

Determination of Genetic Diversity in *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) Population by mtDNA COI Gene Sequences

Sahin Toprak

Harran University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, Sanliurfa - 63100, Turkey
E-mail: stoprak@harran.edu.tr

Arif Parmaksiz (Corresponding author)

Harran University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, Sanliurfa - 63100, Turkey
E-mail: aprmksz@gmail.com

Abdullah Akar

Harran University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, Sanliurfa - 63100, Turkey
E-mail: biyolog.akar@gmail.com

This study was funded by Harran University Research Fund (Project No: 16039)

Abstract

In this study, genetic diversity of *Phlebotomus papatasi* population was detected based on mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI) gene sequences. Six haplotypes and six polymorphic sites were detected in totally 17 individuals. The average haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were calculated 0.893 and 0.0051 respectively. The result of Neutrality test as statistically was insignificant ($p>0.05$). The results obtained by this study performed firstly for *P. papatasi* species. Determined haplotypes for mtDNA COI gene region are new results for literature, in terms of genetic diversity of this species is an important data set.

Keywords: *Phlebotomus papatasi*, mtDNA COI, Leishmaniasis, Genetic Diversity.

Şanlıurfa'da Yaşayan *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) Populasyonunda Genetik Çeşitliliğin mtDNA COI Gen Dizileri Kullanılarak Belirlenmesi

Özet

Bu çalışmada, *Phlebotomus papatasi* populasyonunda mitokondriyal DNA sitokrom c oksidaz altünite I (mtDNA COI) gen bölgesinin dizi analizlerine dayalı genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Toplam 17 örnekte altı değişken bölge ve altı haplotip tespit edilmiştir. Ortalama haplotip (h) ve nükleotit çeşitliliği (π) sırasıyla 0.893 ve 0.0051 olarak hesaplanmıştır. Nötralite testi sonucunda tüm değerler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Yapılan bu çalışmadaki sonuçlar *P. papatasi* türü için ilk kez elde edilmiş verilerdir. mtDNA COI gen bölgesi için belirlenen haplotipler literatür açısından yeni sonuçlar olup, bu türün genetik çeşitliliği açısından önemli bir veri seti oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Phlebotomus papatasi*, mtDNA COI, Leishmaniasis, Genetik çeşitlilik

1. Giriş

Phlebotomus'lar yakarca, tatarcık, yakağan, gibi yöresel isimlerle bilinmekte olup, gün batımı ile gün doğumu arasında insanlardan kan emerler (Atakan ve ark., 2010). Ergin bireyleri ortalama 3 mm büyüklüğünde olan bu sineklerin bacakları uzun, vücutları tüylü olup, geceleri aktif, gün boyu karanlık ve nemli mikrohabitatlarda saklanırlar (Yaman ve ark. 2008). Erkek ve dişi tatarcıklar bitkilerdeki şekerlerle beslenirler. Sadece dişiler yumurtalarını geliştirebilmek için insan ve hayvanlardan kan emer. Başta leishmaniasis olmak üzere tatarcık humması gibi viral hastalıklara vektörlük eden *Phlebotomus*'lar Türkiye, İran, Irak, Afganistan, Pakistan, Tacikistan, Özbekistan, Azerbaycan, Suudi Arabistan, ve Ürdün'de dağılım göstermektedir (Yaghobi Ershadi, 2012). Türkiye'nin Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Batı Karadeniz bölgelerinde tatarcıkların 19 türü tespit edilmiştir (Daldal ve ark., 1989; Daldal ve ark., 1998; Volf ve ark., 2002; Yağcı ve ark., 1998). Bu türler içinde *P. papatasi* ve *P. sergenti* Şanlıurfa'da dominant türler olarak belirlenmiştir (Alptekin ve ark., 1999, Volf ve ark., 2002). Bu türlerin ergin dişileri Kutanoz Leishmaniasis (KL)'in kesin vektörleri oldukları tespit edilmiştir (Alptekin ve ark., 1999; Pazarbasi ve ark., 2006; Svobodová ve ark., 2009; Volf ve ark., 2002). Bu hastalığın önlenmesi için öncelikle bu vektörlerin kontrol altına alınması gereklidir. Leishmaniasis'in kontrolü açısından *Phlebotomus*'ların yayılışları ve popülasyonların yapısı büyük önem taşımaktadır. Şanlıurfa'da yaşayan bu cinse ait türlerinin yayılışları Toprak ve Özer (2005) tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada ise dominant türlerden biri olan *P. papatasi*'nin popülasyon yapısı mitochondrial DNA sitokrom c oksidaz alt ünite I (mtDNA COI) gen bölgesinin dizi analizlerine dayalı olarak belirlenmiştir. mtDNA COI protein kodlayan bir olup, amplifikasyonu ve sekansının kolay olmasının yanı sıra önemli bilgiler verdiği için popülasyon genetiği çalışmalarında büyük ölçüde kullanılan bir markördür (Near et al. 2003, Hu et al. 2008, Cardenas et al. 2009, Xu et al. 2011).

2. Materyal ve Metot

Çalışmamızda materyal olarak kullandığımız *P. papatasi* türüne ait bireyler Şanlıurfa ili merkezden Eylül-Ekim 2016 tarihinde evlerden ağız aspiratörüyle toplanmıştır. Yakalanan örnekler % 90'lik etil alkol içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine konulup DNA izolasyonu yapılana kadar +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılarak izole edilen DNA örneklerinden 2 µl alınarak % 0.8'lik agaroz jelde SYBR Green eklendikten sonra 120 Volt, 30 dakika elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir.

2.1. Hedef mtDNA Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

mtDNA COI gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer Folmer (1994) çalışmasından alınmış olup sekansları aşağıdaki gibidir.

LCO1490: 5'-TGTA AACGACGCGCCAGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HC02198: 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

PZR işlemi BIO-RAD T100™ Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR koşulları; 95°C'de 3 dakika ilk denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzama olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirilmiş, son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak sonlandırılmıştır. PZR ile çoğaltma (amplifikasyon) reaksiyonlarında kullanılan DNA miktarı, kimyasalların konsantrasyonları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları gradient PZR cihazında optimize edilmiştir. Bu bölgenin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı ise; toplamda 25 µl olacak şekilde 13.9 µl dH₂O, 1x PCR buffer, 2.5mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µl 0.5 mM primer (F+R), 0.1 µl Taq polimeraz ve 50 ng/µl template DNA şeklindedir.

PZR işleminden sonra oluşan ürünleri kontrol etmek amacıyla % 2 agaroz jel kullanılmıştır. SYBR Green eklenen agaroz jel, 0.5x TBE (Tris/Borik asit/EDTA Tamponu) solüsyonunun bulunduğu tank içerisine yerleştirilip 2 µl PZR ürünleri kuyulara yüklendikten sonra 100V elektrik akımında 30 dakika boyunca yürütülerek ultraviyole (UV) ışık veren görüntüleme cihazında görüntülenmiştir (Şekil 1). Elde edilen PZR ürünleri ticari bir firmaya gönderilerek 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) cihazında dizi analizi yaptırılmıştır.



Şekil 1. PZR Ürünlerinin Görüntüsü (M: Marker; NG: Negatif Kontrol, bç: Baz Çifti)

2.2. mtDNA COI Dizilerinin Analizi

Ticari firmadan tarafımıza gönderilen mtDNA dizileri ham verileri ChromasPro v 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd) programı kullanılarak değerlendirilip FASTA formatına dönüştürülmüştür. Elde edilen FASTA formatındaki diziler BioEdit software version 7.2.5 programı kullanılarak tüm bireylerin dizileri hizalanmıştır.

Populasyonlar için polimorfik bölge sayısı, haplotip sayısı, haplotip ve nükleotid çeşitliliği, Tajima D istatistikleri, DnaSP 5.10.01 (Rozas ve ark., 2003) programı kullanılarak belirlenmiştir. Haplotipler arasındaki filogenetik ilişki ise Network version 5.0 programı ile belirlenmiştir. Haplotipler arasındaki genetik ilişkileri göstermek amacıyla UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) yöntemine göre MEGA 7 programında gerçekleştirilmiş ve ağaç oluşturulmuştur (Kumar ve ark., 2016).

3. Araştırma Sonuçları

Şanlıurfa merkezinden alınan 17 *P. papatasi* örneğinde ortalama 650 bç'lik mtDNA COI bölgesi dizi analizi yapılmıştır. Bu bölge Gen Bankasındaki JQ769142.1 numaralı sekansla % 99 benzerlik göstermektedir. Çalıştığımız populasyonda bu gen bölgesi için 6 değişken bölge ve 6 haplotip tespit edilmiştir. Bu bölgeye ait nükleotit farklılıkları Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. mtDNA COI bölgesine ait nükleotit farklılıkları ve haplotipler

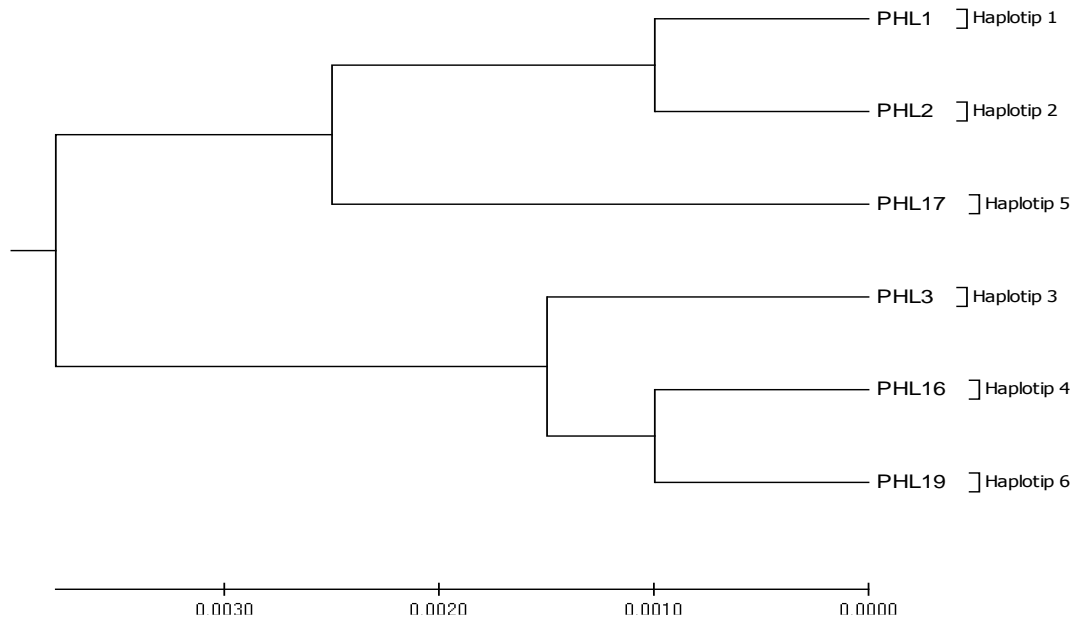
	1	2	4	4	4	4
	1	6	2	6	9	9
	4	1	9	5	5	8
Haplotip 1	G	A	G	T	G	G
Haplotip 2	.	G
Haplotip 3	A	.	A	.	A	A
Haplotip 4	.	.	A	.	A	A
Haplotip 5	A	.	.	.	A	.
Haplotip 6	.	.	A	C	A	A

Bu haplotiplerden Haplotip 1'in görülme oranı 0.375 iken diğer tüm haplotiplerin oranı 0.125 olarak tespit edilmiştir. Ortalama haplotip çeşitliliği (h) 0.893 ve ortalama nükleotid çeşitliliği (π) 0.0051, nötralite testlerinden Tajima's D değeri ise 0.51846 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. *P. papatasi* türüne ait mtDNA COI haplotiplerinin ağ modeli (Median-Joining Network)

Şekil 2'de analiz edilen 17 *P. papatasi* örneği için oluşturulan Median-Joining Network haplotip ağında, toplam 6 haplotip belirlenmiş olup, elde edilen görüntüde evrimsel bir bağı gösteren merkezi bir haplotip (H1) varlığını göstermektedir.



Şekil 3. Haplotiplerin mtDNA COI Bölgesi Dizilerine Dayalı Olarak Çizilen UPGMA dendrogramı

MEGA 7 programı kullanılarak elde edilen 6 haplotipin UPGMA dendrogramı Şekil 3'de görülmektedir. Median Joining Network haplotip ağında görülen haplotip ilişkisine benzer bir sonuç ortaya çıkmıştır.

4. Tartışma

Kutanöz Leishmaniasis (KL) dünya genelinde yaygın bir hastalık olup, İran, Suudi Arabistan, Afganistan, Cezayir, Brezilya, Peru, Suriye ve Türkiye’de görülmektedir (Atakan ve ark., 2010). Ülkemizde ise Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yaygın olup şark çibani olarak bilinen bu hastalığa ergin dişi tatarcıklar vektörlük etmektedir. Leishmaniasis halk sağlığı açısından ciddi bir hastalık olup önlenememesi için vektör tatarcıklarla savaş zorunludur (Yaman, 2008).

Leishmaniasis’in kontrolü açısından *Phlebotomus*’ların yayılışları, ekolojik durumları, vektörlük ve yaşam özellikleri gibi konularda yapılacak çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Özbel ve ark., 1995). Bu türlerin yönetilmesi ve mücadelesi için o türün genetik çeşitliliği ve populasyon yapısının da bilinmesi gerekmektedir. Çünkü genetik yapı çevre koşullarına dayanma kabiliyeti üzerinde etkilidir.

Çalışmamızda Leishmaniasis hastalığının çok görüldüğü bir yer olan Şanlıurfa’dan *P. papatasi* türü için genetik yapısının tespiti için mtDNA COI bölgesine ait dizi analizi yapılmıştır. Bu bölge için 6 değişken bölge ve 6 haplotip tespit edilmiştir. Ortalama haplotip çeşitliliği 0.893 ve ortalama nükleotid çeşitliliği 0.0051, Tajima’s D değeri ise 0.51846 olarak hesaplanmıştır. Benzer bir çalışma Ghavami (2017) tarafından İran’da yapılmış olup *P. papatasi* türüne ait 18 birey kullanılmış ve mtDNA cyt-b gen bölgesi sekanlanarak genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Ortalama haplotip çeşitliliği (h) 0.893 ve ortalama nükleotid çeşitliliği (π) 0.0051 olarak hesaplanmıştır. Nötralite testlerinden Tajima’s D değeri ise (0.51846) pozitif değer almış ve istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır ($p>0.05$). Ghavami (2017) çalışmasında 5 haplotip ve 6 değişken bölge bulunmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızla uyum göstermektedir. Her iki çalışmada da birey sayısı az olmasına rağmen haplotip sayısı fazladır. Bu çalışmada Medyan birleştirme ağı (Median joining network) analizinde, H1 haplotipinin ağı merkezinde ve dominant olduğunu ayrıca tüm haplotiplerin H1 haplotipinden oluştuğunu görmekteyiz (Şekil 2).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatür açısından yeni sonuçlar olup, Şanlıurfa’da yaşayan *P. papatasi* türünün genetik çeşitliliği açısından önemli bir veri seti oluşturmuştur.

Kaynaklar

- Atakan E, Akbaba M, Sütuluk Z, Alptekin D, Demirhindi H, Kis Uludağ S (2010). Hocalı ve Turunçlu (Adana) Köylerinde *Phlebotomus* (Diptera; Psychodidae; Phlebotomine) Türlerinin Populasyon Yoğunluğu ve Kutanöz Leishmaniasis ile İlişkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 34 (2): 106 – 111.
- Alptekin D, Kasap M, Luleyap U, Kasap H, Aksoy S, Wilson ML (1999). Sandflies (Diptera, Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa, Turkey. *J Med Entomol* 36: 277-281.
- Cardenas L, Silva A, Magoulas A, Cabezas J, Poulin E, Ojeda F (2009). Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the Southeastern Pacific Ocean. *Fish Res* 100: 109–115.
- Daldal N, Üner A, Yaşarol Ş, Karacasu F, Yurdagül C (1989). Ege ve Akdeniz bölgesinde görülen *Phlebotomus* türleri. *T Parazitoloji Dergisi* 8: 71-84.
- Daldal N, Özbel Y, Babaoğlu A, Turgay N, Aklan MZ, Babaoğlu N (1998). *Phlebotomus major syriacus*: a possible vector of visceral leishmaniasis in western Black sea region of Turkey. *J Egypt Soc Parasitol.* 28: 271-275.
- Folmer M, Black W, Hoeh R, Lutz R, Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biolo.*
- Hu J, Zhang JI, Nardi F, Zhang RJ (2008). Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), from China and Southeast Asia *Genetica* 134: 319–324.

- Near TJ, Pesavento J, Cheng C (2003). Mitochondrial DNA, morphology, and phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae). *Mol Phylogenet Evol* 28: 87–98.
- Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA (1995). Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol*. 89: 89-93.
- Pazarbasi A, Alptekin D, Luleyap HU, Kasap M, Kasap H (2006). Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of natural leishmania infections in phlebotomine sand flies from southeastern Turkey. *J Med Entomol* 43 (2): 248-51.
- Svobodová M, Alten B, Zidková L, Dvorač V, Hlavacková J, Mysková J, Seblová V, Kasap OE, Belen A, Votýpka J, Volf P (2009). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 39 (2): 251-6.
- Volf P, Özbel Y, Akkafa F, Svobodova M, Votypka J, Chang KP (2002). Sandflies (Diptera: Phlebotominae) in Şanlıurfa, Turkey: relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol* 39: 12-15.
- Yaghobi Ershadi MR (2012). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their role on *Leishmania* transmission. *J Arthropod-Borne Dis* 6 (1): 1-17.
- Yağcı Ş, Dinçer Ş, Eren H (1998). Ankara yöresi *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) türleri. *T Parazitoloj Dergisi* 22: 53-56. 21.
- Yaman M, Dik B (1999). Konya Yöresi Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) Türleri. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Yaman M (2008). Tatarcıklarla Mücadele ve Bu Alandaki Son Gelişmeler. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 32 (3): 280-287.
- Yaman M. Control of phlebotomine sandflies and the latest development in this field (2008). *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 32 (3): 280-7.
- Xu ZH, Chen JL, Cheng DF, Liu Y, Eric F (2011). Genetic variation among the geographic population of the Grain Aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequence. *Agr Sci China* 10: 1041–1048.