



Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyufbed>



Araştırma Makalesi

Van Gölü Kıyı Kumlarından İzole Edilen Spathidiid Siliyatlar (Ciliophora, Spathidiida) Üzerinde Morfolojik ve Moleküler Filogenetik Araştırmalar

N. Fırat DİCLE¹, İsmail YILDIZ^{*2}

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 65080, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 65080, Van, Türkiye

N. Fırat DİCLE, ORCID No: 0000-0002-2864-8461, İsmail YILDIZ, ORCID No: 0000-0001-9986-0358

*Sorumlu yazar e-posta: iyildiz@yyu.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 20.01.2023

Kabul: 25.02.2023

Online Ağustos 2023

DOI:10.53433/yyufbed.1239915

Anahtar Kelimeler

18S rDNA gen dizisi,
Filogeni,
Morfoloji,
Spathidium sp.
Van Gölü

Öz: Bu çalışmada Van Gölü kıyı kumlarından izole edilen bir *Spathidium* türünün morfolojik ve 18S rDNA gen dizisine dayalı filogenetik özellikleri araştırıldı. Kültürlerde farklı morfoloji sergileyen üç siliyat popülasyonu gözlemlendi. Bu popülasyonların 18S rDNA gen bölgesine ait nükleotid dizilerinin benzer olduğu görüldü ve bunların aynı türün farklı gelişim evreleri olduğuna karar verildi. 18S rDNA gen bölgesine ait nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizlerde bu çalışmada izole edilen *Spathidium* sp.'nin hemcinslerinden ziyade *Lagnophrya acuminata*, *Enchelys gasterosterus* ve *Balantidion pellucidum* ile birlikte kümelendikleri görüldü. Spathidiid siliyatların morfolojik sınıflandırma sistemi ile moleküler filogenisi arasında çelişkiler mevcut olup, *Spathidium* cinsinin parafiletik bir takson olduğu görülmektedir. Bununla birlikte tür zengini *Spathidium* cinsinin pek çok türü ile ilgili gen dizisinin bilinmemesi bu taksonun moleküler filogenetik durumunun açıklığa kavuşturulmasını sınırlamakta olup, farklı habitatlardan izole edilecek ayrıntılı morfolojik veriler ile birlikte farklı gen bölgelerinin de kullanılacağı filogenetik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Morphological and Molecular Investigations on Spathidiid Ciliates (Ciliophora, Spathidiida) Isolated from Coastal Sands of Lake Van

Article Info

Received: 20.01.2023

Accepted: 25.02.2023

Online August 2023

DOI:10.53433/yyufbed.1239915

Keywords

18S rDNA gene sequence,
Lake Van,
Morphology,
Phylogeny,
Spathidium sp.

Abstract: In this study, we investigated the morphological characteristics and phylogenetic position based on the 18S rDNA gene sequence of the *Spathidium* species isolated from the coastal sands of Lake Van. Three populations of ciliates were observed, showing different morphology in cultures. Our results indicate that the nucleotide sequences of the 18S rDNA gene region of these populations were similar and they were different developmental stages of the same species. Phylogenetic analyses based on the nucleotide sequences of the 18S rDNA gene region showed that *Spathidium* sp. isolated in this study clustered together with *Lagnophrya acuminata*, *Enchelys gasterosterus*, and *Balantidion pellucidum* rather than their congeners. There are contradictions between the morphological classification system and molecular phylogeny of Spathidiid ciliates, and it is seen that the genus *Spathidium* is a paraphyletic taxon. However, the lack of nucleotide sequence data for many species of the species-rich genus *Spathidium* limits the elucidation of the molecular phylogenetic status of this taxon. Phylogenetic analyzes using different gene regions with the support of detailed morphological data to be isolated from different habitats will clarify this problem.

Bu çalışma Doç. Dr. İsmail YILDIZ'ın danışmanlığında tamamlanan N. Fırat DİCLE'nin yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

1. Giriş

Spathidiid siliyatlar, dünyanın her tarafında karasal ve yarı karasal ortamlarda yaşayan avcı siliyatlar olup Ciliophora şubesi, Litostomatea sınıfı, Spathidiida takımı içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (Foissner & Xu, 2007; Jang ve ark., 2017). Günümüze kadar 4 familya (Spathidiidae, Protospathidiidae, Arcuospathidiidae ve Apertospathidiidae) 20 kadar cins içerisinde morfolojik olarak tanımlanmış 250'den fazla tür ile temsil edilmekte olup bunların büyük çoğunluğu *Spathidium* cinsi içerisinde yer almaktadır (Foissner & Xu, 2007; Yıldız, 2018). *Spathidium* cinsi ilk kez 1841 yılında Dujardin tarafından tesis edilmiş spatula biçimli ve holotrich siliyatürlü (bütün vücut yüzeyi somatik siller ile örtülü) siliyatlar olarak tanımlanmıştır. Diğer spathidiid gruplarında olduğu gibi bu cinsin üyeleri de uzun yıllar hücre biçimi ve büyüklüğü, nüklear organizasyon ve özellikle oral morfoloji özelliklerine göre birbirlerinden ayırt edilmişlerdir.

Son yıllarda morfolojik çalışmalar ile paralel olarak yürütülen moleküler filogenetik çalışmalar Spathidiida takımının morfolojik sınıflandırma modellerinde bazı uyumsuzlukların bulunduğuna işaret etmektedir (Jang ve ark., 2015; Rajter & Vd'acný, 2016; Jang ve ark., 2017). Morfolojik sınıflandırma modellerine göre yakın ilişkili spathidiid siliyatların moleküler filogenetik ağaçlarda birlikte küme oluşturmadıkları ya da morfolojik olarak birbirinden farklı siliyatların moleküler filogenetik ağaçlarda birlikte kümelenedikleri gösterilmiştir (Vd'acný & Foissner, 2013; Vd'acný ve ark., 2014; Jang ve ark., 2015 ve 2017; Rajter & Vd'acný, 2016; Yıldız, 2018). Daha genel anlamda Spathidiida takımının sınıflandırmasında en büyük sorunlardan biri, kalabalık spathidiid cinslerinin (*Spathidium* Dujardin 1841; *Epispathidium* Foissner, 1984; *Arcuospathidium* Foissner, 1984) moleküler filogenetik çalışmalarda polifiletik olarak görülmesidir (Vd'acný ve ark., 2011 ve 2014; Vd'acný & Foissner, 2012 ve 2013; Rajter & Vd'acný, 2016).

Gerçekleştirilen bu çalışmada Van Gölü kıyı kumlarından izole edilen spathidiid siliyatlar canlı ve gümüş impregnasyon yöntemleri kullanılarak morfolojik ve morfometrik olarak incelendi, 18S rDNA gen bölgesinin karşılaştırılmasına dayalı filogenetik yöntemler kullanılarak moleküler filogenetik pozisyonları ortaya çıkarıldı. Elde edilen morfolojik ve moleküler verilerin benzerlik ve farklılıkları literatür bilgisi ile karşılaştırıldı.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Siliyatların toplanması, kültürlerin hazırlanması ve morfolojik yöntemler

Bu çalışmanın materyalini Van Gölü kıyı kumlarında yaşayan spathidiid siliyatlar oluşturmuştur. Kıyı kumu örnekleri Mart 2019-Haziran 2022 tarihleri arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi yerleşkesi içerisinde göl suyu tarafından nemlendirilen alanlardan bitkisel döküntüler ile birlikte kompozit olarak toplandı. Toplanan örnekler laboratuvarında gölgede bir ay kadar kurutulduktan sonra kilitli poşetler içinde serin ve karanlık ortamda muhafaza edildi. Kurutulmuş kum örnekleri Petri kabına konulup saf su ile doyurulduktan sonra içerisine bakteriyel gelişmeyi uyararak için karbonhidrat kaynağı olarak bir miktar irmik ilave edilerek Petri kültürleri hazırlandı (Foissner & Xu, 2007; Vd'acný & Foissner, 2012) 5-7 gün oda sıcaklığında direkt güneş ışığı almayacak ortamda inkübasyona bırakıldı.

Bu sürenin sonunda kültür kaplarından alınan 2-5 ml sıvı saat camına alınarak spathidiid siliyatlar stereo-mikroskop altında (10X-80X büyütme) gözlemlendi, morfolojik özellikleri ve yüzme davranışları kayıt altına alındı. Stereo-mikroskop altında kılcal cam pipetler ile toplanan siliyatlar daha yüksek büyütme (100X-100X büyütme) faz-kontrast ve diferansiyel interferens-kontrast mikroskoplarda incelendi (Foissner, 1991; Foissner ve ark., 1999; Foissner, 2014), görüntüleri kaydedildi ve çeşitli morfolojik karakterlerine ilişkin ölçümler alındı.

Nüklear organizasyon, oral ve somatik siliyatür gibi önemli taksonomik özelliklerin ortaya çıkarılması için kültürlerden izole edilen siliyatlara gümüş karbonat ve protargol boyama teknikleri uygulandı (Foissner, 1991; Foissner ve ark., 1999; Vd'acný & Foissner, 2012; Foissner, 2014). Boyanmış hücreler yüksek büyütme (400X-1000X) mikroskoplar altında incelendi, çeşitli morfolojik karakterlerine ilişkin ölçüm ve sayımlar yapıldı ve görüntüler kaydedildi. Canlı ve boyanmış örneklerin sayım ve ölçümlerinden elde edilen sayısal veriler Minitab 18 paket istatistik programında analiz edilerek tanımlayıcı istatistikler çizelge şeklinde özetlendi (Özdamar, 1999a ve 1999b).

2.2. Moleküler ve filogenetik yöntemler

Morfolojik olarak karakterizasyonu yapılmış 1-2 canlı hücre stereo-mikroskop altında kılcal pipet ile saat camından toplandıktan sonra muhtemel kontaminasyonlardan arındırmak için 4 kez saf su ile yıkandıktan sonra mümkün olan en az hacimdeki su ile (0.5-1 µL) birlikte 200 µL'lik tüplere aktarılıp DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -65 °C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi. Gen dizilerinin kalitesi ve güvenilirliği için her örnekten en az 5 tüp örnek alınarak muhafaza edildi. Genomik DNA'nın daha kolay elde edilmesi için hücre pelikülünü parçalamak amacıyla dondurucuda saklanan örnekler oda sıcaklığında 10 dk çözüldükten sonra 15 dk boyunca tekrar donduruldu. Bu dondurup çözme işlemi 10 kez tekrarlandıktan sonra genomik DNA kimyasal olarak ekstrakte edildi. DNA kimyasal olarak RedExtrakt-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ile izole edildi. İzolasyon işlemi üretici firmanın belirtmiş olduğu protokoldeki miktarlar 1/10 oranında kullanılarak 200 µL'lik tüp içerisinde gerçekleştirildi (Gong ve ark., 2007; Shazib ve ark., 2016; Yıldız, 2018 ve 2021). 18S rDNA gen bölgeleri EukA (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AG-3') ve EukB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') evrensel primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile gerçekleştirildi. PZR koşulları, 1 döngü 2 dakika 94 °C'de başlangıç denatürasyonu; 40 döngü 45 saniye 95 °C'de denatürasyon 1 dakika 60 °C'de primer bağlanması, 3 dakika 72 °C'de uzama; 1 döngü 10 dakika 72 °C'de son uzama olarak ayarlandı. PZR ürünlerinin doğruluğu, kalitesi ve miktarı DNA belirteci (marker) eşliğinde jel elektroforezinde kontrol edildi. Yeterli miktarda ve doğrulukta DNA elde edilen PZR ürünlerinden her bir spathidiid örneği için 2 PZR ürünü seçilerek dizilendi. Dizileme işlemi için PZR primerleri (EukA, EukB) ile bir iç primer (SR7R=5'-AGT TAA AAA GCT CGT AGT GT-3') kullanıldı. Her bir siliyat popülasyonu için 2 PZR ürünü dizilendi. PZR ürünlerinin saflaştırma ve dizileme işlemi BM laboratuvar Sistemleri'nde (Ankara, Türkiye) gerçekleştirildi.

ABI formatında elde edilen diziler CodonCode Aligner ver. 9.0.1 (Centerville, MA, USA) programında kromatogramlar kontrol edildi, iyi kalitede okunmuş bölgeler hizalanarak konsensüs dizileri elde edildi.

Bu çalışmada elde edilen gen dizisi ile GenBank'tan elde edilen siliyatların gen dizileri (GenBank'tan elde edilen dizilerin assesion numaraları Şekil 7'de gösterilmiştir) Mega7 programında Clustal W implement algoritması kullanılarak hizalandı (Tamura ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2016). Anormal hizalanmış bölgeler gblocks v. 091 programı kullanılarak uzaklaştırıldı (Talavera & Castresana, 2007). Hizalanmış gen dizileri için en uygun baz değişim modeli JModeltest kullanılarak GTR+G+I olarak belirlendi (Posada, 2008; Darriba ve ark., 2012). Bayesian çıkarsaması (BI) ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda bu baz değişim modeli kullanıldı. Bayesian çıkarsaması 3.000.000 jenerasyon ve her 100 jenerasyonda 1 örnekleme yapılacak şekilde dizayn edildi (Ayres ve ark., 2012; Ronquist ve ark., 2012). Elde edilen filogenetik ağacın ilk ve son %25'lik kısmı yakılarak kalan ağaçlardan konsensüs ağacı oluşturuldu. Maksimum olabilirlik analizi (ML) hizalanmış gen dizilerinden IQ-Tree v.1.6.3 programı kullanılarak yapıldı (Nguyen ve ark., 2015; Hoang ve ark., 2018). ML analizi için en uygun model IQ-Tree programı tarafından seçilen GTR+F+I+G4 modeli ile 1.000 bootstrap olarak yapıldı. Her iki algoritma ile elde edilen filogenetik ağaçlar (BI ve ML) Figtree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) programı ile incelendikten sonra tek bir ağaç (ML ağacı) üzerinde nod değerleri ile birlikte birleştirildi.

3. Bulgular

3.1. Morfolojik bulgular

Yapılan morfolojik incelemelerde, kültürlerde birbiri ardınca ortaya çıkan üç farklı Spathidiid siliyat popülasyonu (popülasyon 1-3) gözlemlendi. Bu popülasyonların hücre büyüklüğü, biçimi, nükleer organizasyon bakımından birbirlerinden bariz bir şekilde farklı oldukları belirlendi ve her popülasyonun morfolojik ve morfometrik karakterleri aşağıda verilmiştir.

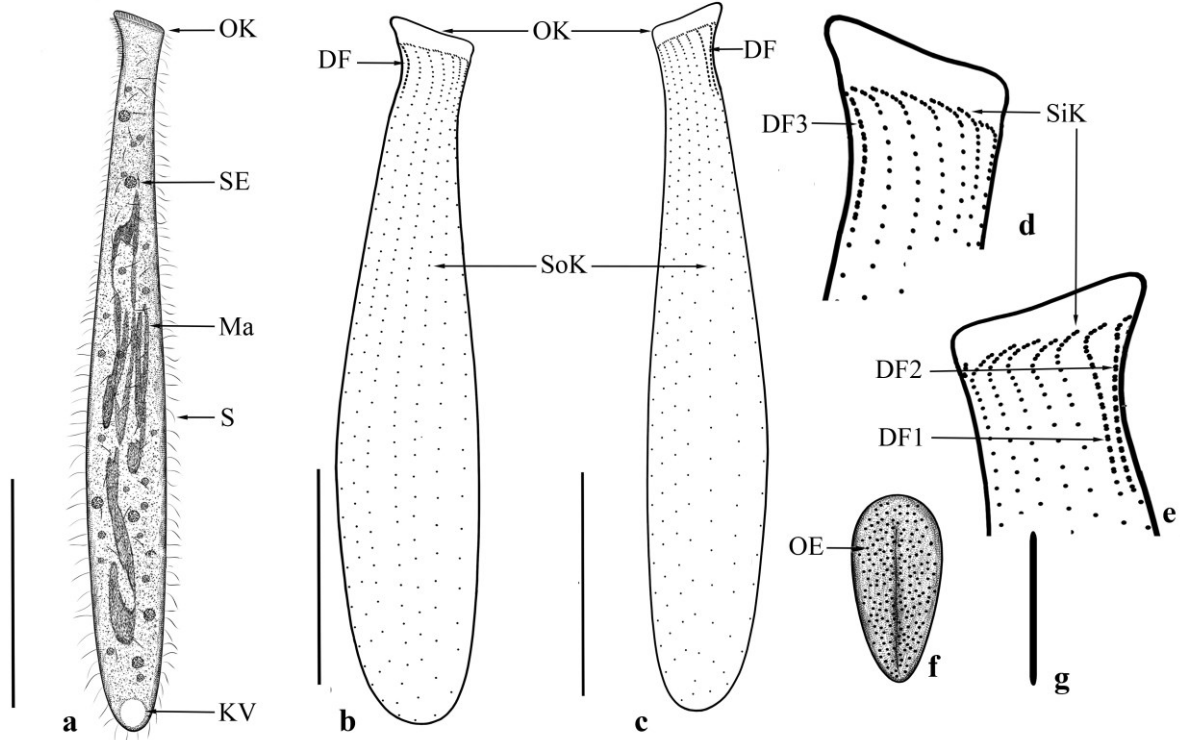
3.1.1. *Spathidium* sp. popülasyon 1

Petri kültürlerinde ilk çoğalan spathidiid siliyat popülasyonu olup kültürün 5-7. günleri arasında gözlemlendi. Hücre şekli uzamış vazo biçimlidir (Şekil 1a, 1d, 2a). Esnek pelikül yapısına sahip olan hücreler ileri derecede kıvrılabilme yeteneğine sahiptir (Şekil 1b, 1c). Lateral olarak 2-3:1 oranında yassılaştırmıştır. Oral kabartı 5-6 μm yüksekliğinde ve 20-25 μm uzunluğunda olup ventrale doğru yaklaşık 45° açı yapacak biçimde eğiktir (Şekil 1a-1c, 2a). Canlı hücre uzunluğu 172 μm (160-198 μm), hücre genişliği en dar bölge olan oral apareyin posteriyöründe 15 μm (14-20 μm); en geniş bölge olan posteriyör yarımında 25 μm (20-31 μm) olarak ölçüldü (Çizelge 1). Protargol impregnasyonu uygulanmış örneklerde hücreler fiksasyon sürecinde bir miktar çektiklerinden dolayı daha küçük olarak ölçüldü. Sitoplazma renksiz ve yoğun granüllüdür. (Şekil 1a-1c, 2a). Posteriyörde, terminal olarak konumlanmış veziküler yapıda tek kontraktıl vakuole sahiptir (Şekil 1a, 2a). Ekstruzomlar 7-8 μm uzunluğunda, 1 μm kalınlığında, çubuk biçimli olup (Şekil 2g) yoğun olarak oral kabartı içerisinde, seyrek olarak da sitoplazmada dağılık olarak bulunurlar (Şekil 1d, 1e, 2a). Makronükleus 4-7 μm genişliğinde tek veya çok parçalı (4-14) uzun kıvrılmış şerit biçiminde olup hücre içerisinde geniş (43-86 μm) yer kaplar (Şekil 1d, 2a). Çapı 2 μm kadar olan küresel biçimli 1-2 mikronükleusa sahiptir.



Şekil 1. *Spathidium* sp. popülasyon 1'in fotomikrografları. a-c, canlı; d-f, gümüş impregnasyonu. DF: dorsal fırça; KV: kontraktıl vakuol; Ma: makronükleus; OE: oral ekstruzom; OK: oral kabartı; E: somatik ekstruzom. Barlar 100 μm 'dir.

Somatik siller 8-10 μm uzunluğunda olup meridyonel olarak düzenlenmiş 14-16 kineti (sil sırası) oluştururlar (Şekil 2b, 2c; Çizelge 1). Monokinetal olarak organize olmuş kinetilerin anteriyör uçlarındaki kinetozomlar (sil kaide cisimcikleri) sık olarak düzenlenmişken posteriyöre doğru seyrekleşir, posteriyör kutup sil taşımaz. Hücrenin dorsalinde yer alan somatik sillerin 3 tanesinin anteriyör uçları dikinetid şeklinde farklılaşarak dorsal fırçayı oluşturur (Şekil 1f, 2b-e). Dorsal fırça dikinetidleri somatik sillerden farklı olarak kısa (1.5-2.0 μm) kıl benzeri yapılar taşır. Her bir dorsal fırçanın (D1-D3) uzunlukları Çizelge 1'de verilmiştir. Oral siliyatür somatik kinetilerin anteriyör uçlarının farklılaşmasından meydana gelmiş olup, oral kabartının kaidelerini çevreleyen kinetofragmentlerden oluşan sirkamoral kineti şeklindedir (Şekil 2d, 2e). Sirkamoral kinetiği oluşturan kinetozomlardan orijinlenen siller somatik sillerden hafif derecede daha uzun olup 12-13 μm olarak ölçüldü.

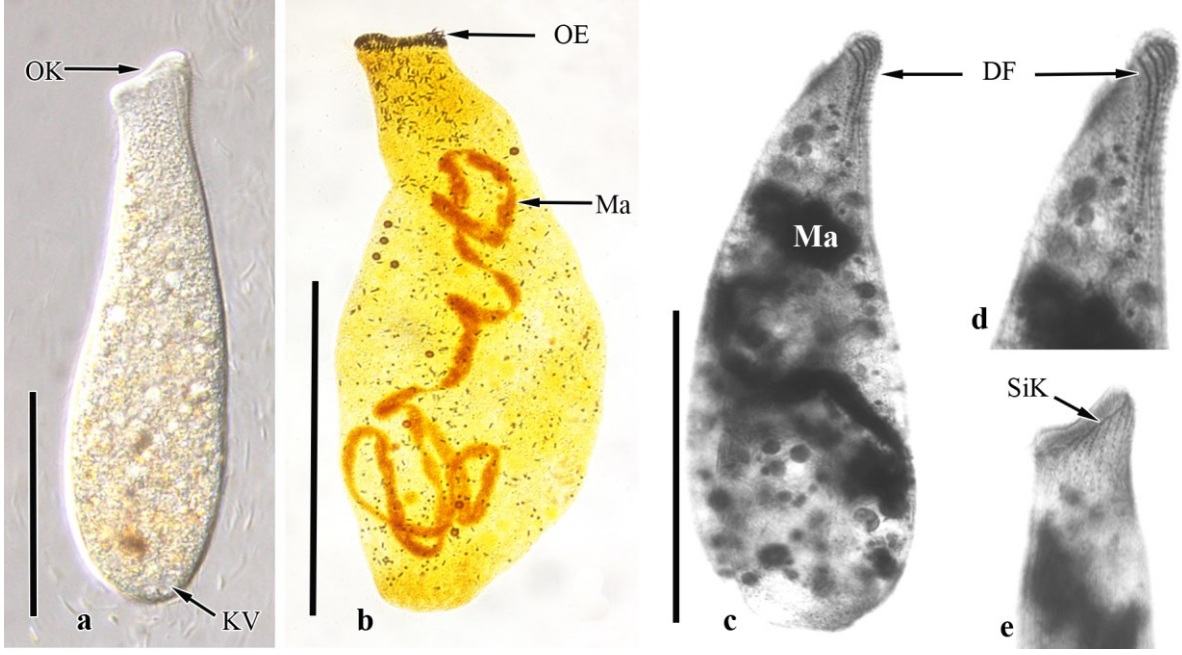


Şekil 2. *Spathidium* sp. popülasyon 1'nin genel morfoloji ve infrasiliyatür diyagramları. a: canlı hücre, b, c: sağ ve sol lateral siliyatür diyagramı; d, e: sağ ve sol oral siliyatür diyagramı; f: oral kabartının üst görünüm diyagramı; g: oral ve somatik ekstruzom diyagramı. BV: besin vakuolu, DF: dorsal fırça; DF1-3, dorsal fırça 1-3; KV: kontraktıl vakuol; Ma: makrotüküs; OE: oral ekstruzomlar; OK: oral kabartı; S: sil; SE: sitoplazmik ekstruzom; SiK: sirkamoral kineti; SoK: somatik kineti. Barlar 50 µm'dir.

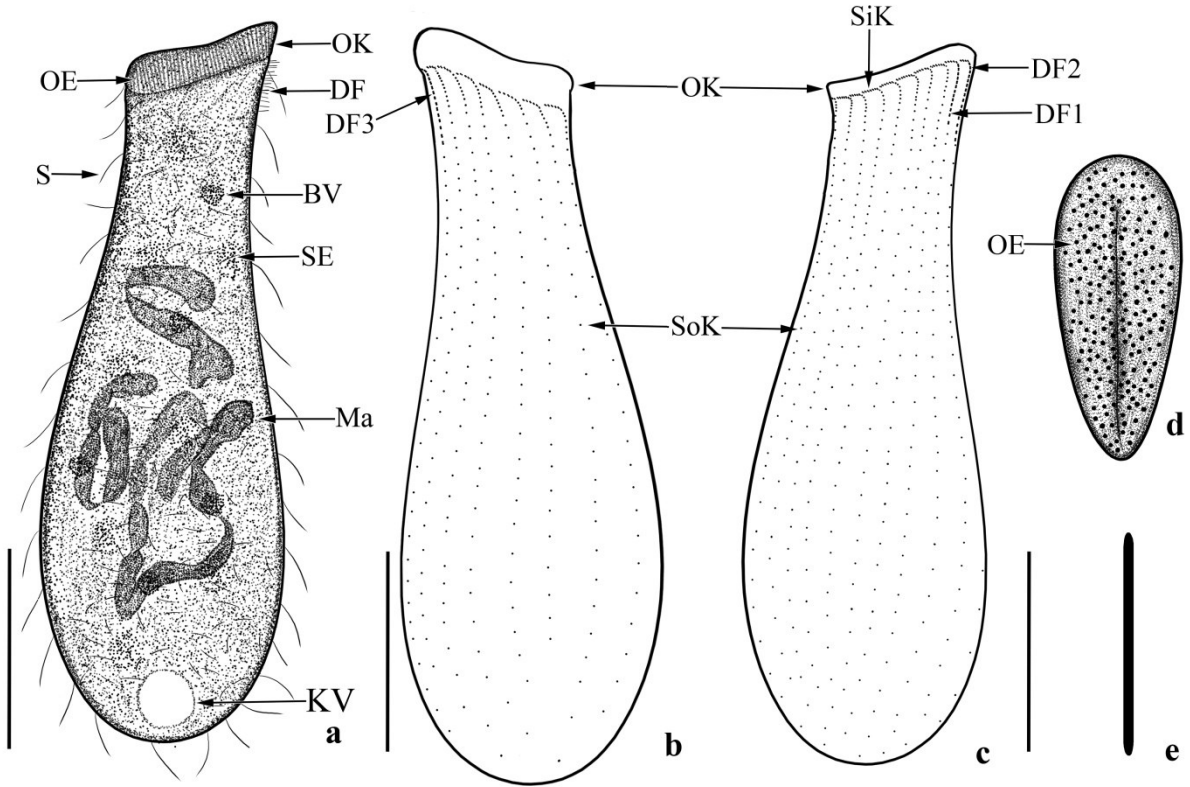
3.1.2. *Spathidium* sp. popülasyon 2

Petri kültürlerinde popülasyon 1'den sonra kültürün 7-10. günleri arasında gözlemlendi. Hücre şekli genişçe vazo biçimlidir (Şekil 3a-c, 4a-c). Hücre pelikülü hafif derecede esnek olmakla birlikte popülasyon 1 hücreleri gibi ileri derecede kıvrılmalar oluşmaz. Lateral olarak 2:1 oranında yassılaştırmıştır. Oral kabartı yüksekliği 4-8 µm, genişliği ise 22-27 µm olarak ölçülmüş olup ventrale doğru 20°-30° açı yapacak şekilde eğiktir (Şekil 3a, 4a-c). Canlı hücre uzunluğu 147 µm (140-160 µm), hücre genişliği ise en dar bölge olan oral aparatın posteriyöründe 20 µm (17-27 µm), en geniş bölge olan posteriyör yarımda 31 µm (27-36 µm) olarak ölçüldü. Sitoplazmik görünüm, besin vakuolleri ve kontraktıl vakuol önceki popülasyona benzerdir. Ekstruzomların büyüklüğü 9-10 µm uzunluğunda, 1 µm kalınlığında ve hücre içindeki dağılımı popülasyon 1'deki ile benzerdir. Nükleer organizasyon popülasyon 1 ile benzer olup ölçüm sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

Somatik siller 7-10 µm uzunluğunda olup 20 (16-24) kineti oluşturur. Somatik ve oral siliyatür genel organizasyon bakımından önceki popülasyona benzerdir. Dorsal fırça uzunlukları ve kinetozom çifti sayıları Çizelge 1'de verilmiştir.



Şekil 3. *Spathidium* sp. popülasyon 2'nin fotomikrografları a, canlı; b-e, gümüş impregnasyonu. DF: dorsal fırça; KV: kontraktıl vakuol; Ma: makronükleus; OE: oral ekstruzomlar; OK: oral kabartı; SiK: sirkamoral kineti. Barlar 60 µm'dir.



Şekil 4. *Spathidium* sp. popülasyon 2'nin genel morfoloji ve infrasiliyatür diyagramları. a: canlı hücre, b, c: sağ ve sol lateral siliyatür diyagramı; d: oral kabartının üstten görünümü; e: ekstruzom. BV: besin vakuölü; DF: dorsal fırça; DF1-3: dorsal fırça 1-3; KV: kontraktıl vakuol; Ma: makronükleus; OE: oral ekstruzom; OK: oral kabartı; S: sil; SE: sitoplazmik ekstruzom; SiK: sirkamoral kineti; SoK: somatik kinetozom. Barlar 50 µm'dir.

Çizelge 1. *Spathidium* sp. 1-3 popülasyonlarının morfometrik karakterizasyonu

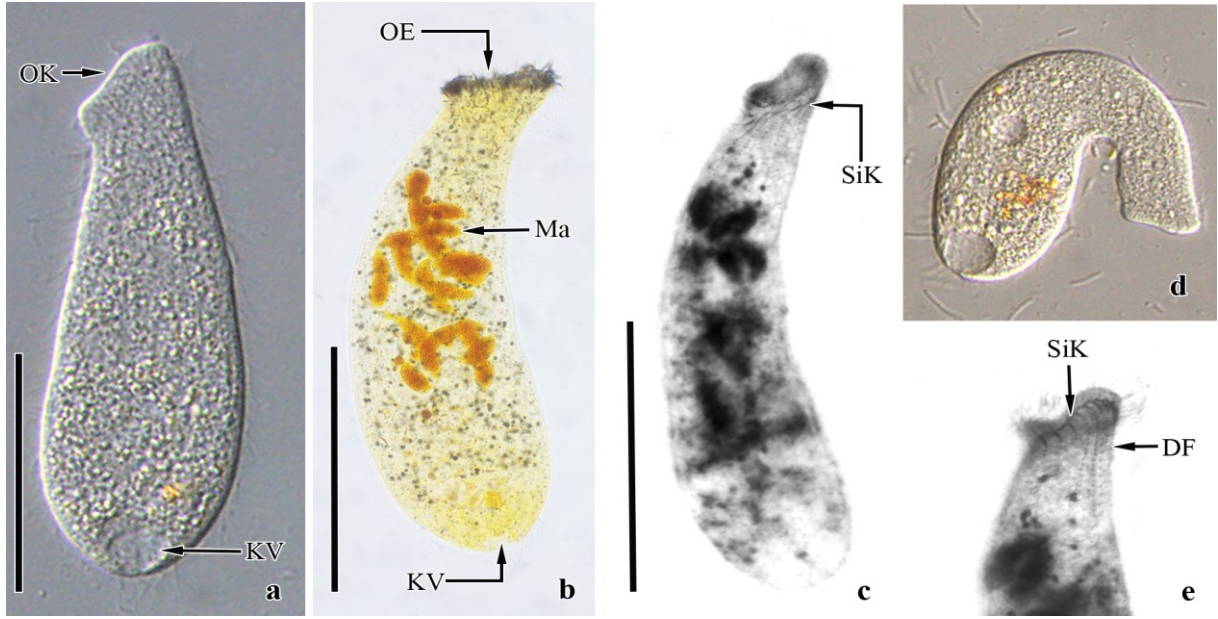
Karakterler	P	\bar{X}	Min	Max	SS	SH	VK	N
Hücre uzunluğu	1	135.86	120.00	151.00	8.79	1.87	6.47	22
	2	135.97	125.00	154.00	7.98	1.37	5.87	34
	3	93.74	79.00	110.00	8.18	1.40	8.72	34
Minimum hücre genişliği (A)	1	11.41	8.00	17.00	2.18	0.46	19.06	22
	2	16.59	12.00	21.00	1.99	0.34	11.98	34
	3	12.94	8.00	16.00	2.16	0.37	16.69	34
A/Hücre uzunluğu (%)	1	8.46	5.63	12.50	1.83	0.39	21.68	22
	2	12.23	9.23	15.62	1.54	0.26	12.63	34
	3	13.53	1.30	17.65	3.17	0.54	23.45	34
Maksimum hücre genişliği (B)	1	20.68	18.00	35.00	4.13	0.88	19.99	22
	2	37.44	28.00	47.00	5.21	0.89	13.90	34
	3	26.38	16.00	36.00	5.50	0.94	20.87	34
B/Hücre uzunluğu (%)	1	15.36	11.27	29.17	3.79	0.81	24.70	22
	2	27.61	20.83	36.15	4.06	0.70	14.71	34
	3	27.58	2.70	43.75	7.48	1.28	27.14	34
Makronükleus şekil boyu (C)	1	60.45	43.00	86.00	12.37	2.64	20.46	22
	2	74.29	55.00	100.00	11.47	1.97	15.43	34
	3	48.21	38.00	62.00	7.25	1.24	15.04	34
C/Hücre uzunluğu (%)	1	44.52	29.05	60.56	8.41	1.79	18.89	22
	2	54.78	38.41	75.76	8.78	1.51	16.03	34
	3	50.33	4.54	68.75	10.54	1.81	10.95	34
Makronükleus genişliği	1	5.50	4.00	7.00	0.74	0.16	13.45	22
	2	5.26	4.00	7.00	0.67	0.11	12.64	34
	3	4.32	3.00	6.00	0.68	0.12	15.82	34
Makronükleusun anteriyör uçtan uzaklığı	1	40.95	26.00	54.00	7.57	1.61	18.48	22
	2	29.15	19.00	40.00	4.85	0.83	16.64	34
	3	25.22	18.00	35.00	4.18	0.74	16.57	32
Makronükleus parça sayısı	1	8.86	4.00	14.00	2.34	0.50	26.35	22
	2	13.59	9.00	18.00	2.54	0.45	18.67	32
	3	13.23	7.00	18.00	2.64	0.56	19.92	22
Mikronükleus çapı	1	2.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00	3
	2	2.56	2.00	3.00	0.51	0.13	19.99	16
	3	2.18	2.00	3.00	0.40	0.12	18.54	11
Mikronükleus sayısı	1	1.33	1.00	2.00	0.58	0.33	43.30	3
	2	1.82	1.00	3.00	0.73	0.18	39.90	17
	3	1.89	1.00	3.00	0.47	0.11	24.96	18
Somatik kineti sayısı	1	15.33	14.00	16.00	1.16	0.67	7.53	3
	2	20.17	16.00	24.00	2.82	0.81	14.00	12
	3	18.30	14.00	24.00	2.70	0.60	14.74	20
DF1 uzunluğu	1	20.00	18.00	22.00	2.00	1.15	10.00	3
	2	18.20	16.00	21.00	2.17	0.97	11.91	5
	3	11.00	8.00	15.00	2.00	0.55	18.18	13
DF2 uzunluğu	1	20.00	18.00	22.00	2.00	1.15	10.00	3
	2	20.50	18.00	22.00	1.76	0.72	8.59	6
	3	15.79	13.00	22.00	2.33	0.62	14.74	14
DF3 uzunluğu	1	20.67	19.00	23.00	2.08	1.20	10.07	3
	2	18.50	17.00	20.00	1.05	0.43	5.67	6
	3	16.43	14.00	24.00	2.53	0.68	15.42	14

\bar{X} : aritmetik ortalama; Max: maksimum değer; Min: minimum değer; N: birey sayısı; P: popülasyon; SH: standart hata; SS: standart sapma; VK: varyasyon katsayısı.

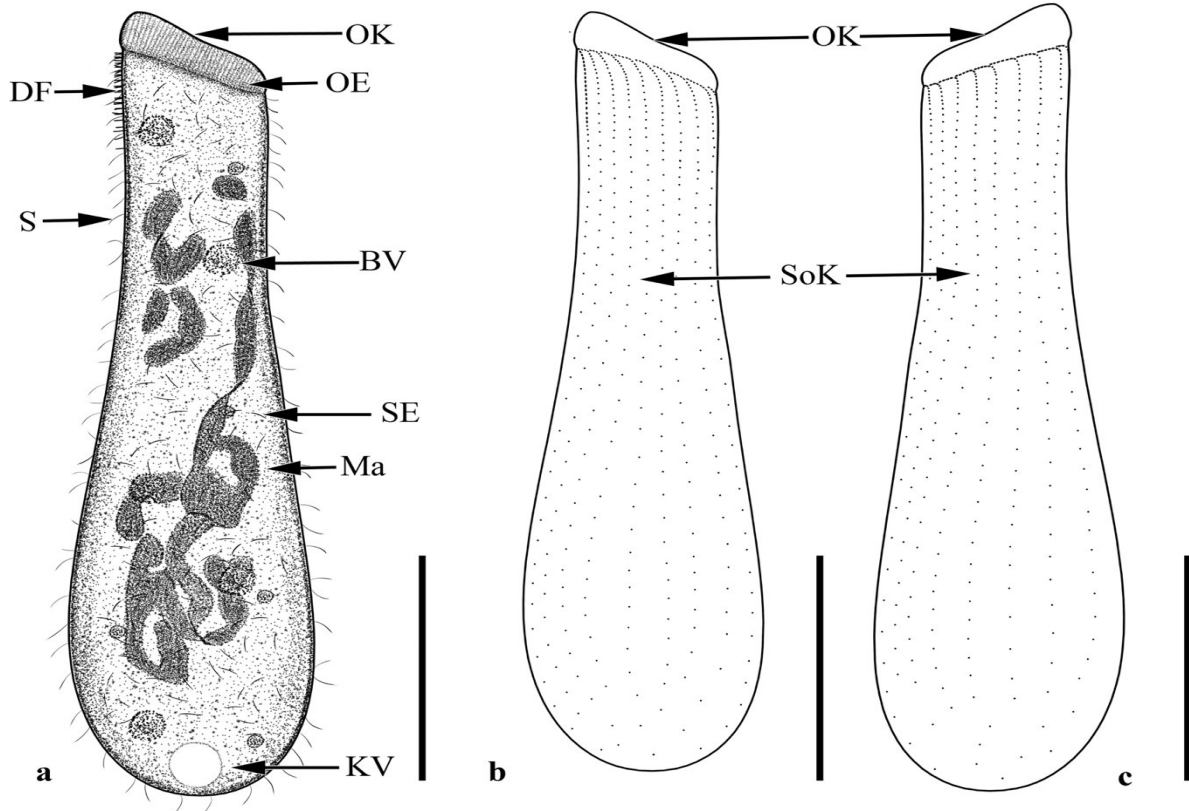
3.1.3. *Spathidium* sp. popülasyon 3

Petri kültürlerinde popülasyon 2'den sonra kültürlerin 10-15 günleri arasında gözlemlendi. Hücre şekli vazo biçimlidir (Şekil 5a-c, 6a-c). Hücre pelikülü ileri derecede esnek olup uzun eksenini boyunca geriye doğru "U" şeklinde kıvrılabildikleri gözlemlendi (Şekil 5d). Lateral olarak 2:1 oranında yassılaştırmıştır. Oral kabartı 4-5 μm yüksekliğinde 15-18 μm genişliğinde olup vücut eksenini ile 30°-45° açı yapacak şekilde konumlanmıştır (Şekil 5a, 6a). Canlı hücreler 109 μm (68 μm -129 μm) en dar bölgenin genişliği 14 μm (9-17 μm), en geniş bölgesi ise 25 μm (16-30 μm) olarak ölçüldü. Protargol impregnasyonlu hücrelerden elde edilen ölçümler Çizelge 1'de verilmiştir. Sitoplazmik görünüm, besin vakuolleri, kontraktıl vakuol ve ekstruzomlar önceki popülasyonlara benzerdir. Makronüklear

organizasyon önceki popülasyonlardan farklı olarak şerit biçiminde değil, küçük nodüllerden oluşan çok parçalı oldukları görüldü (Şekil 5b, 6a).



Şekil 5. *Spathidium* sp. popülasyon 3'ün fotomikrografları. a, d, : canlı, b, c, e: gümüş impregnasyonu. BV: besin vakuölü; DF: dorsal fırça KV: kontraktıl vakuöl; Ma: makronükleus OE: oral ekstruzom; OK: oral kabartı; SiK: sirkamoral kineti. Barlar 50 µm'dir.

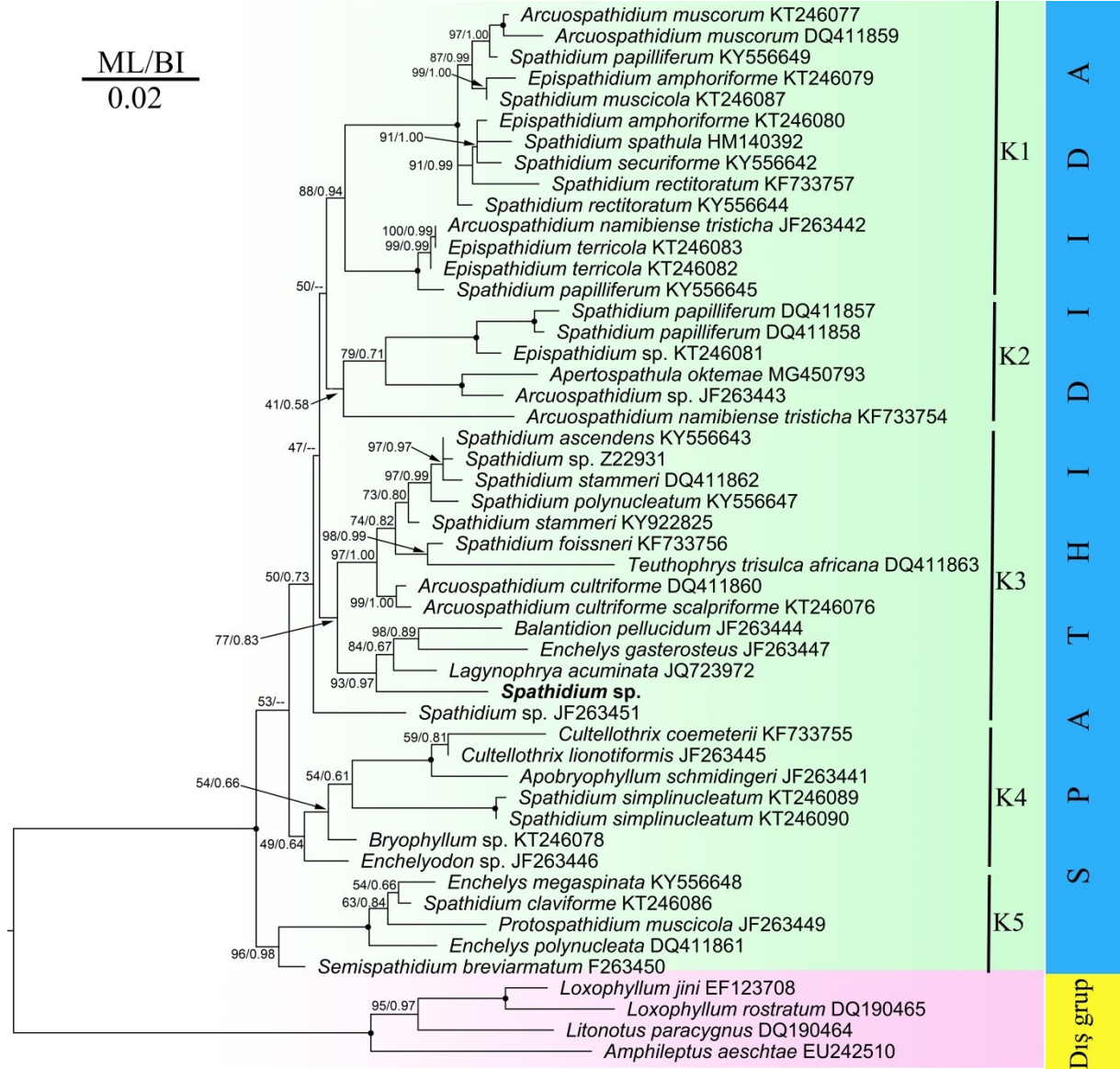


Şekil 6. *Spathidium* sp. popülasyon 3'ün genel morfolojisi ve infrasiliyatür diyagramları. a: canlı hücre, b, c: sağ ve sol lateral siliyatür diyagramı. BV: besin vakuölü; DF: dorsal fırça; KV: kontraktıl vakuöl; Ma: makronükleus; OE: oral ekstruzom; OK: oral kabartı; S: sil; SE: sitoplazmik ekstruzom; SoK: somatik kinetozom. Barlar 50 µm'dir.

Somatik siller 9-10 μm uzunluğunda olup 18 (14-24) kineti oluştururlar (Şekil 6b-c). Somatik ve oral siliyatürün genel organizasyonu önceki popülasyonlar ile benzer olup, dorsal fırça ile ilgili uzunluk ve kinetozom çifti sayıları Çizelge 1’de verilmiştir.

3.2. Moleküler veriler ve filogenetik analizler

Morfolojik olarak ayırt edilen her üç popülasyonun (*Spathidium* sp. popülasyon 1-3) 18S rDNA gen bölgelerinin nükleotid dizileri ortaya çıkarıldı; 1 numaralı popülasyon için 1541, 2 numaralı popülasyon için 1576, 3 numaralı popülasyon için 1564 baz çifti okunmuştur. Her üç popülasyondan elde edilen gen dizilerindeki guanin ve sitozinlerin (G+C) toplam nükleotidlerin %43.5’ini oluşturdukları görüldü.



Şekil 7. Spathidiid siliyatların 18 S rDNA gen dizisine dayalı filogenisi. Bu çalışmada izole edilen *Spathidium* sp. ağaç üzerinde koyu olarak gösterilmiştir. Nod değerlerindeki çift tire (--) Bayesian çıkarsaması ile elde edilen ağaçta bu kolun mevcut olmadığına işaret etmektedir. Bar her 100 nükleotidde 2 baz değişimini göstermektedir.

Her popülasyondan elde edilen 18S rDNA gen dizileri hizalandığında nükleotidlerin birbirleri ile %100 eşleştikleri, delesyon, insersiyon, transversiyon ya da transisyon tarzında baz değişimlerinin bulunmadığı, Kimura 2 parametre modeline göre yapılan analizlerde popülasyonlar arasında farkın

(0.000) bulunmadığı görüldü, gözlenen her bir farklı morfolojik popülasyonun aynı türün farklı gelişim aşamaları olduğuna karar verildi. Elde edilen morfolojik veriler ile, bu çalışmada izole edilen *Spathidium* popülasyonu daha önce tanımlanmış hiçbir türe dahil edilemediğinden *Spathidium* sp. olarak verildi.

Spathidium sp.'nin 18S rDNA geninin nükleotid dizileri GenBank'ta (NCBI) kayıtlı diğer siliyatların gen dizileri ile karşılaştırıldığında (BLAST) en çok *Lagnophrya acuminata*'ya (JQ723972) benzer olduğu, 1564 nükleotidden 1541'inin benzer olduğu ve benzerliğin %99 olduğu belirlendi.

Bu çalışmada izole edilen *Spathidium* sp. popülasyonunun filogenetik durumunun açıklığa kavuşturulması için maksimum olabilirlik (ML) ve Bayesian çıkarsaması (BI) analizlerinde GenBank'tan (NCBI) alınan 18S rDNA gen dizilerinin kayıt numaraları filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir (Şekil 7). Filogenetik analizlerde Spathidiida takımı üyelerine ek olarak dış grup olarak bu takım ile en yakın ortak atadan ayrılan klad (küme) olan Pleurostomatida takımı üyeleri seçildi. Her iki algoritma ile (ML ve BI) oluşturulan filogenetik ağaçlar genel topoloji bakımından birbirleri ile çok yüksek oranda benzer olduklarından filogenetik analiz ML ağacı üzerinde her iki algoritmanın nod değerleri verilerek sunulmuştur. Filogenetik ağaçlarda her iki algoritma ile tam olarak desteklenen nodlar koyu nokta olarak belirtildi.

Her iki algoritma ile (ML ve BI) üretilen filogenetik ağaçta da Spathidiida takımı üyeleri ile dış grup olarak kullanılan Pleurostomatida takımı üyelerinin tam destek ile (ML=100, BI=1.00) ile birbirlerinden ayrıldıkları görüldü (Şekil 7). Bununla birlikte Spathidiida içerisinde yer alan taksonların filogenetik ağaç içerisinde monofiletik gruplar oluşturmadıkları, siliyatların morfolojik sınıflandırma sisteminden farklı olarak 5 ana klad (K1-K5) ve bu kladlar ile ilişkili alt kladlar oluşturdukları görüldü. Her bir klad içerisinde farklı familya ve cinslere ait siliyatlar yer aldığı gibi, aynı cins veya türe ait üyelerin birbirinden farklı kladlarda ve uzak olarak konumlanmış oldukları görüldü. Filogenetik ağaçta *Spathidium* cinsine ait türlerin 5 kladın tamamında diğer organizmalar ile birlikte kümelenmiş olarak görüldü.

Bu çalışmada elde edilen *Spathidium* sp. popülasyonu (filogenetik ağaç üzerinde koyu olarak gösterilmiştir) K3 kladı içerisinde konumlanmış olup diğer *Spathidium* türlerinden ziyade *Lagnophrya acuminata* (JQ723972), *Enchelys gasterosterus* (JF263447) ve *Balantidion pellucidum* (JF263444) ile daha yakın ilişkili oldukları görüldü.

4. Tartışma ve Sonuç

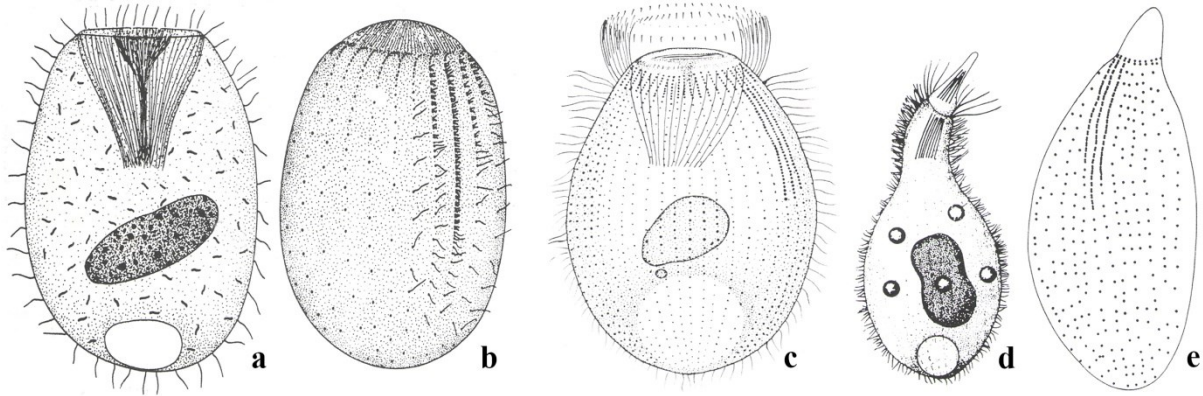
Spathidiid siliyatların keşfinden günümüze kadar 250'nin üzerinde morfo-türü tespit edilmiş ve tanımlanmıştır (Foissner & Xu, 2007; Yıldız, 2018). Siliyat taksonomisi ile ilgili çalışmalar uzun yıllar homolojiyi yansıttığı kabul edilen morfolojik karakterler (apomorfik karakter) üzerinden yürütülmüştür (Lynn & Small, 2000; Corliss, 2001; Adl ve ark., 2005; Foissner & Xu, 2007). Spathidiid siliyatların taksonomisinde kullanılan morfolojik karakterlerin başında hücre büyüklüğü, hücre şekli, nüklear organizasyon, somatik ve oral siliyatür gibi karakterler gelmektedir (Foissner & Xu, 2007).

Sunulan bu çalışmada Petri kültürlerinde birbiri ardınca gözlenen morfolojik olarak birbirinden bariz şekilde ayırt edilebilen üç spathidiid popülasyonu görüldü. Bu popülasyonlardan elde edilen morfometrik veriler üzerinde gerçekleştirilen tek yönlü varyans analizleri sonucunda hücre büyüklüğü, hücre genişliği, nüklear şekil büyüklüğü, somatik kineti sayısı, dorsal fırça uzunluklarının her üç popülasyonun da anlamlı olarak birbirinden farklı oldukları görüldü ($P < 0.001$). Her üç morfolojik popülasyonun 18S rDNA gen bölgesi karşılaştırıldığında kültürlerde birbiri ardınca gözlenen ve farklı morfoloji sergileyen popülasyonların benzer nükleotid dizisine sahip olmalarından dolayı bu siliyatların aynı popülasyonun farklı gelişim formları olduğu sonucuna varıldı. Fakat elde edilen popülasyonlar, morfolojik olarak daha önce tanımlanmış türlere (Foissner & Lei, 2004; Xu & Foissner, 2005; Foissner & Xu, 2007; Foissner ve ark., 2014; Jang ve ark., 2017) dahil edilemediğinden *Spathidium* sp. olarak bildirildi.

Bu çalışmada izole edilen *Spathidium* sp. popülasyonunun 18S rDNA gen dizilerinin diğer *Spathidium* türlerinden ziyade *Lagnophrya acuminata* (JQ723972), *Enchelys gasterosterus* (JF263447) ve *Balantidion pellucidum* (JF263444) türleri ile yakın ilişkili olması dikkat çekicidir. Bu siliyatlar (*Lagnophrya acuminata*, *Enchelys gasterosterus* ve *Balantidion pellucidum*) morfolojik

olarak *Spathidium* türlerinden çok farklı oldukları gibi taksonomik olarak da birbirinden uzak ve her biri ayrı familyalar içinde sınıflandırılmaktadır (*Lagnophrya acuminata*, Familya Trachelophyllidae Kent 1882; *Enchelys gasterosterus*, Familya Enchelyidae Ehrenberg, 1838; *Balantidion pellucidum*, Acrpoisthiidae Foissner and Foissner 1988). *Lagnophrya acuminata* (Şekil 8d, 8e) 70-95 × 20-30 µm boyutları, vazo biçimli, geri çekilebilir 10 µm yüksekliğinde oral çıkıntı, hücrenin ortasında konumlanmış elipsoid tek makronükleus ve birkaç mikronükleus, dikinetid sirkamoral kineti, 11-18 µm ve 3-4 µm uzunluğunda iki tip ekstuzoma sahip olması ile karakterize edilir. *Lagnophrya acuminata* morfolojik ve morfometrik olarak *Spathidium* sp.'den oldukça farklıdır. *Enchelys gasterosterus* (Şekil 8c) vazo biçimli, apikal konumlu oral açıklık düz olarak kesik, hücrenin ortasında konumlanmış oval biçimli bir makronükleus ve küresel biçimli bir mikronükleus, sirkamoral kineti somatik kinetilerin anteriyöründe ve uzun eksene paralel düzenlenmiş olması ile karakterize edilir ve bu çalışmanın konusunu oluşturan *Spathidium* sp.'den morfolojik olarak farklıdır. *Balantidion pellucidum* (Şekil 8a, 8b) 70-100 × 25-45 µm boyutları, genişçe silindirik ve anteriyör kısım hafifçe daralmış biçimli, oral açıklık anteriyörde ve düz olarak kesik, oral açıklığın etrafı somatik sillerin anteriyör ucunun farklılaşmasından oluşan fragmentli sirkamoral kineti, hücrenin ortasında konumlanmış küresel veya hafifçe eliptik bir makronükleus ve küresel biçimli tek mikronükleus, 4-6 µm uzunluğunda çubuk biçimli ekstruzomlar ile karakterize edilir. Bu siliyatlar morfolojik ve morfometrik olarak bu çalışmanın konusunu oluşturan *Spathidium* sp.'den farklıdır.

Moleküler verilere dayalı filogenetik analizler Spathidiida takımı içerisinde yer alan taksonların monofiletik olmadıkları pek çok çalışmada gösterilmiştir (Vd'acný ve ark., 2014; Jang ve ark., 2015 ve 2017; Rajter & Vd'acný, 2016; Yıldız, 2018). Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar Spahidiida takımının dış grup olarak kullanılan Pleurostomatida takımından tam destek ile (ML=100; BI=1.00) ayrılarak monofiletik bir grup oluşturduğu, Spathidiida takımı içerisinde yer alan taksonların ise önceki çalışmalarda olduğu gibi parafiletik oldukları görülmüştür.



Şekil 8. Filogenetik ağaçta *Spathidium* sp. ile birlikte kümelenen siliyatların morfolojisi. a, b: *Balantidion* sp. (Foissner ve ark., 1999) c: *Enchelys* sp. (Curds, 1983); d, e: *Lagnophrya acuminata* (Foissner ve ark., 1999).

Filogenetik ağaçlarda spathidiid siliyatlar 5 ana klad (K1-K5) oluşturdukları ve *Spathidium* cinsi üyelerinin bu kladların tamamında diğer siliyatlar ile birlikte kümelenen üyelerinin bulunduğu ve polifiletik oldukları açıkça görülmektedir (Şekil 7). Bu kaotik durum iki sebepten kaynaklanabilir; 1) siliyat taksonları homolojiyi yansıttığı varsayılan morfolojik veriler kullanılarak oluşturulmuştur. Spathidiid siliyatların taksonomisinde başta oral apareyin morfolojisi ve oral siliyatür olmak üzere hücre şekli, somatik siliyatür, hücre biçimi ve büyüklüğü, ekstruzom şekli yaygın olarak kullanılan morfolojik karakterlerdir (Xu & Foissner, 2005; Foissner & Xu, 2007; Foissner ve ark., 2014; Jang ve ark., 2017). Spathidiid siliyatlar avcı organizmalar olup kendilerinden küçük, eşit ya da daha büyük siliyatlar ve diğer küçük çok hücreli organizmaları yakalayarak beslenirler. Farklı soy hatlarından gelen ve benzer beslenme stratejisi altında aynı seçim baskısına maruz kaldıkları için benzer morfoloji gösterebilirler. Bu da morfolojik yapıya dayalı taksonominin bu organizma grubu için (Takım: Spathidiida) homolojiyi yansıtmadığı düşünülebilir. Bu varsayımın doğruluğunu test etmek için filogenetik ağaçta birlikte kümelenen organizmalar için ayırt edici yeni morfolojik karakterlerin ortaya çıkartılması, bu karakterlerin filogenetik yöntemler ile diğer spathidiid siliyatlara uyarlanması

gerekmektedir; 2) siliyatların 18S rDNA gen bölgesinin farklı habitatlarda birbirinden farklı mutasyonlar geçirdiği ve konvergansinin olduğudur. Spathidiidlerde daha da genel anlamda avcı siliyatları temsil edilen Haptoria sınıfında konvergansinin veya paralel evrim olabileceğine dair veriler mevcuttur (Vd'acný ve ark., 2014; Jang ve ark., 2017). Bu durumu açıklığa kavuşturmak için 18S rDNA gen bölgesine ilave olarak başka gen bölgelerinin de dahil edildiği (ITS, COI gibi) filogenetik ağaçlar oluşturularak 18S rDNA gen bölgelerinin filogenetik bilgiyi açığa çıkarma durumları test edilmelidir. Siliyatlar ile ilgili moleküler verilerin oldukça az ve belli organizmalar ile sınırlı olmasından dolayı mevcut veriler ile bu karşılaştırmaları yapmak şu an için mümkün görülmemektedir. Bu karışıklığın çözümü ancak farklı habitatlardan izole edilecek güvenilir morfolojik verilere dayalı farklı gen bölgelerine ait verilerin kullanılacağı filogenetik çalışmalar ile mümkün olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmaya FYL-2019-7960 numaralı tez projesi kapsamında maddi destek veren Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... , & Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399 - 451. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x
- Ayres, D. L., Darling, A., Zwickl, D. J., Beerli, P., Holder, M. T., Lewis, P. O., ... , & Suchard, M. A. (2012). BEAGLE: An application programming interface and high-performance computing library for statistical phylogenetics. *Systematic Biology*, 61, 170–173. doi:10.1093/sysbio/syr100
- Corliss, J. O. (2001). Protozoan Taxonomy and Systematics. In G. Pettis (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1-7). John Wiley & Sons. doi:10.1038/npg.els.0001925
- Curds, C. R. (1983). *British and Other Freshwater Ciliated Protozoa*. U.S.A: Cambridge University Press.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Foissner, W. (1991). Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *European Journal of Protistology*, 27(4), 313 - 330. doi:10.1016/S0932-4739(11)80248-8
- Foissner, W. (2014). An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 271 - 292. doi:10.1099/ijs.0.057893-0
- Foissner, W., Berger, H. & Schaumburg, J. (1999). *Identification and Ecology of Limnetic Plankton Ciliates*. München, Germany: Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft.
- Foissner, W., & Lei, Y. L. (2004). Morphology and ontogenesis of some soil spathidiids (Ciliophora, Haptoria). *Linzer biologische Beiträge*, 36, 159–199.
- Foissner, W., & Xu, K. (2007). Monograph of the Spathidiida (Ciliophora, Haptoria) Vol. I: Protospathidiidae, Arcuospathidiidae, Apertospathulidae. *Monographiae Biologicae*, 81, 1–485.
- Foissner, W., Wolf, K. W., Kumar, S., Xu, K. D., & Quintela-Alonso, P. (2014). Five new spathidiids (Ciliophora: Haptoria) from Caribbean Tank Bromeliads. *Acta Protozoologica*, 53(2), 159 - 194. doi:10.4467/16890027AP.14.015.1596
- Gong, J., Kim, S. J., Kim, S. Y., Min, G. S., Roberts, D. M., Warren, A., & Choi, J. K. (2007). Taxonomic redescrptions of two ciliates, *Protogastrostyla pulchra* n. g., n. comb. and *Hemigastrostyla enigmatica* (Ciliophora: Spirotrichea, Stichotrichia), with phylogenetic analyses based on 18S and 28S rRNA gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(6), 468 - 478. doi:10.1111/j.1550-7408.2007.00288.x

- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518 - 522. doi:10.1093/molbev/msx281
- Jang, S. W., Vd'acný, P., Shazib, S. U. A., & Shin, M. K. (2015). Morphology, ciliary pattern and molecular phylogeny of *Trachelophyllum brachypharynx* Levander, 1894 (Litostomatea, Haptoria, Spathidiida). *Acta Protozoologica*, 54(2), 123 - 135. doi:10.4467/16890027AP.15.010.2735
- Jang, S. W., Vd'acný, P., Shazib, S. U. A., & Shin, M. K. (2017). Linking morphology and molecules: integrative taxonomy of spathidiids (Protista: Ciliophora: Litostomatea) from Korea. *Journal of Natural History*, 51(17-18), 939 - 974. doi:10.1080/00222933.2017.1319520
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870 - 1874. doi:10.1093/molbev/msw054
- Lynn, D. H. & Small, E. B. (2000). Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In J. J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury (Eds.), *The Illustrated Guide to the Protozoa* (pp. 371-656). Lawrence, Kansas, USA: Society of Protozoologists.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268 - 274. doi:10.1093/molbev/msu300
- Özdamar, K. (1999a). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi 1*. Eskişehir: Kaan Kitabevi.
- Özdamar, K. (1999b). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi 2*. Eskişehir: Kaan Kitabevi.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253 - 1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Rajter, L., & Vd'acný, P. (2016). Rapid radiation, gradual extinction and parallel evolution challenge generic classification of spathidiid ciliates (Protista, Ciliophora). *Zoologica Scripta*, 45(2), 200 - 223. doi:10.1111/zsc.12143
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... , & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539 - 542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Shazib, S. U. A., Vd'acný, P., Kim, J. H., Jang, S. W., & Shin, M. K. (2016). Molecular phylogeny and species delimitation within the ciliate genus *Spirostomum* (Ciliophora, Postciliodesmatophora, Heterotrichea), using the internal transcribed spacer region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 128 - 144. doi:10.1016/j.ympev.2016.05.041
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564 - 577. doi:10.1080/10635150701472164
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725 - 2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Vd'acný, P., Bourland, W. A., Orsi, W., Epstein, S. S., & Foissner, W. (2011). Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(2), 510 - 522. doi:10.1016/j.ympev.2011.02.016
- Vd'acný, P., & Foissner, W. (2012). Monograph of the Dileptids (Protista, Ciliophora, Rhynchostomatia). *Denisia*, 31, 1-529.
- Vd'acný, P., & Foissner, W. (2013). Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogenetic position of *Semispathidium* (Ciliophora, Haptoria) with description of *Semispathidium breviararmatum* sp. n. from tropical Africa. *Zoologica Scripta*, 42(5), 529 - 549. doi:10.1111/zsc.12023
- Vd'acný, P., Breiner, H. W., Yashchenko, V., Dunthorn, M., Stoeck, T., & Foissner, W. (2014). The chaos prevails: molecular phylogeny of the Haptoria (Ciliophora, Litostomatea). *Protist*, 165(1), 93 - 111. doi:10.1016/j.protis.2013.11.001

- Xu, K., & Foissner, W. (2005). Morphology, ontogenesis and encystment of a soil ciliate (Ciliophora, Haptorida), *Arcuospathidium cultriforme* (Penard, 1922), with models for the formation of the oral bulge, the ciliary patterns, and the evolution of the spathidiids. *Protistology*, 4, 5 - 55.
- Yıldız, İ. (2018). Morphology and phylogeny of *Apertospathula oktemae* n. sp. (Ciliophora, Haptorida, Spathidiida) from Lake Van, Turkey. *European Journal of Protistology*, 66, 1 - 8. [doi:10.1016/j.ejop.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ejop.2018.06.001)
- Yıldız, İ. (2021). Morphology and phylogeny of a new soil ciliate, *Colpodidium zelihayildizae* n. sp. (Ciliophora, Nassophorea, Colpodidiidae), from Van, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 45, 304 - 313. [doi:10.3906/zoo-2101-20](https://doi.org/10.3906/zoo-2101-20)