

## First Molecular Characterization of *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metacercariae Infecting the Gills of Chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey

Emrah ŞİMŞEK<sup>1\*</sup>, Alparslan YILDIRIM<sup>2</sup>, Abdullah İNCİ<sup>2</sup>, Önder DÜZLÜ<sup>2</sup>, Erdal YILMAZ<sup>1</sup>, Zuhale ÖNDER<sup>2</sup>, Arif ÇİLOĞLU<sup>2</sup>, Gökmen Zafer PEKMEZCİ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, 38039, Kayseri, Turkey

<sup>2</sup>Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, 38039, Kayseri, Turkey

<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, 55200, Samsun, Turkey

### ABSTRACT

*Posthodiplostomum* Dubois, 1936 species have worldwide distribution. Metacercariae of *P. cuticola* that is common in Europe causes “black spot” disease in freshwater fishes. A limited number of data on mitochondrial and ribosomal sequences of *P. cuticola* are available in the GenBank. In addition, there is no sequencing data on trematodes belonging to genus of *Posthodiplostomum* in Turkey. The aim of this study was to investigate the presence of *Posthodiplostomum* metacercariae in freshwater chubs (*Squalius cephalus*) and to reveal the molecular characterization of mt-COI and ITS-2 gene regions of the identified isolates. *Posthodiplostomum* metacercariae were detected in the gills of two (1.6%) out of 123 fish. The ITS-2 gene sequences of the isolates (POSTC1-C2) (MN701652-3) found in this study showed 99.8-100% identity with *P. cuticola* sequences isolated from skin, muscle and fins of different fish species in Czech Republic and Hungary. In addition, the mt-COI gene sequences of the POSTC1-C2 isolates (MN700658-9) showed 99.1-98.9% identity with *P. cuticola* isolate (cercariae) (KX931424) from *Planorbis planorbis* in Lithuanian. This study provides first molecular and phylogenetic characterization of *P. cuticola* isolates found in chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey.

**Keywords:** ITS-2 and mt-COI gene regions, Molecular characterization, *Posthodiplostomum cuticola*, *Squalius cephalus*, Turkey.

\*\*\*

### Türkiye’de Tatlı Su Kefali’nin (*Squalius cephalus*) Solungaçlarını Enfekte Eden *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metaserkerlerinin İlk Moleküler Karakterizasyonu

### ÖZ

*Posthodiplostomum* Dubois, 1936 türleri dünya genelinde oldukça yaygınlık göstermektedirler. Avrupa’da yaygın olan *P. cuticola* türünün metaserkeri tatlı su balıklarında siyah nokta “black spot” hastalığına sebep olmaktadır. GenBank veri tabanında *P. cuticola* türüne ilişkin mitokondriyal ve ribozomal sekans kaydı sınırlıdır. Diğer yandan, Türkiye’de *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodların sekans karakterizasyonuna dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, tatlı su kefallerinde (*Squalius cephalus*) *Posthodiplostomum* metaserkerlerinin araştırılması ve tespit edilen izolatların mt-COI ve ITS-2 gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. İncelenen 123 balıktan ikisinin (%1,6) solungaçlarında *Posthodiplostomum* metaserkerleri saptanmıştır. Çalışmada tespit ettiğimiz izolatların (POSTC1-C2) (MN701652-3) ITS-2 gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, Çek Cumhuriyeti ve Macaristan’da farklı balık türlerinin deri, kas ve yüzgeçlerinden izole edilen *P. cuticola* izolatları ile %99,8-100 arasında identiklik göstermiştir. Yine POSTC1-C2 izolatlarının (MN700658-9) mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, Litvanya’da *Planorbis planorbis*’te bulunan *P. cuticola* izolatı (serker) (KX931424) ile %99,1-98,9 oranında identik bulunmuştur. Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez tatlı su kefalinde (*Squalius cephalus*) bulunan *P. cuticola* izolatlarının moleküler ve filogenetik karakterizasyonları ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** ITS-2 ve mt-COI gen bölgeleri, Moleküler karakterizasyon, *Posthodiplostomum cuticola*, *Squalius cephalus*, Türkiye.

To cite this article: Şimşek E, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, Yılmaz E, Önder Z, Çiloğlu A, Pekmezci G.Z. First Molecular Characterization of *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metacercariae Infecting The Gills of Chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):45-51.

Submission: 20.11.2019 Accepted: 27.01.2020 Published Online: 10.02.2020

ORCID ID; EŞ: 0000-0002-0492-9840, AY: 0000-0001-9868-0363, Aİ: 0000-0003-1614-0756, ÖD: 0000-0002-6951-0901, EY: 0000-0001-6348-3618, ZÖ: 0000-0002-6143-3630, AÇ: 0000-0003-2695-7102, GZP: 0000-0002-7791-1959

\*Corresponding author e-mail: emrahshimsek@erciyes.edu.tr

## GİRİŞ

*Posthodiplostomum* Dubois, 1936 cinsinde yer alan türler dünya genelinde oldukça yaygınlık göstermektedirler (Niewiadomska 2002). Yaşam döngülerinde salyangozlar (birinci ara konak), balıklar (ikinci ara konak) ve balıkla beslenen kuşlar (son konak) olmak üzere üç konak bulunmaktadır (Dönges 1964). *Posthodiplostomum* sp. ile enfekte balıklarda gelişme geriliği ve ağırlık kaybı gözlenmekle birlikte, oluşan lezyonlara bağlı olarak, balıkların pazar kalitesi düşmektedir (Lane ve Morris 2000). Bunun yanı sıra metaserkerlerle enfekte balıklar son konak olan kuşlara daha kolay yem olabilmektedir (Ondračková ve ark. 2006).

Avrupa'da çeşitli balık türlerinde *P. cuticola* (von Nordmann 1832) Dubois, 1936 ve *P. brevicandatum* (von Nordmann 1832) Dubois, 1936 olmak üzere iki tür tanımlanmış ve yalnızca bu iki türün varlığı kabul ediliyorken, son yıllarda yapılan moleküler tabanlı çalışmalarda daha çok Kuzey Amerika'da yaygınlık gösteren *P. minimum* (McCallum 1921) Dubois, 1936 ve *P. centrarchi* Hoffman, 1958 türlerinin de Avrupa'da farklı konak türlerinde varlığı ortaya çıkarılmıştır (Kvach ve ark. 2017, Stoyanov ve ark. 2017). Moleküler veriler Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya gibi farklı coğrafyalarda doğal enfekte konaklardan izole edilen trematod türlerinin doğru bir şekilde tür identifikasyonlarının yapılmasında, gelişim dönemleri arasındaki ilişkilerin kurulmasında ve doku/konak spesifitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmıştır (Moszczyńska ve ark. 2009, Locke ve ark. 2010, Nguyen ve ark. 2012, Stoyanov ve ark. 2017, Kvach ve ark. 2017, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019). Bunun yanı sıra moleküler tabanlı çalışmalar kriptomik türlerin tanımlanmasını, trematod çeşitliliğinin belirlenmesini ve yaşam döngülerinin daha iyi anlaşılmasını da sağlamıştır (Poulin 2011).

Avrupa'da yaygınlık gösteren *P. cuticola* türünün metaserkerleri Türkiye'de Eber ve Sapanca Gölü'nden yakalanan sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında morfolojik olarak tespit edilmiştir (Öztürk 2005, Uzunay ve Soylu 2006). Bunun dışında Aşağı Kızılırmak Deltasından yakalanan *Neogobius fluviatilis* ve *Proterorhinus marmoratus* balık türlerinde morfolojik olarak *Posthodiplostomum* sp. rapor edilmiştir (Güven ve Öztürk 2018). Ancak, bugüne kadar Türkiye'de *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodlar üzerine moleküler tabanlı araştırmaların yapılmadığı dikkati çekmiştir. Günümüzde *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodların tür teşhislerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için mt-COI ve ITS gen bölgelerinin PCR ve sekans analizleri sıklıkla kullanılmaktadır (Stoyanov ve ark. 2017, Boone ve ark. 2018, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019). Bu çalışmada, tatlı su kefalinde (*Squalius cephalus*) bulunan *Posthodiplostomum* izolatlarının mt-COI ve

ITS-2 gen bölgelerinin sekans analizleri yapılarak Türkiye'deki ilgili parazit nesilleri için ilk moleküler karakterizasyon verileri ortaya çıkarılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Örneklerin Toplanması ve Parazitolojik İncelemeler

Kasım 2016 ve Kasım 2018 tarihleri arasında İç Anadolu Bölgesi, Kayseri İli'ndeki yerel balıkçılardan satın alınarak uygun taşıma koşullarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Laboratuvarına getirilen toplam 123 adet tatlı su kefal (*Squalius cephalus*) parazitolojik açıdan incelenmiştir. Balıkların vücut yüzeyleri, yüzgeçleri ve solungaçları stereo mikroskop (Olympus SZX10 Tokyo, Japan) altında dikkatlice incelendikten sonra nekropsileri gerçekleştirilmiştir. Tüm balıkların karın boşlukları, iç organları ve kas dokuları ayrı ayrı metaserker varlığı açısından muayene edilmiştir. Siyah görümlü kistlere yalnızca solungaçlarda rastlanmıştır. Solungaçlardan toplanan kistler fizyolojik tuzlu su içerisinde doku artıklarından temizlendikten sonra moleküler analizlerde kullanılmak üzere %70'lik alkol içerisinde +4°C'de saklanmıştır.

### Metaserkerlerden Genomik DNA İzolasyonu, ITS-2 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Alkolü uzaklaştırılan metaserkerlerin genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonları ticari kit (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen gDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

Örneklerden izole edilmiş olan gDNA ekstraktları, metaserkerlerin ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerini amplifiye eden OPHE\_T\_Fwd/OPHE\_T\_Rev (Skov ve ark. 2009) ve Dice1F/Dice11R (Van Steenkiste ve ark. 2015) primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur. PCR reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda; 12,5 µl ticari master mix (Maxima Hot Start PCR Master Mix, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5 µM her bir primer ve 10-50 ng gDNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) protokoller; mt-COI gen bölgesi için Van Steenkiste ve ark. (2015)'a göre ayarlanmış, ITS-2 gen bölgesi için ise 95°C'de 4 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95°C'de 30 sn, bağlanma: 52°C'de 30sn, uzama: 72°C'de 1 dk ve final uzama: 72°C'de 10 dk olacak şekilde belirlenmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) SafeView™ (Applied Biological Materials Richmond, BC, Canada) ile boyanarak %1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabii tutulmuş, jel görüntülemeleri ve analizleri Quantum CX5 jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, France) gerçekleştirilmiştir.

## DNA Dizi (Sekans) ve Filogenetik Analizleri

Ticari kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Germany) kullanılarak jelden pürifiye edilen her bir gen bölgesine ait PCR ürünleri, ilgili forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır (Macrogen, Amsterdam). İzolatların elde edilen çift yönlü DNA dizilerinin kromotogram kalite skorları dikkate alınarak Geneious 11.0.2 yazılımında forward ve reverse dizilimleri birleştirilmiş ve metaserkerlere ait final dizilimler elde edilmiştir (Kearse ve ark. 2012). Final dizilimlerinin Geneious 11.0.2 yazılımı üzerinden BLASTn analizleri gerçekleştirilerek metaserkerlerin tür identifikasyonları yapılmıştır (Kearse ve ark. 2012). Daha sonra GenBank'a, farklı coğrafik bölgelerden kaydedilmiş *Posthodiplostomum* türleri ve yakın cinsler içerisinde yer alan bazı izolatlar seçilerek, her iki gen bölgesi için veri setleri oluşturulmuş ve Geneious 11.0.2 yazılımında çoklu hizalamaları yapılmıştır (Kearse ve ark. 2012). MEGA 7.0 genetik yazılımı üzerinden Kimura two-parameter modeli kullanılarak tür içi ve arası nükleotid farklılıkları (%) belirlenmiştir (Kimura 1980, Kumar ve ark. 2016).

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde, Geneious 11.0.2 yazılım programında JC+G (ITS-2) ve GTR+G (mt-COI) modellerini temel alan Bayesian (BA) [MrBayes version 3.2.6 (Huelsenbeck ve Ronquist 2001)] analizi uygulanmıştır (Kearse ve ark. 2012). Sekans evrimi için en uygun DNA modelleri Akaike Information Criterion (AIC) kriterlerine göre MEGA 7.0 genetik yazılımında belirlenmiştir (Kumar ve ark. 2016).

*Tylodelphys mashonensis* [KC685363 (ITS); KR863382 (mt-COI)] her iki filogenetik ağaçta dış dal olarak kullanılmıştır. Karakterizasyonu sağlanan *P. cuticola* izolatlarının (POSTC1-C2) ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerine ait DNA dizileri (ITS-2; MN701652-3 ve mt-COI; MN700658-9) erişim numaralarıyla GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

## BULGULAR

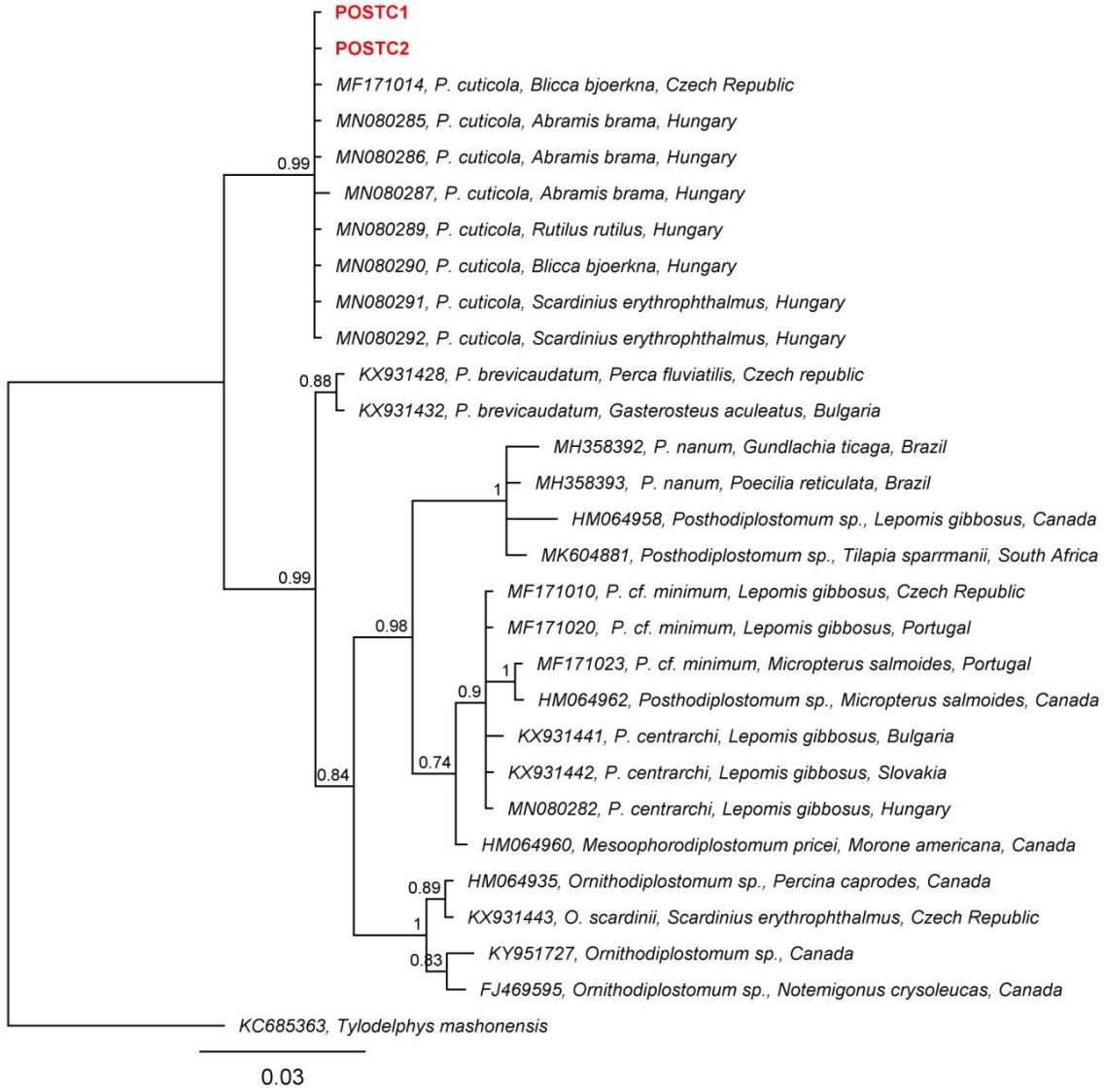
İncelenen 123 balıktan ikisinin (%1,6) solungaçlarında birer adet olmak üzere *Posthodiplostomum* sp. metaserkeri bulunmuştur. Kistler stereo mikroskop altında dikkatlice patlatılarak metaserkerlerin serbest kalması sağlanmıştır. Serbest kalan metaserkerlerin vücut yapılarının deforme olduğu görülmüş ve morfolojik yapıları görüntülenememiştir. İzolatların ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerine ait sekansları başarıyla elde edilmiştir. Metaserkerlerin her iki gen bölgesine ait sekansları, BLASTn analizine göre *P. cuticola* olarak tanımlanmış ve POSTC1-C2 izolat isimleriyle GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

POSTC1-C2 izolatlarının ITS-2 gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda 444bp uzunluğunda DNA dizisi

elde edilmiştir. ITS-2 gen bölgesine ait veri seti oluşturulurken çoklu hizalamaları yapılan izolatların dizi uzunlukları 444bp olarak düzenlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatların ITS-2 nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılık saptanmamıştır. ITS-2 gen bölgesine göre çalışmada bulunan izolatlar, Çek Cumhuriyeti'nde *Leuciscus cephalus* ve *Blicca bjoerkna*'dan, Macaristan'da *Abramis brama*, *Rutilus rutilus*, *B. bjoerkna* ve *Scardinius erythrophthalmus*'tan rapor edilen *P. cuticola* (MF171014-16; MN080286,89-92) izolatları ile %100 identiklik gösterirken, yine Macaristan'da *A. brama*'dan bildirilen *P. cuticola* (MN080287) izolatı ile %0,2 nükleotid farklılığı göstermiştir. ITS-2 veri setine dahil edilen ve farklı coğrafik bölgelerden GenBank'a kayıtları gerçekleştirilmiş *P. nanum*, *P. cf. minimum*, *P. centrarchi* ve *P. brevicaudatum* türleriyle POSTC1-C2 izolatları arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla %4,2-6,7; %7,1-7,7; %4,8-6,4; %3,7 aralığında belirlenmiştir. Bunun yanı sıra yine GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. olarak kaydedilmiş izolatlar ile bu çalışmadaki izolatlar arasında %4,8-8 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür.

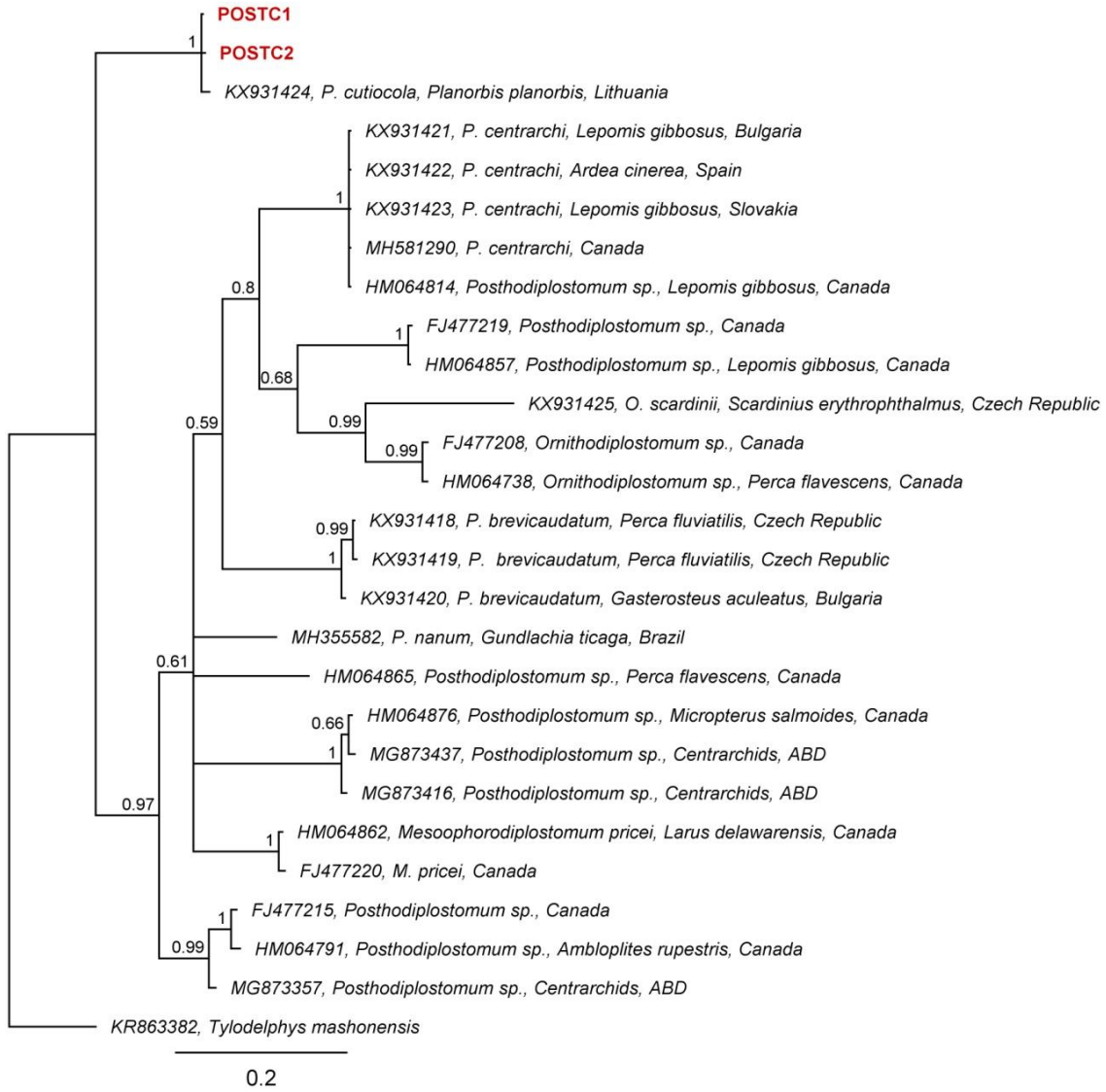
POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda 577bp uzunluğunda DNA dizisi elde edilmiştir. Mt-COI gen bölgesine ait veri seti oluşturulurken çoklu hizalamaları yapılan izolatların dizi uzunlukları 352bp olarak düzenlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatların mt-COI nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılıkları %0,3 olarak belirlenmiştir. POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, BLASTn analizlerine göre, Litvanya'da *Planorbis planorbis*'te bulunan KX931424 erişim numaralı izolatla (serker) %98,9-99,1 oranında identik bulunmuştur. Mt-COI veri setine dahil edilen ve farklı coğrafik bölgelerden GenBank'a kayıtları gerçekleştirilmiş *P. nanum*, *P. centrarchi* ve *P. brevicaudatum* türleriyle POSTC1-C2 izolatları arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla %19; %22-22,4; %25,5-26,3 aralığında belirlenmiştir. Bunun yanı sıra yine GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. düzeyinde kayıtları gerçekleştirilmiş izolatlar ile POSTC1-C2 izolatları arasında %16,7-25 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür. Mt-COI gen bölgesinin DNA dizi analizlerine göre *Posthodiplostomum* türleri arasındaki nükleotid farklılığın ITS-2'ye göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Her iki gen bölgesine ait filogenetik ağaçta iki ana cluster (dal) oluşmuştur. *Posthodiplostomum cuticola* izolatları kendi aralarında gruplanarak diğer *Posthodiplostomum* türlerinden farklı bir clusterda (dalda) yer almıştır (Şekil. 1 ve 2).



**Şekil 1.** *Posthodiplostomum* türlerinin ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri. *Tylodelphys mashonensis* (KC685363) dış dal olarak kullanılmıştır. Veri setine dahil edilen izolatlar GenBank erişim numaraları, tür ismi, konak ve ülkeleri ile verilmiştir. Çalışmada bulunan izolatlar (POSTC1-C2) kırmızı karakterde gösterilmiştir. Ölçek çizgisi %0,03 farklılığı göstermektedir.

**Figure 1.** Phylogenetic relationships among *Posthodiplostomum* species based on ITS-2 gene. *Tylodelphys mashonensis* (KC685363) was used as an out group. Isolates that is included in data sets were given with GenBank accession numbers, species names, hosts, and countries. The isolates (POSTC1-2) found in this study were shown with red character. Scale bar represents 0.03% substitutions per nucleotide position.



**Şekil 2.** *Posthodiplostomum* türlerinin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri. *Tyloodelphys mashonensis* (KR863382) dış dal olarak kullanılmıştır. Veri setine dahil edilen izolatlar GenBank erişim numaraları, tür ismi, konak ve ülkeleri ile verilmiştir. Çalışmada bulunan izolatlar (POSTC1-C2) kırmızı karakterde gösterilmiştir. Ölçek çizgisi %0,2 farklılığı göstermektedir.

**Figure 2.** Phylogenetic relationships among *Posthodiplostomum* species based on mt-COI gene. *Tyloodelphys mashonensis* (KR863382) was used as an out group. Isolates that is included in data sets were given with GenBank accession numbers, species names, hosts, and countries. The isolates (POSTC1-2) found in this study were shown with red character. Scale bar represents 0.2% substitutions per nucleotide position.

## TARTIŞMA

Avrupa’da yaygınlık gösteren *P. cuticola* türünün metaserkerleri ikinci ara konak balıklarda deri, kas ve yüzgeç gibi farklı dokulara yerleşerek melanosit birikimine bağlı olarak siyah nokta (“black spot”) hastalığına sebep olmaktadır (Dönges 1964). Bugüne kadar Türkiye’de, bu parazit türü ile ilgili yalnızca Aşağı Kızılırmak Deltası ile Eber ve Sapanca Göllerinden yakalanan birkaç farklı balık türünde (deri ve yüzgeçler) morfolojik düzeyde veriler bulunmaktadır. (Öztürk 2005, Uzunay ve Soylu 2006, Güven ve Öztürk 2018). *Posthodiplostomum cuticola* türüne ilişkin GenBank veri tabanında sınırlı sayıda sekans kaydı bulunmakla birlikte, Türkiye’den

*Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodlara ait moleküler tabanlı herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma ile tatlı su kefalinde (*Squalius cephalus*) tespit edilen *P. cuticola* izolatlarının (POSTC1-C2) Türkiye’de ilk kez mt-COI ve ITS-2 gen bölgelerinin sekans analizleri yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, balıkların solungaçlarında bulunan izolatlar, ITS-2 gen bölgesinin analizlerine göre Çek Cumhuriyeti’nde ve Macaristan’da farklı balık türlerinin deri, kas ve yüzgeçlerinden izole edilen *P. cuticola* (MF171014-16; MN080286,87,89-92) izolatları ile %99,8-100 arasında identiklik göstermiştir. Veri



setine dahil edilen *Posthodiplostomum* izolatlarının tür içi genetik farklılıkları %0,0-0,5 iken, türler arası farklılık %1,2-7,7 olarak belirlenmiştir. GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtları gerçekleştirilmiş izolatlar ile POSTC1-C2 izolatları arasında %4,8-8 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen izolatların mt-COI nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılıkları %0,3 olarak belirlenmiştir. POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri Litvanya'da *P. planorbis*'te bulunan *P. cuticola* izolatı (serker) ile (KX931424) %0,9-1,1 nükleotid farklılığı göstermiştir. Stoyanov ve ark. (2017)'nin da belirttiği gibi bu çalışmada da mt-COI gen bölgesine göre *Posthodiplostomum* türlerinde tür içi genetik farklılık (%0,0-1,7) türler arası farklılıktan (%16,5-26,3) oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum mt-COI gen bölgesinin *Posthodiplostomum* türlerinin ayırımında kullanışlı bir belirteç olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmanın (Stoyanov ve ark. 2017) sonuçlarına benzer şekilde mt-COI gen bölgesinin DNA dizi analizlerine göre *Posthodiplostomum* türleri arasındaki nükleotid farklılığın ITS-2'ye göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda her iki gen bölgesine ait filogenetik ağaçta parazit türleri iki ana dalda yer almıştır. *Posthodiplostomum cuticola* izolatları, çeşitli araştırmalardaki (Kvach ve ark. 2017, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019) filogenetik yapılanmaya benzer şekilde kendi aralarında monofiletik olarak gruplanarak, diğer türlerden farklı bir dalda yer almış ve bu türün *Posthodiplostomum*'un evrimsel sürecinde ve taksonomisinde oldukça önemli bir yere sahip olduğu dikkati çekmiştir. Bazı çalışmalarda da belirtildiği gibi (López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019), GenBank veri tabanında *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtlı bir izolat (HM064962), *P. cf. minimum*, *P. centrarchi* izolatları ile %0,0-0,8, *Mesophorodiplostomum pricei* izolatı ile ise %0,8 nükleotid farklılığı göstermiş olup, ITS-2 filogenetik ağacında söz konusu izolatlar ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür (posterior olasılık 0,74). Dolayısıyla, ITS filogenesi dikkate alındığında, *Posthodiplostomum* ve *Mesophorodiplostomum*'un sinonim olarak adlandırılabilirliği belirtilmiştir (López-Hernández ve ark. 2018). Yine GenBank veri tabanında *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtlı bazı izolatlar (FJ477219; HM064857) *Ornithodiplostomum* sp. ve *O. scardinii* izolatları (FJ477208; HM06473; KX931425) ile %16,7-22,4 nükleotid farklılığı göstererek, mt-COI filogenetik ağacında söz konusu izolatlar ile aynı grupta yer almıştır (posterior olasılık 0,68). Filogenetik analizler ışığında *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan türler ile diğer yakın cinslerde bulunan trematodlar arasındaki filogenetik ilişkiler daha detaylı bir şekilde araştırılarak tür içi ve türler arası nükleotid farklılıkların kabul edilebilir aralığının belirlenmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Nitekim López-Hernández ve ark. (2018) daha önce GenBank veri tabanına *Posthodiplostomum* olarak kayıtları yapılmış

olan bazı izolatların hatalı olabileceğini, yine bu cins içerisinde ya da *Mesophorodiplostomum* cinsi içerisinde yer alan bazı izolatların tekrardan tanımlanması gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Sonuç olarak, bu çalışma ile *P. cuticola* izolatlarının Türkiye'de ilk kez moleküler ve filogenetik karakterizasyonları ortaya konulmuştur. Türkiye'de *Posthodiplostomum* türlerinin tür ve genetik çeşitliliğinin, birinci ara konak ve son konaklarının ve bu konaklardaki dağılımlarının belirlenmesi için daha geniş bir coğrafyada moleküler ve morfolojik yöntemlerin birlikte kullanıldığı çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

➤ Bu çalışma, TCD-2016-6795 proje koduyla Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Boone EC, Laursen JR, Colombo RE, Meiners SJ, Romani MF, Keeney DB.** Infection patterns and molecular data reveal host and tissue specificity of *Posthodiplostomum* species in centrarchid hosts. *Parasitology*. 2018; 145(11):1458-1468.
- Dönges J.** Der Lebenszyklus von *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda, Diplostomatidae). *Z Parasitenk*. 1964; 24(2):169-248.
- Güven A, Öztürk T.** Metazoan parasite faunas of three *Gobioid* species (Actinopterygii: Gobiidae) inhabiting the lower Kızılırmak Delta in Samsun: A comparative study. *Türkiye Parazit Derg*. 2018; 42: 33-38.
- Hoogendoorn C, Smit NJ, Kudlai O.** Molecular and morphological characterisation of four diplostomid metacercariae infecting *Tilapia sparmanii* (Perciformes: Cichlidae) in the North West Province, South Africa. *Parasitol Res*. 2019; 118: 1403-1416.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001; 17:754-755.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28:1647-1649.
- Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16:111-120.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7):1870-1874.
- Kvach Y, Jurajda P, Bryjová A, Trichkova T, Ribeiro F, Pňikrylová I, Ondračková M.** European distribution for metacercariae of the North American digenean *Posthodiplostomum cf. minimum centrarchi* (Strigeiformes: Diplostomidae). *Parasitol Int*. 2017; 66:635-642.

- Lane RL, Morris, JE. Biology, prevention and effects of common grubs (digenetic trematodes) in freshwater fish. Tech. Bull. 2000; 115: 1-6.
- Locke SA, McLaughlin JD, Marcogliese DJ. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. Mol Ecol. 2010; 19: 2813-2827.
- López-Hernández D, Locke SA, de Melo AL, Rabelo ÉML, Pinto HA. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. Infect Genet Evol 2018; 63:95-103.
- Moszczyńska A, Locke S, McLaughlin J, Marcogliese D, Crease T. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. Mol Ecol Resour. 2009; 9:75-82.
- Nguyen TC, Li YC, Makouloutou P, Jimenez LA, Sato H. *Posthodiplostomum* sp. metacercariae in the trunk muscle of northern snakeheads (*Channa argus*) from the Fushinogawa River, Yamaguchi, Japan. J Vet Med Sci. 2012; 74: 1367-1372.
- Niewiadomska K. Superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, In: Keys to the Trematoda, Ed; Gibson DI, Jones A, Bray RA, 1<sup>th</sup> Ed., CAB International and The Natural History Museum, UK. 2002; pp. 159-242.
- Ondračková M, Dávidová M, Gelnar M, Jurajda P. Susceptibility of *Prussian carp* infected by metacercariae of *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) to fish predation. Ecol Res. 2006; 21: 526-529.
- Öztürk MO. Eber Gölü (Afyon)'ndeki Sazan (*Cyprinus carpio* L.)'ların metazoon parazitleri üzerine bir araştırma. Türkiye Parazitol Derg. 2005; 29(3):204-210.
- Poulin R. Uneven distribution of cryptic diversity among higher taxa of parasitic worms. Biol Lett 2011; 7: 241-244.
- Skov J, Kania PW, Dalsgaard A, Jørgensen TR, Buchmann K. Life cycle stages of heterophyid trematodes in Vietnamese freshwater fishes traced by molecular and morphometric methods. Vet Parasitol. 2009; 160:66-75.
- Stoyanov B, Georgieva S, Pankov P, Kudlai O, Kostadinova A, Georgiev BB. Morphology and molecules reveal the alien *Posthodiplostomum centrarchi* Hoffman, 1958 as the third species of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomidae) in Europe. Syst Parasitol. 2017; 94:1-20.
- Uzunay E, Soylu E. Sapanca Gölü'nde yaşayan Sazan (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) ve Karabalık (*Vimba vimba* Linnaeus, 1758)'ın metazoan parazitleri. Türkiye Parazitol Derg. 2006; 30(2):141-150.
- Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abbott CL. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). Mol Ecol Resour. 2015; 15:945-952.