filogenetik analiz, Mega 7.0'da Maksimum-Likelihood (ML) analizi kullanılarak yapıldı. ML ağaçlarındaki güven, Mega 7.0 programını kullanarak 1.000 bootstrap replikatu analizi edilerek belirlendi (Çizelge 3.2).

4. BULGULAR

4.1 *Ligula intestinalis*'in Anatomik ve Morfolojik Özellikleri

Ligula intestinalis pleuroserkoidleri 4.7-18.3 (12.6) cm boyunda, 4.2-13.8 (9.6) cm eninde tespit edilmiştir (Resim 4.1). Pleroserkoidler, kayış şeklinde dorso-ventral yönünde yassı ve etli olup, ventral yüzeyi boyunca uzunlamasına yiv şeklinde bir iz bulunmaktadır. Anteriör terminal kısım ovalimsi bir şekilde sonlanmaktadır. Anteriör terminalde skoleks görevi yapan 2 bothrium iz çentiği şeklinde az belirgindir.

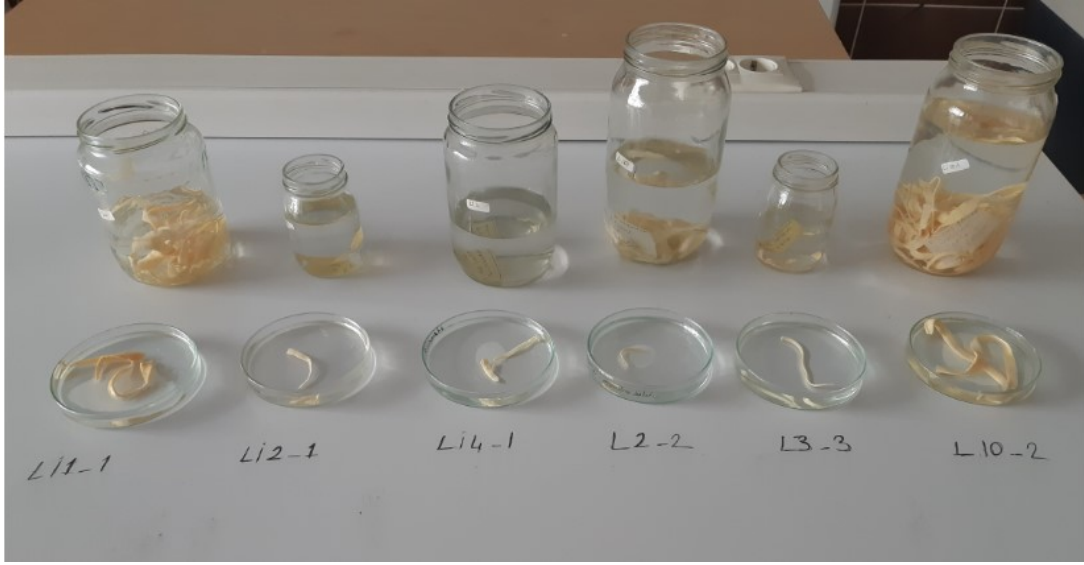
Pleroserkoidlerin strobila denen gövde kısmı üzerinde yalancı segmentasyon görülmektedir. *L.intestinalis* pleuroserkoidlerine uygulanan enine gövde kesit işlemi sonucu, enine ve boyuna kas dokuları birer tabaka yer almaktadır (Resim 4.2-4.7).

Pleuroserkoid evredeki *L.intestinalis* bireyleri ergin bireyler olmamasına karşın testis, ovaryum ve vitellojen bezleri gibi genital yapılar gelişmiştir (Resim 4.2). Testisler, ovaryum ve uterusun bulunduğu median alan hariç, merkezi paraşima dokusu ortamında tek sıra halinde dizilmiştir.

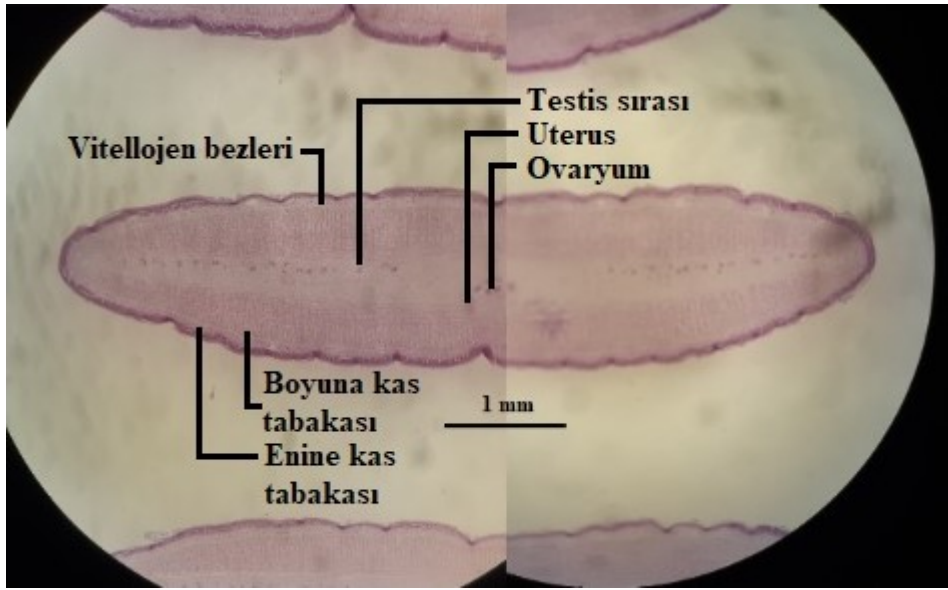
Ovaryum, her segmentte bir adet olup, genital açıklığın karşısında bulunmaktadır. Median alanda yer alan uterus, tüpsü yapıdadır. Uterus, vajinayla birlikte ortak bir kanalla dışarı açılmaktadır. Vitellojen bezleri kesemsi şekilli yapılardır. Bu bezler, korteks paraşima dokusu ile boyuna kas tabakası arasındaki alanda konumlanmıştır.

4.2 DNA İzolasyon Verileri

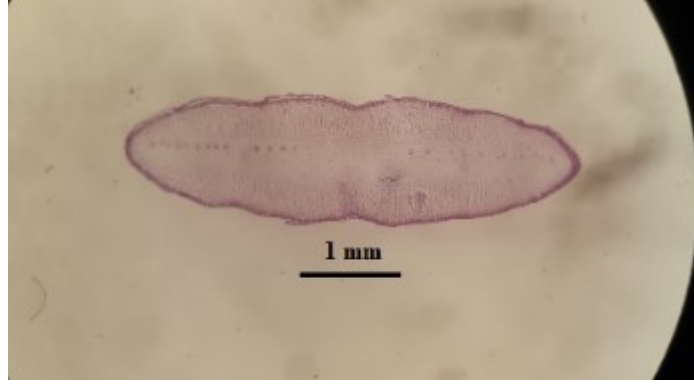
Bu çalışmada, 8 yıldır etanol ortamında muhafaza edilen 6 adet *Ligula intestinalis*'in (Pseudophyllidea, Ligulidae) moleküler tanımlaması Mitokondriyal sitokrom c oksidaz I (COI) gen ekstraksiyonu ile yapılmıştır. COI geni POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU temelli çoğaltılmıştır. Örneklerin tamamında tek bir desen ve güvenilir bant kaydedilmiştir. Bantların boyutu 480 bp olarak belirlenmiştir (Resim 4.8).



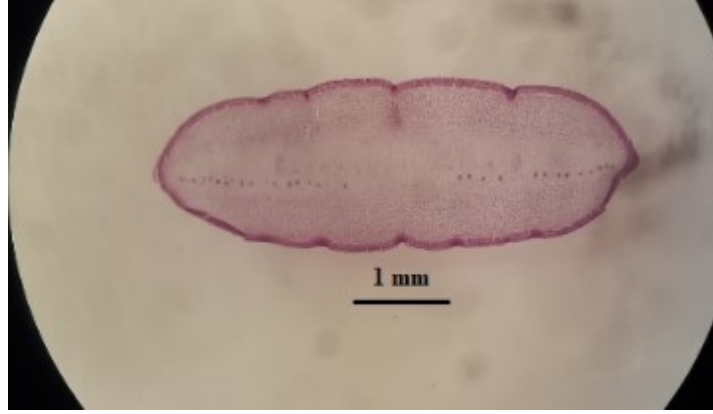
Resim 4.1 Araştırmada kullanılan ve etil alkol ortamında korunan *Ligula intestinalis* örnekleri (orijinal)



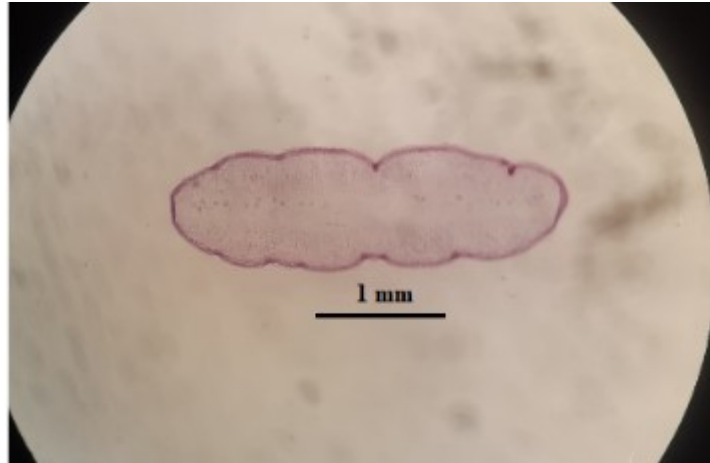
Resim 4.2 L1-1 nolu *Ligula intestinalis* örneğine ait enine kesit (orijinal)



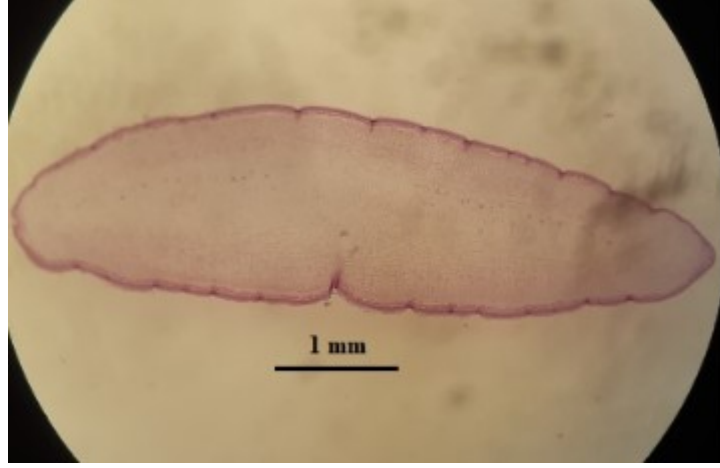
Resim 4.3 L2-1 nolu Ligula intestinalis örneğine ait enine kesit (orijinal)



Resim 4.4 L4-1 nolu Ligula intestinalis örneğine ait enine kesit (orijinal)



Resim 4.5 L2-2 nolu Ligula intestinalis örneğine ait enine kesit (orijinal)



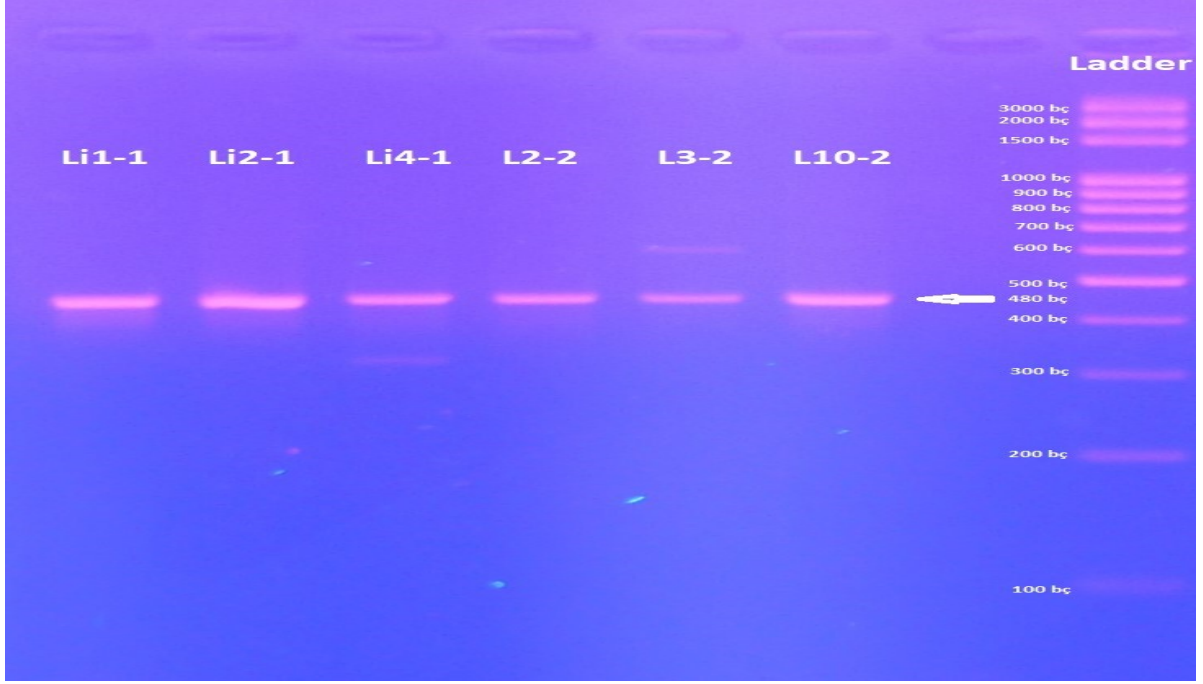
Resim 4.6 L3-2 nolu *Ligula intestinalis* örneğine ait enine kesit (orijinal)



Resim 4.7 L10-2 nolu *Ligula intestinalis* örneğine ait enine kesit (orijinal)

4.3 Dizileme Verileri

COI geninin 480 bp kısmı belirgin nükleotidleri, her örnekten doğrudan dizilendi. *L.intestinalis* örneklerine ait COI gen dizileme verileri, GenBankta kayıt altına alındı (Çizelge 4.1). Örneklere ait COI genin hiçbirinde nükleotid varyasyonu tespit edilmedi. Sadece, L2,2 nolu örneğin 225'inci C nükleotidin, diğer tüm örneklerde T nükleotiti olarak dizildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bu bağlamda dizilerin eşleşme oranı %94-97, benzerlik oranı %99 dur. Bu veriler 6 *Ligula intestinalis* bireyine ait COI gen dizilerinin özdeş olduğunu gösterilmiştir.



Resim 4.8 *Ligula intestinalis* örneklerine ait COI gen dizisine ait Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA

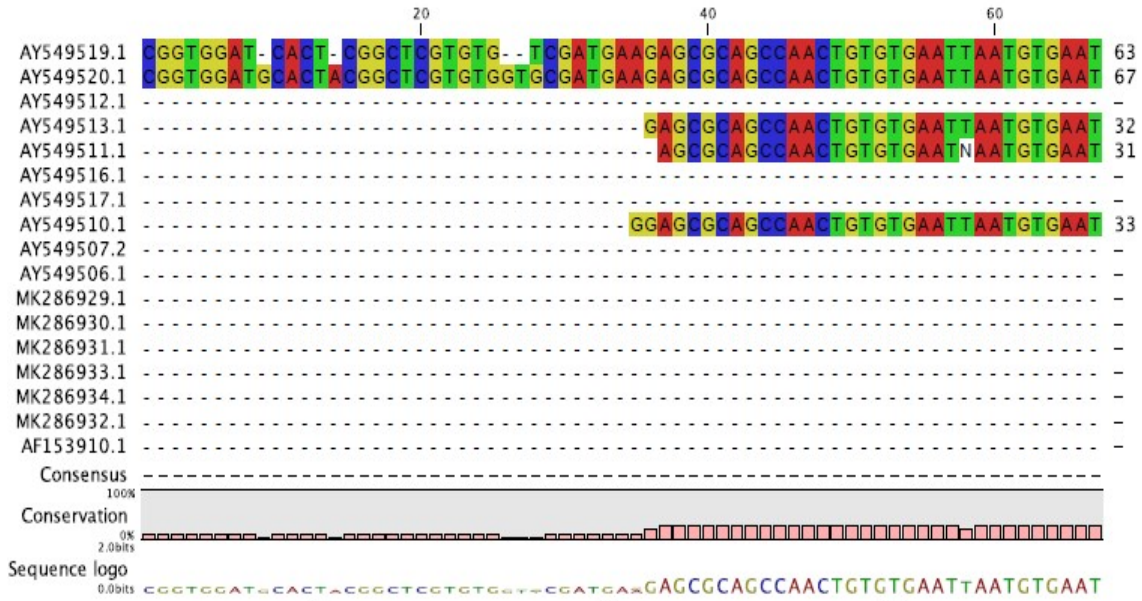
Çizelge 4.1 Bu çalışmada kullanılan *L.intestinalis* örneklerine ait bilgiler

Coğrafik yer	Konak balık	Toplanma tarihi	Fiksasyon ve Muhafaza edilen madde		Örnek no	DNA izolasyonu	GenBank Kabul No
Kunduzlar Baraj Gölü	<i>Alburnus escherichii</i>	25.10.2008	Etanol		L1-1	Var	MK286929
	<i>Chondrostoma nasus</i>	03.02.2009			L4-1	Var	MK286930
	<i>Squalius cephalus</i>	02.02.2009			L2-2	Var	MK286931
Çatiören Baraj Gölü	<i>Tinca tinca</i>	28.11.2004			L3-2	Var	MK286932
Örenler Baraj Gölü	<i>Squalius cephalus</i>	08.03.2008			L10-2	Var	MK286933
Kunduzlar Baraj Gölü	<i>Squalius cephalus</i>	03.02.2009			L2-1	Var	MK286934

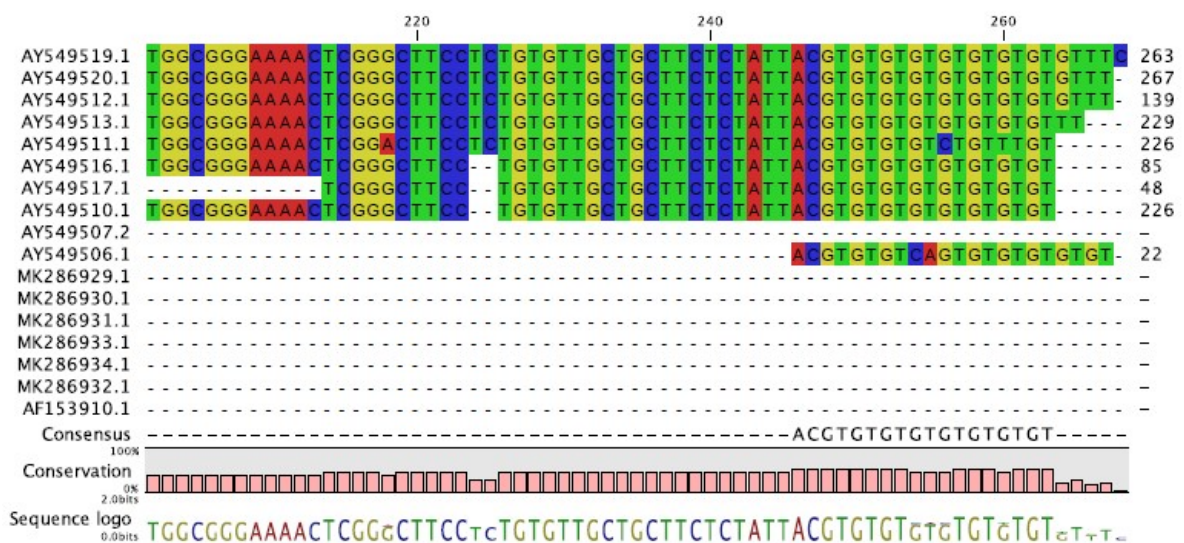
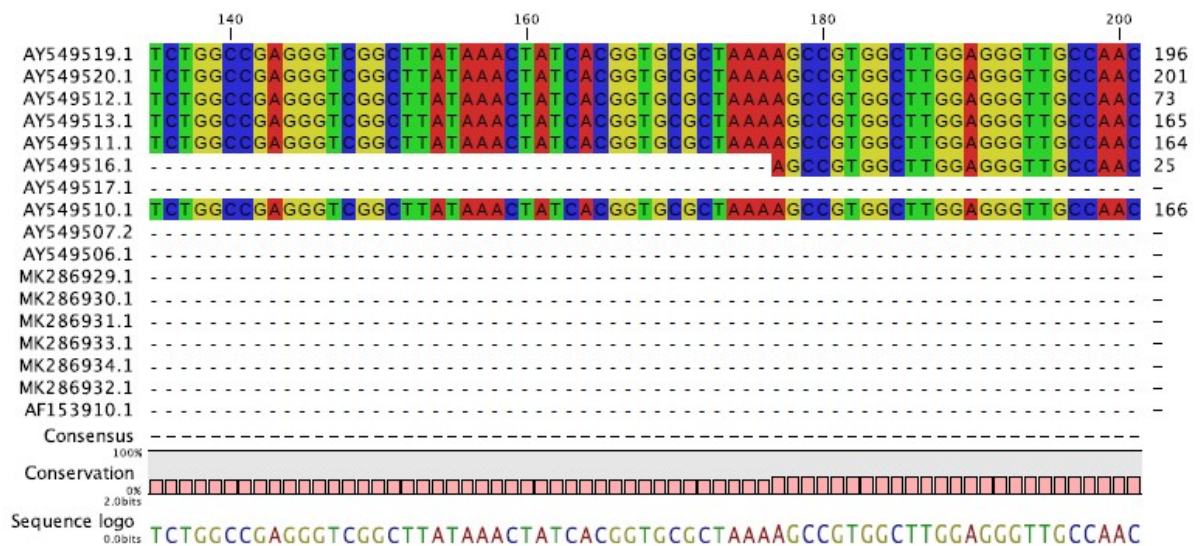
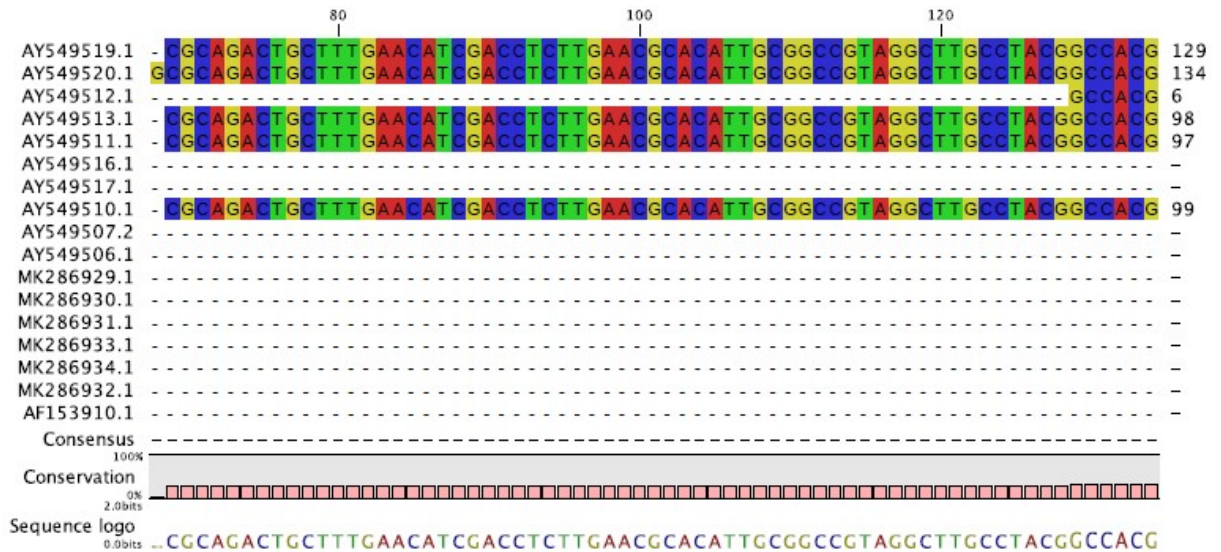
Çatıören, Kunduzlar, Örenler baraj gölündeki *Ligula intestinalis* populasyonlarının COI gen bölgesi dizileri 409 nükleotit pozisyonunda daha önce genbanka kaydedilmiş *Ligula intestinalis* dizisi (AF153910.1) ile karşılaştırılmış ve bu iki izolat arasında %7 varyasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Bu çalışmada elde edilen *Ligula intestinalis* izolatları (MK286929-MK286934) ile AF153910.1 *L.intestinalis* izolatına ait COI nükleotid dizi varyasyonu.

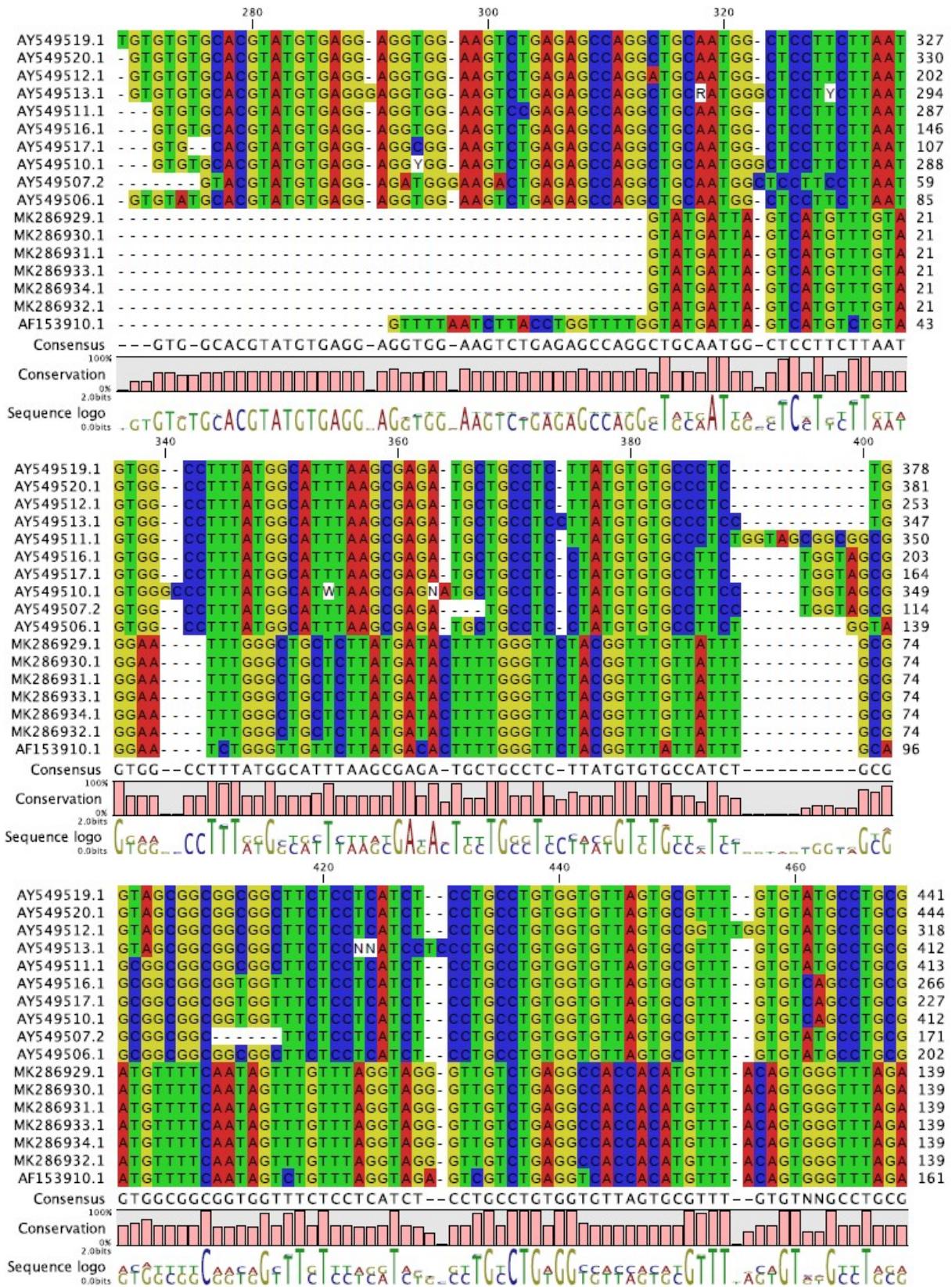
GenBank Numarası	İzolat ve Lokalite	Nükleotid Dizi Farklılığı (%)
MK286929- MK286934	<i>Ligula intestinalis</i> - Çatıören, Kunduzlar, Örenler,Türkiye	0
AF153910.1	<i>L. intestinalis</i> -Çin	7



Resim 4.9 Bu araştırma kapsamında elde edilen *L.intestinalis* izolatları (MK286929-MK286934) ile AF153910.1 *L. intestinalis*, AY549506.1 *Digamma interrupta*, AY549507.1 *Diphyllobothrium ditremum*, AY549510.1 *Ligula colymbi*, AY549511.1 *Ligula colymbi*, AY549512.1 *Ligula intestinalis*, AY549513.1 *Ligula intestinalis*, AY549516.1 *Ligula intestinalis*, AY549517.1 *Ligula intestinalis*, AY549520.1 *Ligula intestinalis* AF153910.1 *L.intestinalis*, *Ligula colymbi*, *Digamma interrupta*, *Diphyllobothrium ditremum*'un COI ve ITS gen bölgelerinin hizalanması. Sayılar hizalama pozisyonuna işaret eder. Kırmızı Adenini, yeşil Timini, sarı Guanini ve mavi ise Sitozin (Cytosine) nükleotitlerini ifade etmektedir. Aynı nükleotitlere sahip pozisyonlar aynı renkte boyanmış olarak gösterilmektedir.



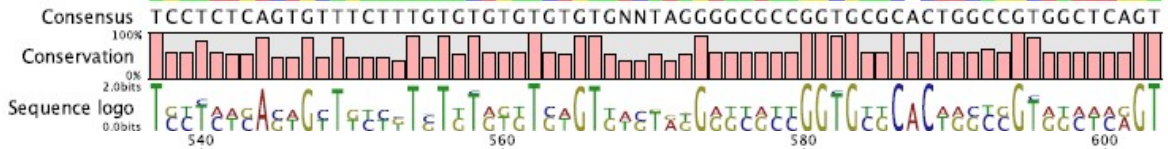
Resim 4.9 (Devam)



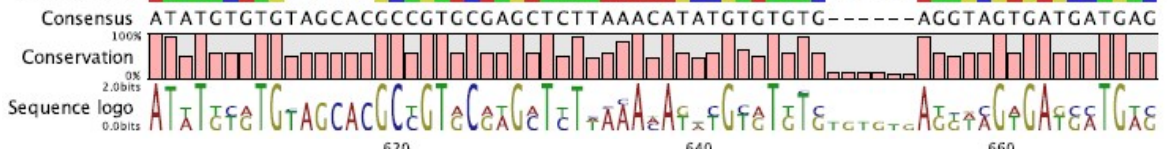
Resim 4.9 (Devam)

480 500 520

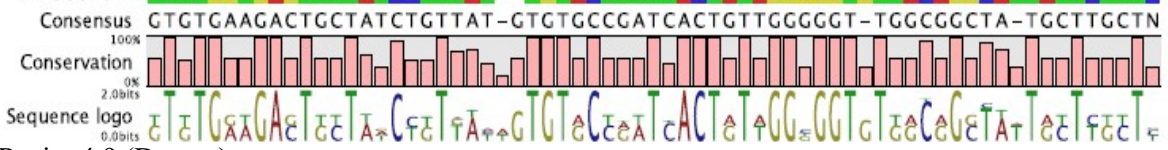
AY549519.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 506
 AY549520.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTGGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 511
 AY549512.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 369
 AY549513.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 478
 AY549511.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTG--AGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 478
 AY549516.1 TCCCCCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 329
 AY549517.1 TCCCCCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 292
 AY549510.1 TCCCCCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTG--GSGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 475
 AY549507.2 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTG--GGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 230
 AY549506.1 TCCTCTCAGTGTGTTCTGTGTGTGTGTGTGTGTTGGGGGGCGCCGGTGGGCACTGGCCGTGGCTCAGT 259
 MK286929.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 MK286930.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 MK286931.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 MK286933.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 MK286934.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 MK286932.1 TGTTAAGACAGCTGTCTTCTTTAGTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 205
 AF153910.1 TGTTAAGACAGCTGTGTTTTTTTCACTATGATTATTGGTGTTC--GAACTGGTATAAAGGT 227



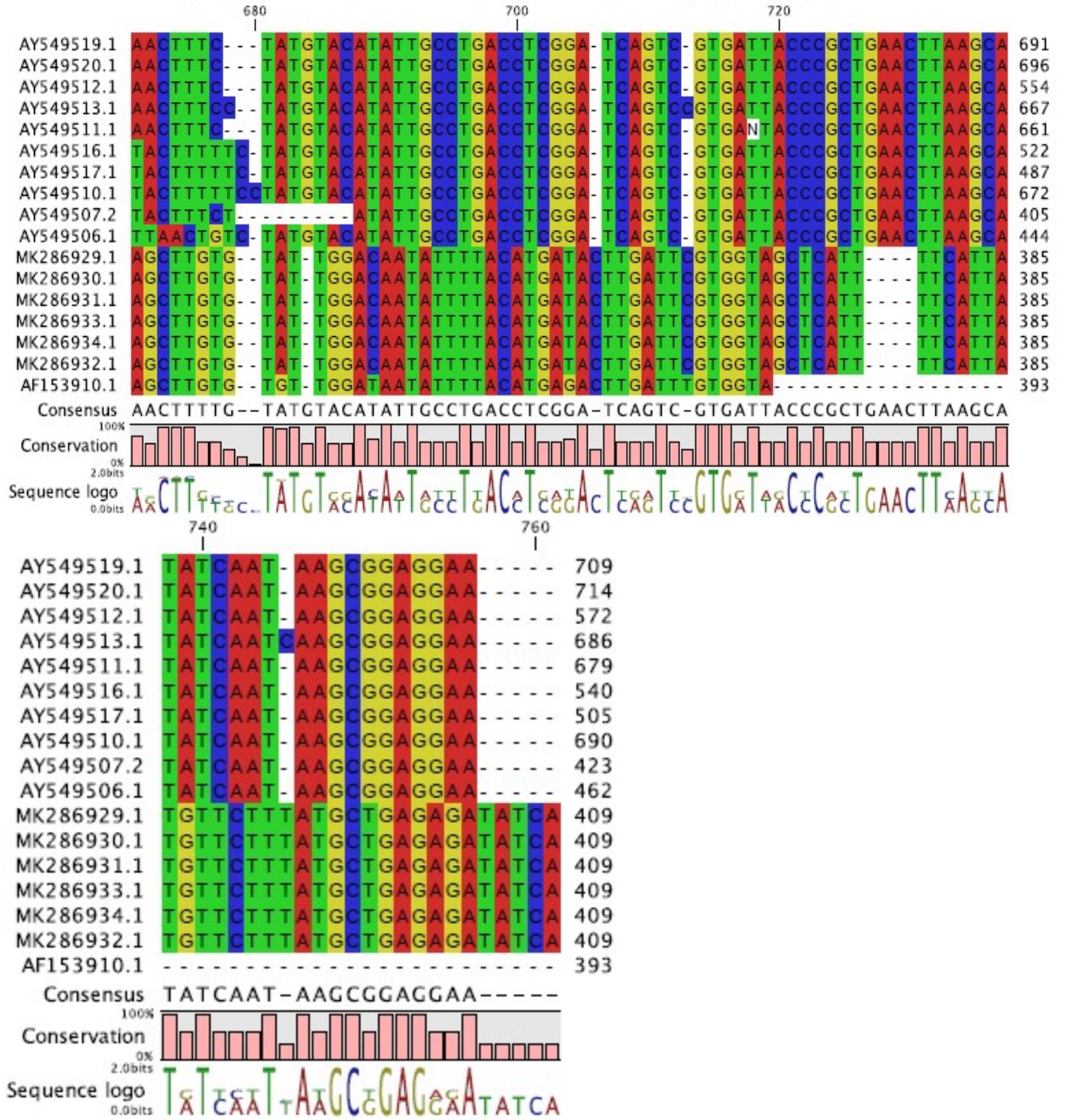
AY549519.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 565
 AY549520.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 570
 AY549512.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 428
 AY549513.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 538
 AY549511.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 537
 AY549516.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCTAACATATGTGTGTGTGTG--AGGTAGTGATGATGAG 394
 AY549517.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCTAACATATGTGTGTGTGTGTGAGGTAGTGATGATGAG 359
 AY549510.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCTNNTCAACATATGTGTGTGTGTGAGGTAGTGATGATGAG 542
 AY549507.2 A--TGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCTAAACATATGTGTGTG-----GTTAGTGATGATGAG 288
 AY549506.1 ATATGTGTGTAGCACGCCGTGGAGCTCT--AACATATGTGTGTG-----AGGTAGTGATGATGAG 318
 MK286929.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 MK286930.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 MK286931.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 MK286933.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 MK286934.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 MK286932.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 260
 AF153910.1 ATTTTCATG-----GCTGTACATGATTTTAAAAAGTGCATTTT-----ATTACGAGAGCCCTGTC 282



AY549519.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTACTGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 629
 AY549520.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTACTGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 634
 AY549512.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTACTGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 492
 AY549513.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTACTGTGTGCCGATCACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 603
 AY549511.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTAA--GTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 599
 AY549516.1 GTGTGAAGACTGCTAGCTGTGTAAAGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTT-TGCTTGCTG 458
 AY549517.1 GTGTGAAGACTGCTAGCTGTGTAAAGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTT-TGCTTGCTG 423
 AY549510.1 GTGTGAAGACTGCTAGCTGTGTAAAGTGTGCCGATCACTGTTGGTGGT-TGGGGCTT-TGCTTGCTG 607
 AY549507.2 GTTTGAAGACTGCTA---TGTTAGTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGTGGCTATGCTTGCTT 349
 AY549506.1 GTGTGAAGACTGCTTACTGTTA--GTGTGCCGAT-ACTGTTGGTGGT-TGGGGCTA-TGCTTGCTT 380
 MK286929.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 MK286930.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 MK286931.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 MK286933.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 MK286934.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 MK286932.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTATTCACATATAGGGGGTGTACAGGTATTATTCTTTT 325
 AF153910.1 TTTTGGTGAATTTTATCCTTTAT--TGTACTTTTACTATAGGGGGTGTACAGGCATTATTCTTTT 347



Resim 4.9 (Devam)



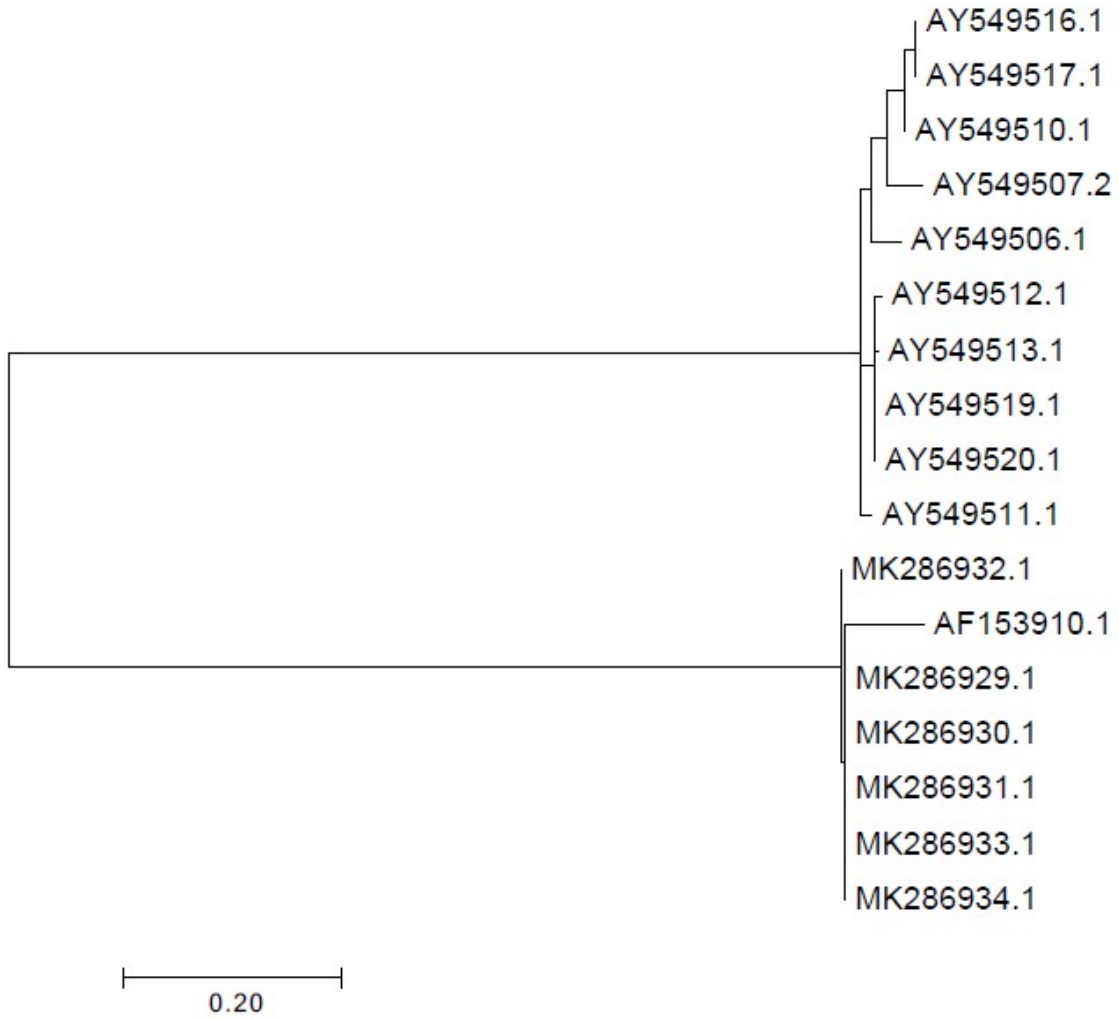
Resim 4.9 (Devam)

Bu araştırmada COI dizisi tanımlanan 5 izolat kendi aralarında tam bir dizi benzeşmesi göstermiştir. Buna karşın MK286932.1 numaralı izolatın 225. nükleotidinde sadece 1 varyasyon bulunmuştur (Resim 4.9). Ayrıca bu çalışmada elde edilen izolatlar ile *Ligula intestinalis* (AF153910.1) COI gen bölgesinin hızlanması sonucu 26 pozisyonda varyasyon tespit edilmiştir. Bu varyasyonlar 331-345-350-353-363-383-402-417-429-433-442-485-488-491-515-525-528-573-576-591-638-659-682-689-704-713 olarak grlmştir (Resim 4.9).

Mevcut araştırma izolatlarının COI dizi verileri, ITS gen dizi bölgeleri çalışılan AY549506.1 *Digamma interrupta*, AY549507.1 *Diphyllobothrium ditremum*, AY549510.1 *Ligula colymbi*, AY549511.1 *Ligula colymbi*, AY549512.1 *Ligula intestinalis*, AY549513.1 *Ligula intestinalis*, AY549516.1 *Ligula intestinalis*, AY549517.1 *Ligula intestinalis*, AY549520.1 *Ligula intestinalis* AF153910.1 *L.intestinalis* izolatlarının verileri ile karşılaştırılmıştır. Gen dizileri arasında beklendiği üzere çok sayıda varyasyon tespit edilmiştir (Resim 4.9).

4.4 Ağaç Verileri

Kısmi nükleotit dizilerine dayanan filogenetik analizler, *L.intestinalis*'in morfolojik temelli taksonomik konumunu doğrulamıştır. COI ve ITS gen dizilerine göre oluşturulan maksimum benzerlik analizi, AY549506.1 *Digamma interrupta*, AY549507.1 *Diphyllobothrium ditremum*, AY549510.1 *Ligula colymbi*, AY549511.1 *Ligula colymbi*, AY549512.1 *Ligula intestinalis*, AY549513.1 *Ligula intestinalis*, AY549516.1 *Ligula intestinalis*, AY549517.1 *Ligula intestinalis*, AY549520.1 *Ligula intestinalis* AF153910.1 *L.intestinalis* ile birlikte Pseudophyllidea taksonunda gruplandıklarını belirlemiştir. Ağaç dalları arasındaki fark ise, mevcut izolatlarımız ve AF153910.1 *Ligula intestinalis*'in diğer taksonlarla olan konumunu göstermiştir. Ayrıca, bu çalışmada izole edilen 6 *L.intestinalis* izolat ve AF153910.1 *Ligula intestinalis*'in ağacın aynı dal sırasında yer alması, bunların yakın ilişkisini göstermiştir. MK286932.1 numaralı izolat, 1 nükleotit farklılığı nedeni ile diğer 5 örnekten ayrılarak aynı ağaç kolu üzerinde ayrı bir dal oluşturmuştur.



Şekil 4.1 COI ve ITS gen bölge verileri desteğinde, Maximum Likelihood (ML) analiz yöntemi kullanılarak oluşturulan ağaç.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pleroserkoid evresi çoğunlukla cyprinid balık türlerinde parazit olarak bilinen *Ligula* cinsinin birkaç türü vardır (Dubinina, 1980). Bu türlerden biri olan *Ligula intestinalis* Anadolu'daki cyprinid balık türlerinde geniş dağılım göstermektedir (İnnal *et al.* 2007). Ülkemizde, *Ligula intestinalis* türü üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla anatomik-morfolojik temelli olup (İnnal *et al.* 2007), genetik belirteçler üzerinden tanımlama çalışmaları sınırlı kalmıştır (Logan *et al.* 2004). Bununla birlikte, organizmaların taksonomik konumlarının doğru belirlenmesi için son yıllarda ITS ve COI gibi genetik belirteçlerden sıklıkla yararlanılmaktadır (Li *et al.* 2000).

Bu çalışmada; *Alburnus escherichii*, *Chondrostoma nasus*, *Tinca tinca* ve *Squalius cephalus* olmak üzere 4 farklı cyprinid balık türünden izole edilen *Ligula intestinalis* örneklerinin COI gen dizisi çıkarılmıştır. Elde edilen genetik veriler, daha önce Kurupınar ve Öztürk (2009) ile Özbek ve Öztürk (2010) tarafından anatomik-morfolojik özelliklerine göre teşhisi yapılan *Ligula intestinalis* türünün taksonomik konumunu doğrulanmıştır. Li vd. (2000)'nin genetik verileri, *Ligula*'nın morfolojik olarak (Yang and Liao, 1997) *L. intestinalis* olarak tanımlandığı bir çalışmayı da desteklemiştir. Böylelikle, Li vd. (2000), morfolojik ayırım yeterli olmadığında, DNA sekansı kullanılarak yapılan moleküler karakterizasyonun, parazitik tenyaları tanımlamak için güçlü bir araç olabileceğini görüşünü bu çalışma sonuçları ile desteklemiştir.

Li vd. (2000) tarafından, 7 *Ligula* örneğinin COI geni (GenBank erişim numarası AF153910) için 393 bp'lik kesin belirgin nükleotidler, her örnekten doğrudan dizilenmiştir. İlginç bir şekilde, incelenen 7 *Ligula* örneği arasında COI geninin dizilerinde hiçbir nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir. Li vd. (2000), dizilerdeki homolojiyi şu nedenlere bağlamaktadır: Birincisi, DNA moleküllerinin amplifikasyon hacimleri küçük olduğu için homoloji görülmüş olabilir. İkincisi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu işlemini bir kaç tekrarladığı halde varyasyon görülmemesini, dizilerin gerçekten özgün olmasına bağlamaktadır. Üçüncüsü, mitokondriyal genomun mutasyon kalıpları görüşüne uygun olarak, birbirine yakın taksonların COI genlerinin dizi benzerliği göstermesine bağlı olabilir.

Yukarıdaki araştışıcıların verilerini destekler özellikle olarak, bu çalışmada tanımlanan 6 *L.intestinalis* izolatına ait gen dizilerinin tamamında tek bir desen ve güvenilir bant kaydedilmiştir. Bantların boyutu 480 bp olarak belirlenmiştir. Örneklere ait COI gen ürünlerinin hiçbirinde nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir. Sadece, L2-2 nolu örneğinin 225'inci C nükleotidin, diğeri tüm örneklere T nükleotiti olarak dizilendiği tespit edilmiştir. Böylece, mevcut araştırma sonuçları, Li vd. (2000)'nin COI gen dizilerinin kendi aralarında homoloji gösterme nedenlerini açıklayan hipotezini desteklemektedir.

Li vd. (2000), *Ligula intestinalis* izolatlarının filogenetik benzerlik göstererek, *Diphyllobothrium nihonkaiense* ve *Spirometra erinacei* ile birlikte Pseudophyllidea taksonunda gruplandıklarını ifade etmektedir. Bu araştırmada elde edilen filogenetik analizler de, 6 *L.intestinalis* izolatının, *Hymenolepis diminuta*, *Taenia crassiceps* ve AF153910 *Ligula intestinalis* ile birlikte Pseudophyllidea taksonunda gruplandıklarını desteklemiştir. Li vd. (2000), COI gen parçacığı için, hem maksimum olasılık hem de komşu birleştirme yöntemleri ile %95'in üzerinde özdeş ağaç topolojisi sağladığını belirtmektedir. Mevcut bu çalışmada da, 6 *L.intestinalis* izolatu, soy ağağının aynı dal sırasında yer alarak ve düğümlerdeki %100 lk önyükleme değeri göstererek, Li vd. (2000)'nin sonuçlarını güçlü bir şekilde desteklemiştir. Ayrıca Li vd. (2000) tarafından ifade edilen, moleküler verilerin *Ligula*'nın geleneksel sınıflandırma konumu ile uyum içinde olduğu görüşü, mevcut bu çalışma sonuçları tarafından da desteklenmiştir.

Ligula cinsi orijinalinde tek bir tür olan *L. intestinalis* olarak tanımlanmakla birlikte, daha sonra morfolojik karakterlere ve farklı konak hayvanlardaki olgularına dayanılarak az üç türden oluştuğu düşünülmektedir (Dubinina, 1980). Bununla birlikte, bu taksonomik birimler günümüzde hala tartışmalıdır. Bununla birlikte, Li vd. (2000), farklı konaklardan ve farklı coğrafik bölgelerden *Ligula* rnelerinin 28S rRNA'da veya COI genlerinde varyasyon saptamamıştır. Böylece Li vd. (2000), Qinghai-Tibet Platosundaki *Ligula* rnelerinin Avrupa'daki muadilleriyle aynı türe ait olduğunu ifade etmektedir. Aynı araştışıcılar (2000), bu kadar geniş coğrafik bölgelerde yayılış gösteren *L.intestinalis* poplasyonlarının, birbirlerine çok yakın genetik benzerliğe sahip olma ve bunu sürdürme mekanizmalarını şu şekilde açıklamaktadır: Düşük genetik

çeşitlilik, bu tür için türleşmenin yeni ortaya çıkmış olduğunu gösterebilir. İncelenen iki allelde sekans varyasyonunun olmaması türleşme sonrasındaki kısa bir süreyi yansıtabilir. Mutasyonların birikmesi için yeterli zaman olmadığı söylenebilir.

Düşük genetik çeşitlilik, parazit yaşamla da bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü son konak olan balıkçıl kuşların, göç yolları üzerinden uzun mesafelere bu paraziti nakledebileceği ifade edilmektedir (Wyatt ve Kennedy, 1989). Böylece, sık görülen genetik etkileşim, izole su kütlelerinin *Ligula* populasyonları arasındaki düşük genetik çeşitliliğin korunmasına da yardımcı olabilir.

Sonuç

Sonuç olarak, *Alburnus escherichii*, *Chondrostoma nasus*, *Tinca tinca* ve *Squalius cephalus* olmak üzere 4 farklı cyprinid balık türünden izole edilen *Ligula intestinalis* örneklerinin COI gen dizisi ilk kez bu çalışmayla tanımlanmıştır. Bu gen dizisinin bant boyutu 480 baz çifti (bp) olarak belirlenmiştir. Bir örnekteki bir C nükleotidi hariç, COI gen dizilerinde hiçbir nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir. Elde edilen genetik veriler, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre teşhisi yapılan *Ligula intestinalis* türünün taksonomik konumunu doğrulamıştır. *Ligula intestinalis*'in allopatrik populasyonlar arasındaki genetik farklılıklarının ortaya çıkarılmasına katkıda bulunulmuştur. Ayrıca, etanolde fikse edilen ve uzun süre etanolde korunan *L.intestinalis* genetik materyalinin hasara uğramadığını ve genetik çalışmalarda kullanılabilceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Akmirza, A. (2007). *Ligula intestinalis* L. plerocercoidlerinin acı balığın (*Rhodeus amarus* Bloch, 1782) büyümesi üzerine etkisi. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*. **(13)**: 155-160.
- Appleby, C. and Sterud, E. (1996). Parasites of white bream (*Blicca bjoerkna*), burbot (*Lota lota*) and ruffe (*Gymnocephalus cernua*) from the River Glomma, south-eastern Norway. *Bulletin Scand. Society Parasitology*. **6 (1)**: 18-24.
- Arme, C. and Owen, R. (1968). Occurrence and pathology of *Ligula intestinalis* infections British Fishes. *The Journal of Parasitology*. **54 (2)**: 272-280.
- Arslan, M.Ö., Yılmaz, M. and Taşçı, G.T. (2015). Infections of *Ligula intestinalis* on Freshwater Fish in Kars Plateau of North-Eastern Anatolia, Turkey. *Turkiye Parazitol Derg.* **(39)**: 218-21.
- Başaran, A. and Kelle, A. (1976). Devegeçidi Baraj Gölü'nde yaşayan bazı balık türlerinde *Ligula intestinalis* L. plerocercoidlerinin yayılma oranı ve etkileri. *Biyoloji Dergisi*. **(26)**: 45-56.
- Bauer, O.N. (1959). Ecology of the parasites of freshwater fish. Inter-relationships between the parasite and its habitat. *Izv. Gozud. Ozern.rechn. rybkhoz.* **(49)**: 5-206
- Bouزيد, W., Lek, S., Mace, M., Hassine, O.B., Etienne, R., Legal, L. and Loot, G. (2008a). Genetic diversity of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidea) based on analysis of inter-simple sequence repeat markers. *J Zool Syst Evol Res* **46(4)**: 289–296. doi: 10.1111/j.1439-0469.2008.00471.x
- Bouزيد, W., Stefka, J., Hypsa, V., Lek, S., Scholz, T., Legal, L., Kalthoum, O., Hassine, B. and Loot, G. (2008b). Geography and host specificity: two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphylobothriidae). *Int J Parasitol* **38(12)**: 1465–1479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.008>
- Burgu, A., Oğuz, T., Körting, W. and Güralp, N. (1988). İç Anadolu'nun bazı yörelerinde tatlısu balıklarının parazitleri. *Etlik Vet. Mikrob. Der.* **6 (3)**: 143-165.

- Brown, S.P., Loot, G., Teriokhin, A., Gue'gan, J.F. (2002). Host manipulation by *Ligula intestinalis*: A cause or consequence of parasite aggregation. *Int J Parasitol*, **32**: 817–824.
- Bykhovskaya-Pavlovskaya IE, 1962. Key to the Parasites of the Freshwater Fishes of the U.S.S.R. Transl. Birrow A. ve Cale, Z.S. 1964 Israel Prog. for Scientific Trans. Jerusalem, p. 919.
- Cantoray, R. and Özcan, A. (1975). Elazığ ve çevresindeki tatlı su balıklarında ligulose. *Fırat Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **2**: 298-301.
- Dechtiar, A.O. and MacLean, J.A. (1989) Parasites of Fishes From Algonquin Park Lakes. Ontario Fisheries Technical Report Series, No. 29.
- Demirtaş, M. and Altındağ, A. (2011). The Seasonal Infection Distribution of *Ligula intestinalis* Plerocercoid L., 1758 on Some Fishes (Cyprinidae) Living in Terkos Lake. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22 (3)**: 147 – 151
- Dörücü, M. and İspir, Ü. (2005). Keban Baraj Gölü'nden avlanabilen balık türlerinde iç paraziter hastalıkların incelenmesi. *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **17(2)**: 400-404.
- Dubinina, M.N. (1964). Cestodes of the family Ligulidae and their taxonomy. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, I: 173-186.
- Dubinina, M.N. (1980). Tapeworms (Cestoda, Ligulidae) of the fauna of the USSR. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Dehli, 320.
- Ergönül, M.B. and Altındağ, A. (2005). *Ligula intestinalis* pleurocercoidlerinin kadife balığını büyüme özelliklerine etkisi. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **29**: 1337-1341.
- Grabda-Kazubska, B., Baturo-Warszawska, B. and Pojmanska, T. (1987). Dynamics of parasite infestation of fish in Lakes Dgal Wielki And Warniak in connection with introduction of phytophagous species. *Acta Parasitologica Polonica*, **32**: 1-28.
- Hajirostamloo, M. (2008). The occurrence and parasite-host of *Ligula intestinalis* in Sattarkhan Lake (East Azerbaijan-Iran). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **7 (3)**: 221-225.
- Harris, M.J. and Wheeler, A. (1974). *Ligula intestinalis* of bleak *Alburnus alburnus* (L.) in the Tidal Thames. *Journal of Fish Biology*, **6**: 181-188.

- Hartley, P.H.T. (1947). The natural history of some British freshwater fishes. Proc. Zool. Scot. London, **11**: 129-206.
- İnnal, D. and Keskin, N. (2005). The infection of european chub (*Leuciscus cephalus* L. 1758) with *Ligula intestinalis* plerocercoids in Çamkoru Lake (Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **5 (2)**: 108-110.
- İnnal, D., Keskin, N. and Erk'akan, F. (2007). Distribution of *Ligula intestinalis* (L.) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **7**: 19-22.
- Kerr, T. (1948). The pituitary in normal and parasitised roach (*Leuciscus rutilus*) Quart. Jour. Micr. Sci. (**89**): 129-137.
- Kır, İ., Ayvaz, Y., Barlas, M. and Tekin Özan, S. (2004). Karacaören I Baraj Gölü'nde yaşayan sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758)'lardaki parazitlerin mevsimsel dağılımları ve etkileri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **28 (1)**: 45-49.
- Kır, İ. and Tekin-Özan, S. (2005). Occurrence of helminths in tench (*Tinca tinca*) of Kovada (Isparta) Lake, Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **25 (2)**: 75-81.
- Kırkağaç-Uzbilek, M. and Yavuzcan-Yıldız, H. (2002). A report on spontaneous diseases in the culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val. 1884), Turkey. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **26**: 407-410.
- Korkmaz, A.Ş. and Zencir, O. (2009). Annual dynamics of tapeworm, *Ligula intestinalis* parasitism in tench (*Tinca tinca*) from Beysehir Lake, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8 (9)**: 1790-1793.
- Kosheva, A.F. (1956). Influences of the parasites *Ligula intestinalis* and *Digramma interrupta* on their fish hosts. *Zool. Zh.* (**35**): 1629-1632.
- Kurupınar, E. and Öztürk, M.O. (2009). Mevsimsel değişime ve boy büyüklüğüne bağlı olarak *L. cephalus* L.'un (Örenler Baraj Gölü, Afyonkarahisar) helmint faunası üzerine bir araştırma. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **33 (3)**: 248-253.
- Laguer, C., Presswell, B., Dunckley, N. and Poulin, P. (2018). The invasive cestode parasite *Ligula* from salmonids and bullies on the South Island, New Zealand. *Parasitology Research*, **117**:151–156. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5684-7>
- Li, J., Liao, X. and Yang, H. (2000). Molecular Characterization of a Parasitic Tapeworm (*Ligula*) Based on DNA Sequences from Formalin-Fixed Specimens. *Biochemical Genetics*, **38 (9/10)**: 309-312.

- Li, J. and Liao, X. (2003). The taxonomic status of *Digramma* (Pseudophyllidea: Ligulidae) inferred from dna sequences. *J. Parasitol.* **89(4)**: 792-799.
- Logan, F.J., Horák, A., Štefka, J., Aydogdu, A. and Scholz, T. (2004). The phylogeny of diphylobothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. *Parasitol Res.* **94**: 10–15. DOI 10.1007/s00436-004-1164-y
- Logan, F.J., Horák, A., Štefka, J., Aydogdu, A. and Scholz, T. (2004). The phylogeny of diphylobothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. *Parasitol Res.* **94**: 10–15. DOI 10.1007/s00436-004-1164-y.
- Luo, H.Y., Nie, P., Yao, W.J., Wang, G.T. and Gao, Q. (2003). Is the genus *Digramma* synonymous to the genus *Ligula* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Parasitol Res.* **89**: 419–421. DOI: 10.1007/s00436-002-0802-5.
- Markevich, A.P. 1951. Parasitic fauna of fresh water fish of the Ukrainian S.S.R. Oldbourne press 121, fleet street, London, E.C. 4, 388 p.
- Molnar, K. and Szekely, C. (1995). Parasitological survey of some important fish of Lake Balaton. *Parasit. Hung.*, **28**: 63-82.
- Museth, J. (2005). Effects of *Ligula intestinalis* on habitat use, predation risk and catchability in European Minnows. *J. of Fish Biology*, **59 (4)**: 1070-1080.
- Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Griffiths, D., Kennedy, C.R. and Arme, C. (2002). Evidence for the coexistence of separate strains or species of *Ligula* in Lough Neagh, Northern Ireland. *Journal of Helminthology*, **76**: 171–174.
- Özbek, M. and Öztürk, O.M. (2010). Investigations on *Ligula intestinalis* plerocercoid L., 1758 infection of some fishes from Dam Lake Kunduzlar (Kirka, Eskişehir). *Türkiye Parazitol Derg.*, **34(2)**: 112-117
- Rostami, S., Salavati, R., Beech, R.N., Babaei, Z., Sharbatkhori, M., Baneshi, M.R., Hajialilo, E., Shad, H. and Harandi, M.F. (2013). Molecular and morphological characterization of the tapeworm *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766) in sheep from Iran. *Journal of Helminthology*, **89(2)**:1-8.
- Taylor, M. and Hoole, D. (1989). *Ligula intestinalis* L. (Cestoda) an ultrasuctural study of the cellular response of roach fry, *Rutilus rutilus* to an unusual intramuscular infection. *J. Fish Diseases*, **12**: 523-528.

- Tekin-Özan, S., Kır, İ., Ayvaz, Y. and Barlas, M. (2006). Beyşehir Gölü kadife balığı (*Tinca tinca* L., 1758)'nın parazitleri üzerine bir araştırma. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **30 (4)**: 333-338.
- Tekin-Özan, S. and Barlas, M. (2008). Concentrations of selected heavy metals in *Ligula intestinalis* L. 1758 plerocercoids (Cestoda) compared to it host's (*Tinca tinca* L.1758) organs from Beyşehir Lake. *Helminthologia*, **45 (2)**: 76-80.
- Wyatt, R.J. and Kennedy, C.R. (1989). Host-constrained epidemiology of the fish tapeworm *Ligula intestinalis* (L.). *Journal of Fish Biology*, **35 (2)**: 215-227.
- Yang, T.B. and Liao, X.H. (1997). The Identification of *Ligula intestinalis* and *Contracaecum rudolphii* parasitizing in the body cavity of *Gymnocypris praezwaliskii przewalskii*. *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni* **36**:127.

6.1 İnternet Kaynakları

Erişim Tarihi

İnt. Kay. 1. https://animaldiversity.org/accounts/Ligula_intestinalis/classification

17.12.2018

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif İSLAM
Doğum Yeri ve Tarihi : Keskin, 19.01.1991
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05422661627 / elifk_71@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Keskin Süper Lisesi, (2005-2008)
Lisans : Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Biyoloji
Bölümü, (2009-2013)

