

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Saccharomyces cerevisiae DNA BARKODUNUN
BELİRLENMESİ VE VERİ TABANININ
OLUŞTURULMASI

MİTHAT KURBAN

Hacettepe Üniversitesi
Doktora Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

***Saccharomyces cerevisiae* DNA BARKODUNUN
BELİRLENMESİ VE VERİ TABANININ
OLUŞTURULMASI**

**DETERMINATION OF THE *Saccharomyces cerevisiae*
DNA BARCODE AND CREATING A DATA BASE**

MİTHAT KURBAN

DOÇ. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliğı Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

MİTHAT KURBAN'ın hazırladığı "*Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

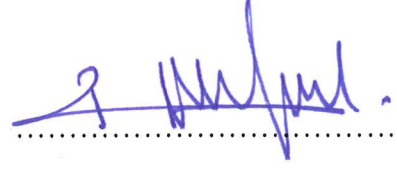
Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Başkan



Doç. Dr. Remziye YILMAZ

Danışman



Prof. Dr. Halil VURAL

Üye



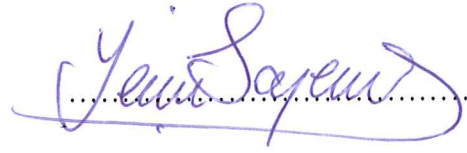
Prof. Dr. Hüseyin ERTEN

Üye



Doç. Dr. Yeşim SOYER

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak/...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Değerli ailem ve iş arkadaşlarım'a,

ETİK

Hacettepe 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,
 - bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.

20/06/2019

Mithat KURBAN

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan doktora tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20./06./2019

MİTHAT KURBAN

ÖZET

***Saccharomyces cerevisiae* DNA BARKODUNUN BELİRLENMESİ VE VERİ TABANININ OLUŞTURULMASI**

Mithat KURBAN

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye YILMAZ

Haziran 2019, 279 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında canlıların tanımlanmasında kullanılan DNA barkodlama teknolojisinden faydalanılarak birçok geleneksel ürün üretiminde, biyoteknolojik proseslerde ve birçok araştırmada kullanılan model bir mikroorganizma olan *S. cerevisiae* türünün izolasyonu, tanımlanması ve DNA barkodlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında; İç Anadolu Bölgesi'nin farklı şehirlerindeki üzüm bağlarından toprak ve üzüm örnekleri toplanarak maya izolasyonları yapılmıştır. Ayrıca ulusal ve uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarından referans olarak kullanılacak *S. cerevisiae* suşları ((*S. cerevisiae* ATCC® 9763™, *S. cerevisiae* ATCC® 6328™, *S. cerevisiae* 08022 RSK (Refik Saydam Külür Koleksiyonu)), ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan ve ulusal üniversitelerin araştırma laboratuvarlarından çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* suşları temin edilmiştir. Sağlanan tüm bu suşların morfolojik (makroskobik, mikroskobik), biyokimyasal testlerle tanımlanmaları yapılmış ve karşılaştırmalı olarak evrensel DNA barkod dizileri araştırılıp ortaya konmuştur. Bu amaçla toplam 287 izolasyon elde edilmiş bunların 229 tanesi makroskobik ve mikroskobik tanımlamalara göre *S. cerevisiae* türünün karakteristiklerine uygun bulunmuştur.

Elde edilen bu suşlar üzerinde ileri tanımlama olarak Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS,

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-Of-Flight Mass Spectrometry) ile cins düzeyinde klasik doğrulama çalışmalarına ek olarak, tür düzeyinde ileri tanımlamalar gerçekleştirilmiştir. MALDI TOF MS ve moleküler tanımlamalar dikkate alındığında 229 izolasyondan 152 adet izolasyon *S. cerevisiae* türü olarak tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların tanımlama aşaması sonrasında literatür taramaları doğrultusunda DNA barkodlamada kullanılacak olan gen bölgelerinin tespiti için ITS “Internal Transcription Spacer”, LSU “Long Sub Unit”, SSU “Short Sub Unit” ve/veya RPB1 “RNA polymerase subunit1”, RPB2 “RNA polymerase subunit2”, TOP1 “DNA Topoisomerase” gen bölgeleri ile ön PCR “polimerase chain reaction” denemeleri yapılmıştır. Yapılan ön denemelerde uygun bulunan gen bölgelerinin (ITS, LSU, RPB2) DNA barkod yapılarının ortaya konulmasında kullanılmasına karar verilmiştir. Ön tanımlamaları yapılmış olan 2016-2017 izolasyonlarından 120 izolatın DNA ekstraksiyonları yapılmış PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiş ve DNA barkodlarının ortaya konulması araştırmasına bu 120 izolat üzerinden devam edilmiştir.

İzolatların PCR amplifikasyonlarının jel elektroforez ayrımlarında ITS gen bölgesinde taksonomik gruplara bağlı ayrımlar görüntülenebilirken, LSU gen bölgesinde bütün izolasyonlar için tek büyüklükte bant ayrımı gözlemlenmiş takson ayrımları jel görüntüleri üzerinden yapılamamıştır. RPB2 gen bölgesi amplifikasyonları jel ayrımında ise her bir izolatta çoklu bant oluşumu gözlemlendiğinden takson ayrımları jel görüntüleri üzerinden yapılamamıştır. RPB2 gen bölgesinde gözlemlenen bu çoklu bant oluşumu sorununun jelden ekstraksiyon yapılarak sekans analizi yapılması sonucu ile aşılabileceği belirlenmiştir.

DNA ekstraksiyonu ve ilgili gen bölgeleri için PCR amplifikasyonları yapılan suşların Sanger Sekanslama yöntemi ile dizi analizleri yapılmıştır. ITS gen bölgesi için ortalama 820 baz çifti, LSU gen bölgesi için ortalama 1100 baz çifti, RPB2 gen bölgesi için ortalama 1200 baz çifti içeren sekans verileri DNA barkod tabanlı tanımlamada kullanılmıştır. Suşlardan elde edilen dizi ham verilerinin temizlenmesi FinchTv (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) ile yapılmış ve ham veriler ileri veri analizine hazırlanması amacıyla BioEdit programı ile gerekli ön işlemlere tabi tutulmuştur (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Ardından elde edilen veriler üzerinden NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile karşılaştırmaya dayalı moleküler düzeyde tanımlamalar yapılmıştır. Yapılan tüm tanımlamalar göz önünde bulundurularak, ClustalW programı (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) ile izole edilen ve tanımlanan türler arası ve tür içi ilişkiyi ortaya çıkaran filogenetik

ağaçlar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu filogenetik ağaçlar yardımıyla *S. cerevisiae* türlerini en iyi tanımlayan barkod bölgeleri belirlenmeye çalışılmıştır. Barkod yapısı olarak kullanılacak motif bölgelerinin belirleme amacıyla MEME-suit programı (<http://meme-suite.org/>) kullanılmıştır. Elde edilen sekans verileri gen bölgeleri izolasyon sekansları ve barkod sekansları olarak ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır.

Değerlendirmeler sonucunda *S.cerevisiae* türleri için RPB2 gen bölgesinin izolasyon sekanslarının ayırım başarısı % 98.24, ITS gen bölgesi izolasyon sekanslarının ayırım başarısı % 95.83, LSU gen bölgesi izolasyon sekanslarının ayırım başarısı % 92.3 ve birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB) gen bölgesi izolasyon sekanslarının ayırım başarısı ise % 95.16 olarak belirlenmiştir. Barkod sekans yapıları kullanılarak ortaya konan filogenetik ayırımıda *S.cerevisiae* türleri için RPB2 gen bölgesi barkod yapılarının ayırım başarısının % 100, LSU gen bölgesi barkod yapılarının ayırım başarısı % 96.153, ITS gen bölgesi barkod yapılarının ayırım başarısı % 95.83 ve birleştirilmiş gen bölgeleri (ITS_LSU_RPB2) barkod yapılarının ayırım başarısı ise % 95.45 olarak belirlenmiştir.

Gen bölgelerinin ayrışma katsayıları, izolasyon sekansları ve barkod yapıları için sırasıyla (ITS, LSU, RPB2, ITS_LSU_RPB2) 0.848 ± 0.01 , 0.157 ± 0.002 , 0.427 ± 0.011 , 0.412 ± 0.008 ve $0.873\pm 0,01$, 0.725 ± 0.017 , 0.7636 ± 0.0136 , 0.412 ± 0.008 olarak belirlenmiştir. Barkod sekansı kullanımı ITS bölgesi için büyük bir ayırım gücü farklılığı yaratmazken, LSU ve RPB2 gen bölgeleri için etkili ayırım gücü farklılığı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *S. cerevisiae* maya türünün tanımlanmasında ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerinin başarılı bir şekilde kullanılabilceği ve MEME-suit programı ile elde edilen barkod yapılarının bu ayırımı daha başarılı sağlayabildiği gözlemlenmiştir. Fakat elde edilen barkod yapılarının *S. cerevisiae* türü için izolasyon kaynağı ve yılı yönünden ayırım yapma konusunda anlamlı homojen bir ayırım gerçekleştirmediği belirlenmiştir.

İzolasyonlarla ilgi elde edilen tüm araştırma bilgileri bir veritabanında (“www.dnabarcodfoodomics.com”) kayıt altına alınmıştır. Sonuç olarak DNA barkod bilgilerinin oluşturulması, kayıt altına alınması ve böylece bu konudaki bilgiye hızlı erişim sağlanması, önemli bir uluslararası maya üreticisi olan ülkemizde bu alanda rekabet edebilme gücüne katkı sağlaması yönünde bir katkı sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Saccharomyces cerevisiae*, DNA barkodlama, biyoinformatik, filogenetik

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE *Saccharomyces cerevisiae* DNA BARCODE AND CREATING A DATA BASE

MİTHAT KURBAN

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Associate Prof. Remziye YILMAZ

June 2019, 279 pages

The aim of this project was to isolate and identify DNA barcodes of *S. cerevisiae*, which a model microorganism used in many traditional products, biotechnological processes and many researches, by using DNA barcoding technology used in the identification of living things. In this study; soil and grape samples were collected from the vineyards in different cities of Central Anatolia and the isolations were made. Also strains of *S. cerevisiae* which were used for barcoding research obtained from national and international yeast producers and from research laboratories of national universities, the strains which decided to be used as a control obtained from national and international culture collection organizations, ((*S. cerevisiae* ATCC® 9763™, *S. cerevisiae* ATCC®). 6328™, *S. cerevisiae* RSK08022 (Refik Saydam Culture Collection)), and comparatively analysis of universal DNA barcodes was performed. All these strains were identified by morphological (macroscopic, microscopic) and biochemical tests, the universal DNA barcode sequences for these strains comparatively analyzed and revealed. For this purpose, 287 isolates were obtained and 229 of them were found to be suitable for the characteristics of *S. cerevisiae* according to macroscopic and microscopic definitions.

To increase the identification level of species to the strain level in addition to classical validation studies on these strains the MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser

Desorption / Ionization, Time-Of-Flight Mass Spectrometry) method has also used. When MALDI TOF MS and molecular definitions were taken into consideration, 152 isolations were determined as *S. cerevisiae* species.

Following the identification of the isolations obtained, for choosing gene regions to be used in DNA barcoding research, according to the literature ITS “Internal Transcription Spacer” , LSU “Long Sub Unit”, SSU “Short Sub Unit” RPB1 “RNA polymerase subunit1”, RPB2 “RNA polymerase subunit2”, TOP1 “DNA Topoisomerase gene regions” pre-PCR “polymerase chain reaction” experiments were performed. According to the preliminary experiments, it was decided to use the appropriate gene regions (ITS, LSU, RPB2) to identify effective DNA barcode structures. PCR amplifications were performed on these 120 isolates of 2016-2017 years, whose DNA isolation and pre-definition have already done and DNA barcodes were investigated on these 120 isolates. Gel electrophoresis differentiations for PCR amplifications of isolates in the ITS gene region can be seen by due to taxonomic groups, while for the LSU gene region, single size band separation was observed for all isolations so separations could not be seen by due to taxonomic groups. Since for the amplification of RPB2 gene region gel separation that taxon distinctions could not be made on the gel images, because multiple band formation was observed for each isolate. This multi-band formation problem observed in the RPB2 gene region was determined that could be effectively overcome by extraction from the gel and doing sequence analysis.

Sequence analysis was performed by Sanger Sequencing method on isolations whose DNA extraction and related gene regions PCR amplification has been done already. An average of 820 base pairs for the ITS gene region, 1100 base pairs for the LSU gene region, and 1200 base pairs for the RPB2 gene region were used for DNA barcode-based identification. The raw data obtained from the strains were cleaned with FinchTv (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) and the raw data were subjected to necessary pre-treatment with BioEdit program for the preparation of advanced data analysis ([http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit / bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). Then, molecular level based comparison were made with NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) on data. Considering all the definitions made, phylogenetic trees have been formed which reveal the inter-species and intra-species relationship by ClustalW program (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

With the help of these created phylogenetic trees, it was tried to determine the barcode regions that best describe *S. cerevisiae* species. The MEME-suit program ([v](http://meme-</p></div><div data-bbox=)

suite.org/) was used to determine the motif regions to be used as barcode structure. The resulting sequence data were evaluated separately as isolation gene regions sequences and barcode sequences.

As a result of the evaluations, according the phylogenetic distinction the success of the isolation sequences of the RPB2 gene region for *S.cerevisiae* species has been determined as % 98.24, success of the the ITS gene region determined as % 95.83, success of the the LSU gene region determined as % 92.3, and success of the unified region (ITS_LSU_RPB2) determined as % 95.16.

In the phylogenetic distinction using barcode sequence structures, the succession of RPB2 gene region barcode structures for *S. cerevisiae* species is % 100, the separation success of the barcode structures of the ITS gene region is % 95.83, the separation success of the barcode structures of the LSU gene region is % 96.153, and the separation success of the barcode structures of the unified region (ITS_LSU_RPB2) determined as % 95.45.

The dissociation coefficients of gene regions for isolation sequences and barcode sequence are respectively (ITS, LSU, RPB, ITS_LSU_RPB2) 0.848 ± 0.01 , 0.157 ± 0.002 , 0.427 ± 0.011 , 0.412 ± 0.008 and 0.873 ± 0.01 , 0.725 ± 0.017 , 0.7636 ± 0.0136 , 0.412 ± 0.008 . While the use of the barcode sequence did not create a large difference in discrimination power for the ITS region, it was observed that the difference between the LSU and RPB2 gene regions was effective. As a result, it was observed that the ITS, LSU and RPB2 gene regions could be used successfully in the identification of *S. cerevisiae* yeast species and the barcode structures obtained by the MEME-suite program could provide this distinction more successfully. However, it was determined that the obtained barcode structures did not make a meaningful homogenous distinction in terms of isolation source and year for *S. cerevisiae* species.

All research information obtained from the isolations is recorded in a database (“www.dnabarcodefoodomics.com”). As a result, it is thought that the creation and recording of DNA barcode information and thus providing quick access to the information in this field has contributed to the competitiveness for our country which is an important international yeast producer.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, DNA barcoding, bioinformatics, phylogenetic

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın yürütülmesi ve yazımı aşamalarında benden hem maddi hem manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman çalışmalarımda bana yol gösterici olan ve teşvikleriyle beni birer adım öne taşıyan hep daha iyiye ulaşmamı arzu eden saygıdeğer hocam ve danışmanım Doç. Dr. Remziye YILMAZ'a

Ayrıca tez jürimde yer almış olan ve her zaman bana moral motivasyon ve yönlendirme sağlamış olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Halil VURAL, ve Doç. Dr. Yeşim SOYER'e

Çalışmaların yürütülmesinde maya temini konusunda destek sağlayan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK ve Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Prof. Dr. Hüseyin ERTEN'e,

Doktora tez çalışmam için yaptığım araştırmalarda gerekli maddi desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP-FHD-2017-14645), çalışmalarımın yürütülmesinde laboratuvar ve araç gereçlerin kullanılmasında bizlere yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne,

Desteğiyle yanımda olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Dilay Kütük AYHAN'a, MALDI-TOF analizlerinin yürütülmesinde yardımcı olan yüksek mühendis Özlem IŞIK'a, bölüm laboratuvar işlemlerinde yardımcı olan uzman Meltem YILDIRIM'a

Projemize verdiği teknik destekten dolayı Dr. Humen CEBBARİ ve BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti.'ne,

Projemize verdiği teknik destekten dolayı NANObiz® TEKNOLOJİ A.Ş.'ye teşekkürlerimi sunarım.

Mithat KURBAN

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR..... | vii |
| İÇİNDEKİLER..... | viii |
| ÇİZELGELER..... | xii |
| ŞEKİLLER | xv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xix |
| 1 GİRİŞ..... | 1 |
| 2 GENEL BİLGİLER | 6 |
| 2.1. DNA Barkodlama..... | 6 |
| 2.2. Biyoçeşitlilik, Filogenetik ve DNA Barkodlama | 9 |
| 2.3. DNA Barkodlama ve Biyoçeşitlilik Değerlendirmesi..... | 10 |
| 2.4. Canlılar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı | 11 |
| 2.4.1. Hayvanlar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı | 11 |
| 2.4.2. Bitkiler Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı..... | 12 |
| 2.4.3. Mantarlar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı | 14 |
| 2.4.4. Algler ve Protistalar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı..... | 15 |
| 2.5. DNA Barkodlamada Filogenetik ve İstatistik Tabanlı Sınıflandırma Yöntemleri..... | 16 |
| 2.6. DNA Barkodlama Konusunda Çalışan Organizasyonlar | 17 |
| 2.7. DNA Barkodlamasının Avantajları ve Uygulamaları | 19 |
| 2.8. DNA Barkodlama ve Koruma..... | 21 |
| 2.9. DNA Barkodlama Biyogüvenlik ve Halk Sağlığı | 21 |
| 2.10. DNA Barkodunun Eksiklikleri ve Sınırlamaları..... | 24 |
| 2.11. <i>S. cerevisiae</i> | 26 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 2.11.1. | <i>S. cerevisiae</i> Hücre Yapısı ve Metabolizması | 28 |
| 2.11.2. | <i>S.cerevisiae</i> Hücre Döngüsü | 31 |
| 2.11.3. | <i>S. cerevisiae</i> Hücre Genetik Yapısı ve Fonksiyonu..... | 32 |
| 2.11.4. | <i>S. cerevisiae</i> Hücrelerinin Morfolojik ve Fizyolojik Karakterleri | 34 |
| 2.12. | Dünyada ve Türkiye’de Kültür Koleksiyonları | 35 |
| 2.13.1. | PCR Kullanımı | 37 |
| 2.13.2. | Primerler..... | 38 |
| 2.13.3. | Farklı Amaçlara Yönelik Kullanılan Özel PCR Türleri..... | 39 |
| 2.14. | DNA Sekanslama..... | 43 |
| 2.15. | Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) | 45 |
| 2.16. | Funguslarda DNA Barkodlama | 50 |
| 2.17. | Veri Tabanları Yönetimi | 53 |
| 2.18. | Çalışmanın Amacı..... | 59 |
| 3. | MATERYAL ve YÖNTEM..... | 61 |
| 3.1. | Materyal | 61 |
| 3.1.1. | Ulusal ve Uluslararası Maya Üreticisi Firmalardan <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 1) | 61 |
| 3.1.2. | Ulusal ve Uluslararası Kültür Koleksiyonu Kuruluşlarından <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 2) | 62 |
| 3.1.3. | Ulusal Üniversite Araştırmacılarından <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 3)..... | 62 |
| 3.1.4. | İç Anadolu Bölgesi Şehirleri Üzüm Bağlarından Toplanan Örneklerden <i>S. cerevisiae</i> Suşlarının İzole Edilmesi (Grup 4) | 623 |
| 3.2. | Metot..... | 67 |
| 3.2.1. | Mayaların İzolasyonu | 67 |
| 3.2.2. | Suşların Klasik Yöntemlerle Tanımlaması | 68 |
| 3.2.2.1. | Makroskobik Morfolojilerin Belirlenmesi | 68 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2.2. Mikroskopik Morfolojilerin Belirlenmesi | 68 |
| 3.2.2.3. Biyokimyasal Testler | 68 |
| 3.2.2.4. İzole Edilen Suşların Kodlanması | 70 |
| 3.3. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Metodu ile Tanımlama..... | 71 |
| 3.3.1. MALDI-TOF MS Analizleri İçin Örnek Hazırlama..... | 71 |
| 3.3.2. MALDI-TOF MS Analizi..... | 71 |
| 3.3.3. MALDI-TOF MS Ölçümlerinin Veri Analizi | 72 |
| 3.4. PCR Temelli DNA Barkodlama Analizi | 72 |
| 3.4.1. DNA İzolasyonu | 73 |
| 3.4.2. PCR Reaksiyonları..... | 74 |
| 3.4.3. PCR Ürünleri İçin Jel Elektroforez Görüntüleme | 77 |
| 3.4.4. Jelden DNA Ürünlerinin Saflaştırılması..... | 77 |
| 3.5. DNA Dizi Analizi..... | 78 |
| 3.6. Veri Analizi | 80 |
| 3.6.1. FinchTv programı kullanılarak Sekansların Okunması..... | 80 |
| 3.6.2. BioEdit Programının ile Sekans Verilerinin Düzenlenmesi | 81 |
| 3.6.3. BLAST ile Sekans Bilgilerinin Taranması | 81 |
| 3.6.4. CLUSTALW ile Filogenetik İlişki Ağaçlarının Oluşturulması | 81 |
| 3.6.5. MEME-Suit Programı ile Barkod Olarak Kullanılabilecek Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve Filogenetik İlişki Ağaçlarının Oluşturulması..... | 82 |
| 3.6.6. Verilerin Kayıt Altına Alınması..... | 84 |
| 3.7. Kimyasal ve Malzemeler..... | 86 |
| 3.8. İstatiksel Analiz | 86 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 87 |
| 4.1. İzolasyon ve Saf Kültürün Eldesi | 87 |
| 4.2. İzolasyonu Yapılan Suşların Makroskopik-Mikroskopik Değerlendirilmesi ve Uygun Şartlarda YGC Besiyerinde Gelişim Durumları | 88 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3. | İzolasyonu Yapılan Suşların Biyokimyasal Test Değerlendirmesi..... | 116 |
| 4.4. | Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu / İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Analiz Sonuçları | 129 |
| 4.5. | PCR Temelli DNA Barkodlama Analiz Sonuçları | 131 |
| 4.5.1. | DNA Barkod Gen Bölgelerinin Seçimi İçin Ön Deneme | 131 |
| 4.5.2. | Ön Denemeler İçin DNA Ekstraksiyonu ve PCR | 132 |
| 4.5.3. | Ön Denemeler İçin PCR Reaksiyonlarının Uygulanması ve Jel Elektroforez Sonuçları..... | 132 |
| 4.5.4. | Klasik Yöntemlerle Ön Tanımlamaları Yapılan İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu..... | 135 |
| 4.5.5. | Klasik Ön Tanımlamalar ile <i>S. cerevisiae</i> Olarak Tanımlanan 120 İzolata ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerine spesifik primerler ile PCR Reaksiyonlarının Uygulanması..... | 135 |
| 4.6. | DNA Barkodlamada Gen Bölgeleri Sekans Verilerinin İşlenmesi, NCBI Taramaları..... | 144 |
| 4.6.1. | Gen Bölgeleri Sekans Verilerinin İşlenmesi, NCBI Taramaları ve MALDI-TOF Değerlendirmeleri | 145 |
| 4.7. | Elde Edilen Sonuçların Kayıt Altına Alınması | 231 |
| 5. | SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 234 |
| | KAYNAKLAR | 240 |
| | EK A1 | 260 |
| | EK A2 | 261 |
| | EK A3 | 269 |
| | EK-B | 276 |
| | ÖZGEÇMİŞ | 302 |

ÇİZELGELER

| | | |
|---------------------|--|----|
| Çizelge 2.1. | Bitkilerde, hayvanlarda, mantarlarda, alglerde ve protistlerde DNA barkodlamada yaygın kullanılan birincil moleküler markörler [60]..... | 14 |
| Çizelge 2.2. | <i>S. cerevisiae</i> taksonomik sınıflandırılması [137] | 27 |
| Çizelge 2.3. | <i>S. cerevisiae</i> 'nin klasik tanımlama yöntemleri (A), gıda endüstrisindeki yaygın kullanım alanları (B) [137]. | 30 |
| Çizelge 2.4. | Funguslarda DNA barkodlamada yaygın kullanım yeri bulan gen bölgeleri ve primerler [229-234]..... | 51 |
| Çizelge 3.1. | Çalışmada kullanılan örnekleme planı | 63 |
| Çizelge 3.2. | İç Anadolu Bölgesi'nden üzüm ve toprak örneklerinin toplandığı şehir bölgeleri ve GPS konumları | 63 |
| Çizelge 3.3. | Toplanan örnekleri tanımlamada kullanılan örnek kodlama planı | 66 |
| Çizelge 3.4. | Biyokimyasal test ortam kompozisyonları | 69 |
| Çizelge 3.5. | DNA barkodlama çalışmasında kullanılan gen bölgelerine özgü primerler..... | 74 |
| Çizelge 3.6. | DNA barkodlama çalışmasında kullanılan gen bölgelerine özgü primerlerin teknik özellikleri | 75 |
| Çizelge 3.7. | PCR reaksiyon karışımı | 76 |
| Çizelge 3.8. | Gen bölgeleri dikkate alınarak gerçekleştirilen PCR programları..... | 76 |
| Çizelge 3.9. | DNA barkodlaması yapılan izolasyonlar için kullanılan örnek doldurulmamış kayıt bilgi formu..... | 76 |
| Çizelge 4.1. | Grup 1 - ticari kaynaklardan elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları..... | 88 |
| Çizelge 4.2. | Grup 2 - farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları | 90 |
| Çizelge 4.3. | Grup 3 - ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları | 90 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Çizelge 4.4. | Grup 4 - 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları | 95 |
| Çizelge 4.5. | Grup 4-2017 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları | 100 |
| Çizelge 4.6. | Grup 4-2018 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları | 108 |
| Çizelge 4.7. | YGC besiyerinde gelişim gösteren farklı makroskopik gelişim tipleri... | 114 |
| Çizelge 4.8. | Nitrat indirgenme testine bağlı olarak biyokimyasal değerlendirmesi yapılmamış izolasyonlar..... | 116 |
| Çizelge 4.9. | Grup 1 - ticari kaynaklardan elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi | 116 |
| Çizelge 4.10. | Grup 2 - farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi..... | 117 |
| Çizelge 4.11. | Grup 3 - ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi..... | 118 |
| Çizelge 4.12. | Grup 4 - 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi | 120 |
| Çizelge 4.13. | Grup 4 - 2017 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi | 121 |
| Çizelge 4.14. | Grup 4 - 2018 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi | 123 |
| Çizelge 4.15. | Klasik tanımlama yöntemlerine bağlı olarak <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolasyonların kodları, kaynakları ve gruplara dağılımları... | 127 |
| Çizelge 4.16. | Farklı gen bölgeleri için PCR ön denemelerin gerçekleştirildiği suşların sonuç değerleri | 132 |
| Çizelge 4.17. | 120 izolat üzerinde gerçekleştirilen DNA izolasyon değerlerinin gruplara göre ortalamaları | 132 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Çizelge 4.18. | Tüm tanımlama testleri dikkate alındığında yıllara göre <i>S.cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolasyon sayıları | 132 |
| Çizelge 4.19. | Gen bölgeleri sekans verileri NCBI sorgulama sonuçlarına ve MALDI-TOF MS sonuçlarına göre <i>S. cerevisiae</i> olarak tespit edilen izolatlar... | 146 |
| Çizelge 4.20. | Gen bölgeleri sekans verileri NCBI sorgulama sonuçları ve MALDI-TOF MS sonuçlarına göre <i>S. cerevisiae</i> olarak tespit edilmeyen izolatlar | 148 |
| Çizelge 4.21. | 2018 yılı ulusal üniversite araştırmacıları ve İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan örneklerden izole edilen ve MALDI-TOF MS analizlerine göre <i>S. cerevisiae</i> olarak tespit edilen izolatlar..... | 150 |
| Çizelge 4.22. | 2018 yılı ulusal üniversite araştırmacıları ve İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan örneklerden izole edilen MALDI-TOF MS analizlerine göre <i>S. cerevisiae</i> olarak tespit edilmeyen izolatlar | 152 |
| Çizelge 4.23. | Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın ITS gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı..... | 154 |
| Çizelge 4.24. | Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın LSU gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı | 154 |
| Çizelge 4.25. | Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın RPB2 gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı | 155 |
| Çizelge 4.26. | İzolatların tamamının MALDI-TOF MS analiz sonuçları doğrultusunda gruplara dağılımı..... | 155 |
| Çizelge 4.27. | Elde edilen 120 izolasyonun moleküler ve MALDI-TOF MS tanımlamaları sonucunda yer aldıkları taksonomik sınıflar | 157 |
| Çizelge 4.28. | Elde edilen 120 izolasyonun dağılım grafiklerinde kullanılan kodlamaları..... | 159 |
| Çizelge 4.29. | DNA barkodlamada kullanılan izolasyonların izolasyon kaynakları ve yıllarına göre dağılımları | 162 |
| Çizelge 4.30. | DNA barkodlamada kullanılan <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolasyonların izolasyon kaynakları ve yıllarına göre dağılımları..... | 162 |
| Çizelge 4.31. | Gen bölgeleri ölçüm başarıları | 222 |
| Çizelge 4.32. | İzolasyon sekanslarının takson ayırım başarı yüzdeleri | 223 |
| Çizelge 4.33. | Barkod sekanslarının takson ayırım başarı yüzdeleri | 223 |

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** *Saccharomyces cerevisiae* (A) hücre kümesinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü. (B) hücreye ait çekirdek, mitokondri ve kalın hücre duvarını gösteren, bir maya hücresinin enine kesitinin transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü [141].....31
- Şekil 2.2.** MALDI-TOF MS'de iş akışını gösteren şematik diyagram..... 47
- Şekil 2.3.** WCDM veritabanının çalışma sistemini özetleyen iş akış şeması. 47
- Şekil 2.4.** CCINFO tarafından kullanılan veri madenciliği akış şeması 47
- Şekil 3.1.** İç Anadolu Bölgesi şehirlerinden toplanan örneklerin toplandığı noktaları gösteren GPS konumları 65
- Şekil 3.2.** Bir yetiştiricilik arazi bölgesinde rastgele üç farklı noktadan örnekleme. 65
- Şekil 3.3.** Örneklerin taşınmasında kullanılan araç içi soğutma kabı 66
- Şekil 3.4.** *S. cerevisiae* suşlarını tanımlamada kullanılan biyokimyasal testler ve ayırım ağacı 69
- Şekil 3.5.** Suşların kayıt altında tutulmasında kullanılacak kodlama sistemi 70
- Şekil 3.6.** PCR temelli barkodlama analizleri sürecini özetleyen iş akış şeması 80
- Şekil 3.7.** Veri analizi ve DNA barkodu belirlemede izlenen yolu gösteren iş akış şeması 80
- Şekil 4.1.** Elde edilen izolasyonlardan farklı tipteki mikroskobik morfoloji görüntüleri.....115
- Şekil 4.2.** Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004), üzerinde denenen gen bölgelerinin (ITS, LSU,) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi..... 133
- Şekil 4.3.** Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004) üzerinde denenen gen bölgelerinin (RPB2, TOP1,) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi 134
- Şekil 4.4.** Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004) üzerinde denenen gen

| | | |
|--------------------|---|-----|
| | bölgelerinin (SSU, RPB1) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi | 134 |
| Şekil 4.5. | ITS, LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 136 |
| Şekil 4.6. | ITS gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 137 |
| Şekil 4.7. | ITS ve LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), | 138 |
| Şekil 4.8. | LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 140 |
| Şekil 4.9. | LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 141 |
| Şekil 4.10. | RPB2 gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 142 |
| Şekil 4.11. | RPB2 gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),..... | 143 |
| Şekil 4.12. | Kullanılan 120 izolatın ITS gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu..... | 165 |
| Şekil 4.13. | Kullanılan 120 izolatın ITS gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 167 |
| Şekil 4.14. | Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu..... | 169 |
| Şekil 4.15. | Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği..... | 171 |
| Şekil 4.16. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların ITS gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu | 173 |
| Şekil 4.17. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların ITS gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 175 |
| Şekil 4.18. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu | 176 |
| Şekil 4.19. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 178 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Şekil 4.20. | Kullanılan 120 izolatin LSU gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu | 180 |
| Şekil 4.21. | Kullanılan 120 izolatin LSU gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği..... | 182 |
| Şekil 4.22. | Kullanılan 120 izolatin MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu | 184 |
| Şekil 4.23. | Kullanılan 120 izolatin MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği..... | 186 |
| Şekil 4.24. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların LSU gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu..... | 188 |
| Şekil 4.25. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların LSU gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 190 |
| Şekil 4.26. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşum..... | 191 |
| Şekil 4.27. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 193 |
| Şekil 4.28. | Kullanılan 120 izolatin RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu..... | 194 |
| Şekil 4.29. | Kullanılan 120 izolatin RPB2 gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 196 |
| Şekil 4.30. | Kullanılan 120 izolatin MEME-suit kullanılarak elde edilen barkodları ile RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu | 198 |
| Şekil 4.31. | Kullanılan 120 izolatin MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği..... | 200 |
| Şekil 4.32. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu | 202 |
| Şekil 4.33. | <i>S. cerevisiae</i> olarak tanımlanan izolatların RPB2 gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği | 204 |

- Şekil 4.34.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu.....205
- Şekil 4.35.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği207
- Şekil 4.36.** Kullanılan 120 izolatın birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu.....208
- Şekil 4.37.** Kullanılan 120 izolatın birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği210
- Şekil 4.38.** Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak elde edilen barkodları ile birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu.....212
- Şekil 4.39.** Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği214
- Şekil 4.40.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatın birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu216
- Şekil 4.41.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği.....218
- Şekil 4.42.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu219
- Şekil 4.43.** *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|-------------------|------------------|
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| ark | Arkadaşları |
| bç | Baz çifti |
| Cl | Klor |
| dk | Dakika |
| kb | Kilobaz |
| L | Litre |
| M | Molar |
| m | Metre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| MgCl ₂ | Magnezyum Klorür |
| NaCl | Sodyum Klorür |

Kısaltmalar

| | |
|-------|--|
| ATCC | Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection) |
| KOB | Koloni Oluşturan Birim |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) |
| TPS | Tamponlanmış Peptonlu Su |
| TSB | Tryptic Soy Broth |
| YEA | Yeast Extract Agar |
| COI: | Sitokrom oksidaz alt ünite I |
| NB | Genel Amaçlı Sıvı Besiyeri (Nutrient Broth) |
| NA | Genel Amaçlı Katı Besiyeri (Nutrient Agar) |
| cpDNA | Kloroplast DNA |

| | |
|----------------------|--|
| dH ₂ O | Distile Su |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| DNaz | Deoksiribo Nükleaz |
| dNTP | Deoksiribo Nükleotid Trifosfat |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| <i>S. cerevisiae</i> | Saccharomyces cerevisiae |
| LSU | Uzun Alt ünite (Long Sub Unit) |
| ITS | Ara Tarnskripsiyon Bölgesi (Internal Transcription Spacer) |
| RPB | RNA Polimeraz alt ünitesi (RNA polymerase subunit) |
| TOP | Topoisomeraz (DNA Topoisomerase) |

1 GİRİŞ

DNA barkodlama yöntemi araştırılan canlı çeşidine bağlı olarak kloroplast, mitokondri gibi organellere veya hücre çekirdeğine ait genetik materyallerin ilgili bölgelerinin kısa zincir uzunluğundaki sekanslarından faydalanılarak tür hatta suşlar seviyesinde tanımlamayı sağlayacak biyolojik barkotlar olarak tanımlanabilir. DNA barkotlama yöntemi ile tanımlanması yapılmamış türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi aracılığı ile bu türlerin tanımlanmaları sağlanmakta, evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır. Ayrıca DNA barkotlama teknolojisi bir süreç olarak;

-Türlerin toplanması

-Dokuların örneklenmesi

-DNA izolasyonları ve DNA sekanslanması

-Elde edilen sekansların analizi, yönetimi ve validasyonu

-Veri tabanlarıyla karşılaştırma tanımlama adlandırma ve kayıtların yapılması

-Sekans verilerinin ve kayıtların paylaşımı

şeklinde de özetlenebilmektedir.

Günümüzde biyolojik çeşitliliğin hızlı tespitinde DNA barkotlama çalışması oldukça yeni ve önemli bir araç olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle mikroorganizmaların tanımlanması gibi zaman alıcı, iş yükü yüksek kültür geliştirme yöntemleri ve tanımlamada profesyonel kişilere duyulan ihtiyaç bu alanda karşılaşılan en büyük zorluklardır. Literatür çalışmalarına bakıldığında funguslar için DNA barkodlama konusunda birçok çalışma yapılmasına rağmen henüz kesin evrensel bir DNA barkodu belirlenebilmiş değildir. DNA barkodu bilinen bir ürünün bir nevi kimliği çıkarılmış olur ve bu sayede üreticiler açısından her zaman aynı standartta ürünler üretilebilmesi, kalite sürekliliği sağlanabilmesi ve tüketicilerin memnun edilebilmesi güçlendirilmiş olur.

DNA barkodlama çalışmaları temelde kısa sekans bölgelerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Sekans karşılaştırma metotları temel olarak küresel (global) ve yerel (local) algoritmalar olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Küresel karşılaştırma algoritmalarının arasında çoğunlukla Needleman–Wunsch algoritması tercih edilmektedir. Sekans karşılaştırma metotlarında yerel yaklaşımlar daha sıklıkla kullanılmaktadır. Yerel yaklaşımlar içerisinde yaygınlıkla Smith–Waterman algoritması tercih edilmektedir. Bunlar ise daha çok dinamik programlama, heuristik yaklaşımlar ve istatistiksel

yaklaşımli metotlardan oluşmaktadır. Sekans bilgilerinin dizileme ve karşılaştırma işlemlerinde yaygın olarak ClustalW2, T-coffee BLAST, BioEdit, R, MEGA gibi sekans karşılaştırma yazılımlarından faydalanılmaktadır. Ayrıca bu amaçla online ve paket yazılımlar ve veri bankalarından da yararlanılabilmektedir.

Dünya genelinde takip edilmesi ve tespiti zor olan türlerin biyo-çeşitliliğinin hızlı tespitinin sağlanması amacıyla DNA barkodlama çalışmaları her geçen gün artmakta iken, ülkemizde bu konudaki çalışmalar ancak son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır. Ancak bu çalışmalar daha çok kuşlar, deniz canlıları ve bitkilerin filogenetik tanımlamaları üzerinedir. Buna karşılık ülkemizde mikroorganizmalar üzerine DNA barkodlaması konusunda yapılan çalışmaların yok denecek kadar az olduğu özellikle de *S. cerevisiae* mayalarına ait bir çalışma bulunmamaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizma tespitinde oldukça yoğun işgücü ve zaman harcanmaktadır. Bu nedenle türlerin tespitinde hassasiyet, doğruluk ve hız konusunda iyi çalışan yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. DNA barkodlama, tüm fungusların tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan geleneksel yöntemlere alternatif olarak uygulanabilen güçlü bir araç olarak görülmektedir.

Bu çalışmada barkodu oluşturulacak organizma olarak mayaların özel bir türü olan, geleneksel ve biyoteknolojik proseslerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan ve model bir organizma olan *S. cerevisiae* seçilmiştir. *Saccharomyces* fungus (mantar) âlemine ait bir cinstir, pek çok maya türü içerir; *Saccharomyces* ismi Latince saccharo- (şeker) ve Yunanca -mikes (mantar) sözcüklerinden türetilmiştir. *Saccharomyces*'lerin tipik özellikleri, arasında nitrat kullanamamaları ve karbohidratları fermente edebilmeleri gösterilebilir. Bu cinsin üyeleri gıda sanayisinde çok önemlidirler.

Saccharomyces cerevisiae, tomurcuklanan bir maya türüdür. Eski çağlardan beri bira, şarap ve ekmek yapımında kullanılmasından dolayı en önemli maya türü olduğu söylenebilir. Üzümün kabuğundan ve farklı kısımlarında izole edildiği belirtilmektedir. Koyu kabuklu meyvelerin kabuklarındaki beyaz tabakanın bir bileşeni mayadır, kabuktaki mumun içinde yer alır. Üzüm türlerinin spontan şarap üretiminde kullanımı süreci genel olarak, üzümün hasat edilmesi, şıra eldesi, birincil fermantasyon, ikincil fermantasyon ve olgunlaştırma evrelerinden oluşmaktadır. Gerçekleştirilen bu evreler süresince baskınlık gösteren mikroorganizma türleri farklılık göstermektedir. Üzümün hasat edilmesi ve şıra eldesi evresinde yaygın olarak *Saccharomyces* dışındaki *Hanseniaspora*, *Candida*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*

gruplarında yer alan maya türleri baskın florayı oluşturmaktadır. Birincil fermantasyon aşamasında *Saccharomyces* grubu mayalar, ikincil fermantasyon evresinde *Oenococcus oeni* türleri, olgunlaştırma evresinde ise bozulma yapan bakteriler ve mayalar baskınlık göstermektedir. Üzüm şirasının spontan fermantasyonunun düşük alkol toleranslı *Saccharomyces* dışındaki mayalar ile başlamasının nedeni, bu mayaların üzümlerin yüzeyinde baskın olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu mayalar, fermantasyonun başlangıç evrelerinde toplam maya popülasyonunun %50-75'ini oluşturmaktadırlar. Üzümdeki *Saccharomyces* dışındaki mayaların konsantrasyonu, 10^3 - 9.1×10^5 kob/mL iken, *Saccharomyces* cinsi mayaların konsantrasyonu 50 - 2.5×10^5 kob/mL'den azdır.

Moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi alanlarında prokaryotlar arasında model organizma olarak ele alınan *Escherichia coli*'ye benzer şekilde, üzerinde en çok çalışılmış model ökaryotik organizmalar arasında da bu maya türüdür. *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri yuvarlak veya yumurta biçimlidir, çapları 5-10 mikrometredir. Tomurcuklanma olarak bilinen bir bölünme yoluyla ürer. *Saccharomyces cerevisiae* hücre döngüsünün araştırılmasında çok kullanışlıdır, çünkü hem kültürlenmesi kolaydır, hem de, bir ökaryot olmasından dolayı hayvan ve bitkilerin karmaşık hücre içi yapılarına sahiptir. Ökaryotlar arasında genomunun dizini ilk okunan canlıdır. Maya genom veri tabanı bulunmaktadır. Genom yaklaşık 13.000.000 baz çiftinden ve 6275 genden oluşmaktadır, ancak bu genlerin yaklaşık 5.800'ünün işlevsel olduğu sanılmaktadır. Maya ve insan genomunun dizinleri %23 ortaktır.

Bu çalışma kapsamında ticari kaynaklardan elde edilen suşlar, ulusal, uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarından sağlanan suşlar, ulusal üniversite laboratuvarlarından temin edilen suşlar ve 2016-2017 yıllarında üzüm bağı hasat döneminde İç Anadolu Bölgesi şehirlerinden toplanmış üzüm ve toprak örneklerinden izole edilen suşlar kullanılarak DNA tabanlı barkod bölgelerinin başarıları ortaya konmaya çalışılmıştır.

Temin edilen maya suşlarının ITS "Internal Transcription Spacer", LSU "Long Sub Unit", SSU "Short Sub Unit" ve/veya RPB1 "RNA polymerase subunit1", RPB2 "RNA polymerase subunit2", TOP1 "DNA Topoisomerase" gen bölgeleri üzerinden ön PCR "polimerase chain reaction" denemeleri yapılmıştır. Ön denemeler sonucunda başarılı bir şekilde çoğaltılabilen ITS, LSU, RPB2 gen bölgeleri üzerinde DNA barkodlama çalışması sürdürülmüştür. Uygun bulunan bu gen bölgeleri kullanılarak 120 izolatın sekans bilgileri Sanger Sekanslama yöntemleri kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bu geniş sekans havuzu üzerinden tanımlama ve barkodlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın en önemli çıktısından biri evrensel DNA barkod

sisteminin ilk kez yaygın olarak ulusal kaynaklardan toplanmış olan *S. cerevisiae* kültürlerinde uygulanmasıdır. DNA barkodları çıkarılan *S. cerevisiae* suşlarına ait verilerin yerleştirileceği bir veri bankası oluşturulmuştur.

Bu temel amaç doğrultusunda izlenen adımlar aşağıdaki şekildedir;

- ✓ Grup 1 - Ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan *S. cerevisiae* suşları sağlanmıştır.
- ✓ Grup 2 - Ulusal ve uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarından *S. cerevisiae* suşları sağlanmıştır.
- ✓ Grup 3 - Ulusal üniversitelerde araştırma laboratuvarlarından *S. cerevisiae* suşları sağlanmıştır.
- ✓ Grup 4 - İç Anadolu Bölgesi'nin farklı şehirlerindeki üzüm bağlarından 2016-2017-2018 yıllarında toprak ve üzüm örnekleri toplanarak maya izolasyonları yapılmıştır.
- ✓ Kontrol olarak kullanılacak referans *S. cerevisiae* suşları sağlanmıştır.
- ✓ İzole edilen ve sağlanan *S. cerevisiae* suşlarının tamamına mikroskobik ve makroskobik morfolojik testler uygulanmış ve sonuçları alınmıştır. Morfolojik testleri gerçekleştirilen suşlara biyokimyasal testler uygulanmıştır.
- ✓ İzole edilen ve sağlanan *S. cerevisiae* suşlarının tamamının Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır.
- ✓ Kullanılacak barkod bölgelerinin belirlenmesi için farklı gen bölgeleri (ITS "Internal Transcription Spacer", LSU "Long Sub Unit", SSU "Short Sub Unit" ve/veya RPB1 "RNA polymerase subunit1", RPB2 "RNA polymerase subunit2", TOP1 "DNA Topoisomerase") belirlenerek *S. cerevisiae* DNA barkodunda kullanılacak gen bölgelerinin (ITS, LSU, RPB2) ön seçimi yapılmıştır.
- ✓ Barkod bölgeleri için 120 izolat üzerinden Polimeraz Zincir Reaksiyon tekniği (PCR) ile amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Elde edilen ürünler Sanger Sekanslama yöntemi ile sekanslanmıştır.
- ✓ Referans maya suşları ve izole edilen ve tanımlanan maya suşlarından elde edilen sekanslara ait veriler işlenerek, karşılaştırmalı veri analizi ve barkodlarının oluşturulması için ileri analizler gerçekleştirilmiştir.
- ✓ *S. cerevisiae* için DNA barkodu oluşturma amacıyla kullanılacak gen bölgeleri ve başarı durumları değerlendirilmiştir.

- ✓ Elde edilen tüm değerlendirmeler hazırlanan web sayfasında kayıt altına alınmış ve sunulmuştur.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Barkodlama

“DNA barkodu” terimi ilk kez 1993 yılında, *Plasmodium falciparum* izolatlarını, circumsporozoite genine dayanarak ayırt etme olasılığını açıklayan bir makalede yer almıştır [1]. Bununla birlikte, organizmaların moleküler araçlar kullanılarak belirlenmesi fikri daha eskidir [2]. Tür farklılıklarının belirlenmesine yönelik kullanılan ilk moleküler araçlar arasında, 1960'ların ortasından kullanılan allozimler yer almaktadır [3]. DNA barkodlarının ardındaki fikir, yaşayan tüm taksonların tanımlanmasında yararlı olan tek veya birkaç DNA segmenti belirleyebilmeye ve kullanmaya dayanmaktadır. DNA barkodu, türlerin tanımlanması için bir veya daha fazla kısa zincir uzunluğundaki (<700 bp) gen bölgeleri ve standart genetik işaretleyicileri (markör) kullanarak hızlı, doğru ve otomatik yeni bir teşhis aracı olarak görülmektedir. Genetik işaretleyicinin seçimi bazı temel özelliklere uyması gerekmektedir. İlk olarak tüm barkodlu türlerde bu işaretleyicilerin bulunması istenmektedir. Ayrıca markör bölgesinin hızlı çoğaltılmasının mümkün olması için kısa olması, ancak yine de tüm türleri ayırt etmek için yeterli çeşitliliği (uzunluğu) barındırması gerekmektedir [4].

Yeryüzünde var olan biyoçeşitliliğin kataloglanması sürecinin geleneksel taksonomik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmesi oldukça zor bir süreçtir. Sadece ökaryotik türler göz önüne alındığında biyoçeşitliliğin 3.6 milyon ile 10 milyon arasında değiştiği bilinmektedir. Hâlihazırda yeryüzünde var olan biyoçeşitliliğin %15’lik kısmı hakkında detaylı bilgi bulunmaktadır. Bu durum deniz taksonları için daha düşük seviyelerdedir. Yapılan araştırmalar yılda 10.000 yeni türün tanımlanabildiğini göstermekte bu ise tüm habitatlardaki biyoçeşitlilik kaybı göz önünde bulundurulduğunda var olan ve kullanılmakta olan sistemlerin yeryüzündeki biyoçeşitliliği belirlemede yetersiz ve yavaş kaldığını göstermektedir. Yakın türleri ayıran özellikler o kadar karmaşıktır ki çoğu taksonomist az sayıda taksonda uzmanlaşmışlardır [4]. Mevcut taksonomik protokoller büyük ölçüde fenotipik karakterlere dayanır ve çoğu zaman örneklerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Çoğu zaman farklı takson grupları veya tek bir türün farklı yaşam evreleri için kesin ana tanımlayıcı anahtarlar yoktur. Bu zorlukların bir birleşik sonucu olarak, biyolojik çeşitliliği anlama, kullanma ve korumaya yönelik geleneksel taksonominin yetersiz kalabildiği düşünülmektedir [4]. Bazı durumlarda ise olası zararlara uğramış numune parçaları morfolojik tanımlama açısından büyük zorluklar

taşımaktadır. Benzer durumlar, vejetatif formların (çiçek veya meyve içermeyen dönemler) taksonomik tanımlanabilirliğini zorlaştırdığı birçok bitki türü için de geçerlidir [5].

Moleküler çalışmalar, morfolojik farklılaşmaların ötesinde genetik ayrışmayı baz alarak çok sayıda biyolojik türün varlığını ortaya çıkarmıştır (morfolojik olarak kriptik türlerin tanınması, modern taksonomide büyük bir zorluk olarak bulunmaktadır ve bazı canlı türleri morfolojik açıdan farklı yaşam evrelerinden oluşan karmaşık gelişimsel yaşam döngülerine sahiptir; bazen tek bir cins bile gelişim evrelerinde birden fazla tanımlayıcı morfolojik farklılaşma evresinden geçmektedir).

Moleküler tanımlamaya dayanan DNA barkodlama yönteminin morfolojik taksonomi ile başarılı bir şekilde çalışabileceği savunulmaktadır. DNA barkodlama biyolojik yapıların iç anatomisi, fizyolojisi, biyoçeşitlilik değerlendirmesi ve takson tanımlaması ile ilgili tartışmalara farklı bir çözüm yolu getirmeyi hedeflemektedir. Potansiyel yeni türler ele alındığında, bu yaklaşımlar taksonomik bir uzman tarafından da test edilmelidir, ancak DNA barkodlama ile çok sayıda örnek için hızlı bir tarama aracı sağlayarak rutin tanımlamalar ve numunelerin detaylı incelenmesi önenebilir. Bitkiler, kuşlar, balıklar, inekler, örümcekler, makroalgler, mantarlar, protistalar, bakteriler ve çeşitli *Lepidoptera* dizileri üzerinde yapılan pilot projelerde bu yaklaşımın etkinliğini kanıtlamıştır [6]. Bütünleştirici yaklaşımların türlerin keşfedilmesini ve tanımlanmasını hızlandırmak için son derece yararlı olduğu kanıtlanmıştır ve “turbo taksonomi” terimi son zamanlarda uzman bir taksonomist ve yüksek çözünürlüklü dijital görüntüleme tarafından yapılan morfolojik tanımlamalardan önce ilk adım olarak DNA barkodu dâhil prosedürler için kullanılmaktadır [7-8].

Bunların yanında DNA barkodlama teknolojisinden yararlanılarak evrimsel gelişim karşılaştırmalarında sınıflama, yeni varyasyonların tespiti, morfolojik olarak ayırımı yapılamayan ‘kriptik’ türlerin ayrılması, türlerin sınırlarının belirlenmesi, habitat dinamiklerinin incelenmesi, moleküler evrim dinamiği, niş modellemede ve çevresel indikatör olarak kullanım gibi alanlarda yararlanılabilmektedir. DNA barkodlama çalışmalarının en çok ihtiyaç duyulduğu ve kullanışlı olduğu alanlar tıbbi tanılar, bulaşıcı kaynakları, tüketilen biyolojik ürünlerin içeriğindeki tür veya cins tespiti, toprak gibi mikrobiyal açıdan kompozit karışımlarda tür tespiti, botanik ve zooloji alanında türlerin tespiti gibi alanlar sayılabilmektedir. Araştırmalarda DNA barkod kullanımı ile tarımsal haşere teşhisi gibi, sosyoekonomik açıdan önemli uygulamalar geliştirilebileceği gösterilmiştir [9]. Bu alanlara örnek olarak nesli tükenmekte olan türler [10], deniz

kaynaklı gıda ürünlerinin doğrulaması [11], bitkisel ilaçların tespiti [12] ve patojen-vektör-konakçı türleri birlikteliklerinin anlaşılması [13] alanlarında kullanılmaktadır.

Barkodlama çalışmaları ilk önce hayvanlar aleminde mitokondriyal sitokrom oksidaz geni (COI) üzerinden (bu gen evrimsel olarak daha iyi korunduğu ve hibridizasyon, gen çaprazlaması 'crossing over' gibi olaylara karşı daha korunaklı olduğundan) uygulanmaya başlamış, daha sonra ise bitkiler alemi üzerinde *rbcL*, *matK* ve tamamlayıcı *trnH*, *psbA* genleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyal DNA'nın, intron eksikliği, haploid kalıtım şekli, rekombinasyona sınırlı düzeyde maruz kalması ve her hücrede yüksek kopya sayısı bulundurması gibi nedenlerle açıkça daha iyi bir DNA barkodu olarak kabul gördüğü belirtilmektedir [14].

Hebert ve ark.[15] mitokondriyal genomun COI bölgesinin, çok çeşitliğe sahip bir taksonlama için yakından ilişkili hayvan türleri arasında ayırım yapmada uygun olduğunu ve bu markörün, çeşitli türlerin tanımlanmasında etkili bir şekilde kullanıldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, DNA barkodlama için önerilen COI gen bölgesinin evrensel bir barkod bölgesi olarak kabul edilmesi daha katı veri kalitesi ve standartları gerektirmektedir. Öte yandan, bitkiler için tür ayırımı yapmada tek bir bölge tespit edilememiştir ve Yaşam Barkodu Konsorsiyumu (CBOL) tarafından iki konumlu bir DNA barkod yaklaşımının kullanılması önerilmiştir [6,16-21].

DNA barkodlama çözünürlüğünün gücü, seçilen genetik markör için olası alternatif sekans sayısının ne oranda bulunduğuna dayanmaktadır. Örneğin bir protein kodlama gen segmenti (600 baz), milyonlarca türü çözmek için yeterli bilgiyi içerebilmektedir. Bu sayı rastgele bir tahmin değildir. Kodonlar içindeki üçüncü nükleotit pozisyonları genellikle seçici olarak nötrdür ve mutasyonlar bu bölgelerde rastgele genetik sürüklenme ile birikir. Bu kodon özgülüğü, çoğunlukla "Wobble" hipotezi olarak bilinmektedir [22].

Doğruluk, intraspesifik varyasyon ile markör bölgesindeki farklılaşmalar arasındaki farklılığa bağlı olan kritik bir konudur. Bu ayırımın kapsamı, Meyer ve Paulay [23] tarafından barkod aralığı olarak adlandırılmıştır ve barkod aralığının iki farklı durumu temsil edebileceği şeklinde açıklanmışlardır. Bunlardan biri bireyin kendi türünün bir üyesine farklı bir türden ('yerel' barkod aralığı) daha yakın olduğu bir örnek tanımlaması için, diğeri ise aralığın kapsamının tüm türler için önceden tanımlanmış bir eşikle karşılaştırıldığı türlerin keşfi için ('küresel' barkod aralığı) kullanımını olacak şekilde ifade edilmiştir [23]. Bununla birlikte barkodlamada, evrensel eşiklerin uygulanması tartışmalı bir konu olarak belirtilmektedir [24].

İyi bir DNA barkodunun taşınması gereken özellikler şu şekilde özetlenebilir:

- ✓ Tür ve bazı durumlarda alt tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması,
- ✓ Geniş bir taksonomik ölçekte canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması,
- ✓ DNA ekstraksiyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanabilir.

Barkodlamayı güçlü kılan önemli bir noktada bu yöntemin yakın zamanda türlerin ayırımını yapmanın yanında tür içi farklılaşmaları belirlemede de kullanılabilme şansının olması durumudur [24].

DNA barkodları kullanılarak tür tanımlaması algelerde [25], mantarlarda [26], bitkilerde [27] [28] ve birçok hayvanda başarılı olarak gerçekleştirilmiştir. Örümcekler [29], balıklar [30], kuşlar [31] ve kemirgenler [32] gibi gruplar üzerinde çalışmalar yürütülen diğer canlı türleridir. Bununla birlikte, tek hücreli organizmaların tanımlanması için uygun belirteçlerin bulunması daha zor olmuştur [33] ve bazı taksonomik gruplar hala aşağıdaki bölümlerde daha ayrıntılı olarak tarif edilen birkaç farklı DNA markörünün kullanılmasını gerektirmektedir.

Araştırmacılar hala tüm taksonların tanımlanmasına uygun tek bir DNA segmenti bulmaya çalışmaktadırlar. Bu alanda yıllarca süren çalışmalara rağmen, böyle bir bölge tespit edilmemiştir ve tek bir evrensel DNA barkod işaretleyici bulunma olasılığı zor bir konu olarak gözükmektedir [33].

2.2. Biyoçeşitlilik, Filogenetik ve DNA Barkodlama

Barkod çalışmaları genellikle çok sayıda türü hedeflediğinden, DNA barkodu filogenetik çalışmaları yürütmek için çok güçlü bir araç olabilmektedir. Yakından ilgili taksonlar, kriptik türler ve başlıca hayvan grupları arasındaki bağlantısal ilişkilerin çözümüne yardımcı olan DNA barkodlama üzerine çeşitli çalışma örnekleri bulunmaktadır [34]. Öte yandan DNA barkodundan toplanan bilgiler, geniş popülasyon düzeyindeki soruları ele almak için yeterli bulunmamakta, ancak genomik yapı ve biyoçeşitlilik hakkında erken bir bakış açısı sağlayabildiği düşünülmektedir. Örneğin mitokondriyel COI gen bölgesi, popülasyon genetiği araştırmaları için yeterli olmayabilmektedir, çünkü tek taraflı kalıtsal bir özellik sunmaktadır ve popülasyon geçmişi tam olarak yansıtmayabilen tek lokuslu yapı taşıma önyargıları barındırmaktadır [35]. Bu nedenle, bu sorunun üstesinden gelmek

ve farklı taksonomik derecelerde çözünürlüğü arttırmak için farklı genetik bilgi sağlayıcı kısımlardan (yani mitokondri, kloroplast ve çekirdek) çoklu lokusların kullanılması yaygın olarak önerilmektedir. Öte yandan farklı markör bölgeleri arasındaki uyumsuzluk çok konumlu yaklaşımlar için iyi bilinen bir sorundur ve verilerin birleştirilmesinin avantajları hala tartışmalıdır [35]. Bunların yanında çoklu lokus kullanılmasının dal uzunluklarını ve homoplazisini azaltarak doğru filogeniyi geri kazanmaya yardımcı olduğu için çok değerli olduğu kabul edilmektedir [6].

2.3. DNA Barkodlama ve Biyoçeşitlilik Değerlendirmesi

Filogenetik, türlerin uyarlanabilir farklılıkları ve genetik verileri gibi çeşitli araçlar ile ölçülebilen biyolojik çeşitliliğin kritik bir bileşenidir. Bununla birlikte, bu araçlar biyoçeşitliliğin çok farklı değerlendirmelerine yol açabilmektedirler, bu yüzden ekosistem veya popülasyonlar hakkında tam bir bakış açısı elde etmek için bu sistemlerin birleştirilmesinin daha sağlıklı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. DNA barkodlama, ekolojistlere, tür korumacılarına ve evrimsel biyologlara biyolojik çeşitliliği, tür çeşitliliğini, ekolojik ve evrimsel mekanizmaları anlamada yardımcı olabilecek faydalı bir araç olarak görülmektedir. Bununla birlikte, bir biyolojik çeşitlilik değerlendirme aracı olarak DNA barkodu kullanılırken yeri geldiğinde taksonomik tanımlama ayrıca yapılmalı ve gerekli doğrulamalar yapılmalıdır [24].

Biyoçeşitlilik kaybı, ekosistem bakımından zengin ortamlarda çok belirgin bir durum olarak ortaya çıkmaktadır. DNA barkodları kullanılarak biyolojik çeşitliliğin değerlendirilmesi, tür bakımından zengin, erişimi zor ve yetersiz olduğu ekosistemlerde avantajlar sağlayabilmektedir. Dünyanın biyolojik çeşitliliğinin çoğu, bu tür değerlendirmeler için insan ve bilgi kaynaklarının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde yoğunlaştığı için, bu alanlarda DNA barkodları biyolojik çeşitlilik değerlendirmelerini kolaylaştırabileceği ve geleneksel taksonomik biyolojik çeşitlilik araştırmasının maliyet ve zaman gereksinimlerini azaltabileceği düşünülmektedir [36]. Taksonomik olarak kaydedilmeden önce birçok türün neslinin tükeneceği düşünülmektedir [37]. Çevresel metagenomik, genellikle birkaç DNA markörü aracılığıyla mikrobiyal toplulukların çalışmasına atıfta bulunsa da, bu iki yaklaşımın (DNA barkodlama ve çevresel metagenomik) gerçekten aynı yaklaşım mı yoksa aynı madalyonun sadece iki farklı yüzü mü olduğu konusunda fikir birliği yoktur [38]. Biyolojik çeşitliliğin DNA barkodu ve mikrobiyal metagenomiklerle

değerlendirilmesindeki farklılıkların biyolojik kapsamı şu şekilde ifade edilmektedir: “mikrobiyal metagenomikler çoğunlukla prokaryotları incelemektedir (DNA barkodu ise daha çok yanal gen aktarımını dikkate almaktadır ve ökaryotlarda yaygın kullanılamamaktadır)”.

DNA barkodunun faydası, bugünkü biyolojik çeşitliliğin araştırılmasıyla sınırlı değildir. Geçmişte var olan ekolojik koşulların araştırılmasına da yardımcı olabilir. Araştırmacılar paleo ortam, sedimanları veya buzulları analiz ederek biyolojik kalıntılardan eski çağlara ait biyoçeşitliliği araştırabilmektedirler. Bilim adamları, Şili'deki Atacama Çölü'nde kemirgenlerin biriktirdiği 700 yıllık kalıntıları analiz etmiş ve bunlar arasında ürik tuzlara hapsedilmiş bitki makrofosilleri, polen, dışkıları, kemikler ve böcekler üzerinde araştırma yürütmüşlerdir. Kalıntıların genetik analizi, 700 yıl önce, çevrenin bu bölgede çok daha nemli, üretken ve çeşitli olduğunu göstermiştir [39]. Benzer şekilde, Neolitik mumya Otzi'nin “son akşam yemeği” analiz edilerek, gastrointestinal örneklerden geyik ve ibex DNA varlığı tespit edilmiştir [40].

2.4. Canlılar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı

2.4.1. Hayvanlar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı

Hayvanlar aleminde DNA barkodlama yaklaşımında, mitokondriyal genom (mtDNA) sekansların kullanılması nükleer genom sekanslarına tercih edilmektedir, bunun en önemli nedeni rekombinasyon olayının mitokondriyal genomda daha nadir görülmesi ve mtDNA'nın heteroplaziden kaynaklanan sekans hatalarını önleyen haploid yapıda olması gösterilmektedir [41]. Omurgalılarda ve diğer bazı hayvan gruplarında, sitokrom oksidazı (COI) kodlayan mitokondriyal gen bölgesi DNA barkodlamada yaygın kullanılmaktadır. Mitokondriyal DNA'nın tür tespiti için kullanılmasının başarı oranının yüksek olduğu iddia edilmektedir. Çalışmaların çoğu % 5'ten daha az hata oranları göstermiştir [42]. Sitokrom oksidaz gen dizisinin hayvan türlerinde % 98'den daha fazla bir ayırım gücü sağladığı belirtilmektedir [30,43]. Bu gen tarafından kodlanan protein, hücresel solunum için gerekli olduğu için, bu genin amino asit bileşimi oldukça stabildir ve sonuç olarak değişime uğraması çok yavaştır [44]. Sitokrom oksidaz solunum zincirinin, oksijeni suya indirgenmesini katalize eden bileşeni olarak görev yapmaktadır ve alt enzim ünite kompleksinin işlevsel çekirdeğini oluşturmaktadır. Sitokrom oksidaz geni, enzimin katalitik alt birimini kodlamaktadır .

Bazı araştırmacılar DNA barkodlamada mtDNA kullanımını ile ilgili sorunlar olduğunu da bildirmişlerdir. Filogenetik çalışmaların bir meta analizinde, çalışılan soyların % 20'sinden fazlasında mtDNA'nın iç içe geçmesi nedeniyle sorun yaşandığını [45], bunun mtDNA'ya dayanan önemli bir barkod sınırlaması olabileceğini belirtmişlerdir [46]. MtDNA'da heteroplazinin varlığı, bir bireyin mitokondrisinin, herhangi bir gen gibi, bir popülasyondaki alellerin bir örneğini temsil edebileceği anlamına gelebilir, bu nedenle karşılaştırma için ek genetik işaretleyiciler gerektiği vurgulanmaktadır [46]. Mitokondriyel DNA'nın barkodlama için bir başka potansiyel problemi, ökaryotların çoğunluğunda ortak olan ve kolayca büyütülebilen nükleer mitokondriyal psödogenler (NUMT)'lerdir. Son olarak, bazı ökaryot gruplarında (amitokondrial ökaryotlar) mitokondri bulunmaz ve bu da mtDNA dayanarak bu organizmaları incelemeye imkan vermez [47]. Yukarıda belirtilen sınırlamaların, alternatif bir hedef bularak veya türleri daha doğru şekilde ayırt etmek için ek bilgi sağlayıcı moleküler markörler ekleyerek büyük ölçüde üstesinden gelinebileceği belirtilmektedir. Daha kapsamlı bir COI referans veri tabanı mevcut olana kadar, 16S rRNA geninin uygun bir tamamlayıcı işaretleyici olarak kabul edilebileceği belirtilmektedir [48].

Sitokrom oksidaz gen bölgesi şu anda birçok omurgalı (örn: kuşlar, balıklar) ve omurgasız (örn: böcekler) gruplarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, nematodlar, poriferanslar, cnidarianslar, ctenophoresler ve plazzoanlar, gibi bazı taksonlarda, COI bölgesi kullanımı yerine ribozomal genler kullanılmaktadır [49-53]. Ayrıca, amfibi ve sürüngenlerde, 16S rDNA, birçok taksonda COI'den daha sık kullanılmaktadır [49-53].

2.4.2. Bitkiler Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı

DNA barkodlamasının bitkiler üzerinde kullanımının hayvanlar üzerinde kullanımından daha zorlu olduğu kanıtlanmıştır. Bitkilerin mitokondriyal COI genindeki düşük heterojenlik nedeniyle, bu bölge bitki türlerini ayırt etmek için uygun bulunmamıştır. Botanikçiler, COI geninin yerine geçebilecek mitokondriyal genomun dışında bir DNA dizisi aramak için çok zaman harcamışlardır. Nükleer gen içerisine kopyalanmış ayırıcı (ITS) bölgesi ve kloroplast intergenik ayırıcı trnH-psbA [54], bu hususta ilk ele alınan gen bölgeleri olarak dikkat çekmektedirler. Bitki genomları hakkında artan bilgi birikimi ve mevcut evrensel primerlerin miktarının artmasıyla birlikte, bitkilerin barkodlanması için kullanılacak potansiyel bölgeler genişlemiştir. İlgili DNA barkodunun aranması, hayvan mitokondriyal genomuna alternatif olan bitki kloroplast genomuna odaklanmıştır.

Kloroplast genomu uygun barkod işaretleyicileri içerebilir, çünkü her bitki hücresinde çok sayıda kopya bulundurmakta ve korunmuş gen dizilerinden oluşmaktadırlar. Kloroplast genomunun dezavantajı, nispeten düşük evrim hızına sahip olmasıdır. Bitki barkodlamacıları yeni türlerde de bulunabilen ancak tüm kara bitkilerinde bulunabilecek kadar güçlü olan ve sağlam, evrensel ayırıcılar için iyi aday olan bölgeleri belirlemeye odaklanmışlardır. Bitki barkodu için istenen tüm özellikleri gösteren bir işaretleyici bulunmadığından, araştırmacılar aynı anda birden fazla bölgenin kullanımını önermişlerdir. İlk öneriler, iki veya üç bölgenin bir kombinasyonundan oluşmaktaydı; örneğin iki kloroplast geninin (*rpoC1* ve *matK*) veya bir intergenik aralayıcının (*psbA-trnH*) bir kombinasyonundan oluşmaktaydı (örneğin *rpoC1*, *rpoB* ve *matK*) [28]. Daha sonra nükleer ITS dizisi dikkate alınması gereken bir ayırıcı olarak önerilmiştir. Bitki Çalışma Grubu (CBOL) [55], tarafından bir makalenin yayınlanmasıyla birlikte bitki barkodlama alanında bir dönüm noktasına ulaşılmıştır. Bu kısa makalede, bitki DNA barkodları olarak kullanılacak potansiyel adaylar değerlendirilmiştir. CBOL, barkodlama için tüm kriterleri dikkate alarak yedi potansiyel adayı değerlendirmeye almıştır. Bunlar dört kodlama bölgesi (*matK* , *rbcL* , *rpoC1* ve *rpoB*) ve üç kodlanmayan bölge (*psbA-trnH*, *atpF-atpH* ve *psbK-psbI*) olmuştur. Kodlamada görev almayan diğer üç bölge (*rbcL*, *psbA-trnH* ve *matK*) geriye kalan muhtemel adaylar olarak ortaya çıkmıştır, ancak hiçbir barkodlayıcı markör kriterinin tamamını karşılamamıştır. Sonuç olarak, bitkiler üzerinde çalışan bazı CBOL araştırmacıları, her üç markörün (*rbcL*, *psbA-trnH* ve *matK*) birlikte kullanılmasını önermişlerdir. Ek belirteçlerin çoğaltılması ihtiyacı, taksonomik tanımlama için gereken masrafı ve zamanı arttırmaktadır; bu nedenle, bazı araştırmacılar bunlardan iki bölgenin (*matK* ve *rbcL*) bir kombinasyonunu seçmişlerdir. Kombinasyon halinde, bu genlerin, vakaların % 72'sinde türleri ve tüm vakalarda cins seviyesini tanımlayabildiği belirtilmiştir. Bir numunenin coğrafi orijini ve cinsin eşzamanlı üye sayısı hakkında ek bilgi, pozitif bir tür tanımlama yapabilme olasılığını artırabilmektedir. Bugün *rbcL* ve *matK* bölgeleri, çekirdek barkodlama bölgeleri olarak tanımlanırken, *psbA-trnH*, uygun durumlarda kullanılacak önemli bir tamamlayıcı markör olarak belirlenmiştir [56].

2.4.3. Mantarlar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı

Çıplak gözle görülememesine rağmen, mantarlar karasal ekosistemlerde çok büyük bir rol oynarlar. Mantarlar morfolojik ve fizyolojik olarak, tek hücreli mikro ve makro organizmalara kadar çok çeşitli organizmaları temsil ederler. Mantar türlerinin tanımlanması çoğu zaman zordur, çünkü yalnızca zaman zaman tanımlamaya uygun morfolojik karakterler gösterirler [57]. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, tür düzeyinde taksonomi büyük ölçüde değişmiş ve birçok bilinmeyen tür belirlenmiştir. Bununla birlikte, moleküler markörlere dayalı tanımlamanın çoğu zaman uygun tanımlayıcı materyal ile birleştirilmesi daha uygun görülmektedir [58].

Farklı gen bölgelerinin hangi takson grupları üzerinde yaygın kullanıldığını veren tablo aşağıda (Çizelge 2.1) verilmiştir. Uluslararası Mantar Çalışma Grubu (<http://www.fungalbarcoding.org>) tarafından yönetilen Mantar Barkod Veri Tabanı, mantar DNA barkodlaması için kullanılacak bir dizi bölge belirlemiştir. Her ikisi de nükleer ribozomal RNA genleri grubuna ait olan ITS bölgesi ve nükleer büyük alt birimin (LSU) D1/D2 bölgesi, en yaygın şekilde sıralananlar arasında yer almaktadır ve tüm mantar taksonomik gruplarında kullanılabilir. Bu iki bölge, universal primerler kullanılarak kolayca büyütülebilir ve benzer protokoller, farklı mantar gruplarında da kullanılabilir. Ek olarak, bu iki bölge referans verisi en fazla bulunan bölgelerdir. Bununla birlikte, bu iki bölge bile çoğu zaman tür düzeyini ayırt edememektedir [58]. Diğer bölgeler, nükleer küçük alt birim (SSU) ve üç düşük kopya protein markörü (RPB1, RPB2 veya MCM7) seçilmiş taksonomik gruplarda uygulanmaktadır. Ayrıca COI gen bölgesi GenBank sorgulamalarına göre funguslarda en çok sorgulama ve araştırma yapılan gen bölgesi olarak ilk sıralarda yer almaktadır [59-60]. CBOL mantarlar için barkodlamada kullanılan uygun DNA markörlerini belirleme ve onaylama çalışmalarını sürdürmektedir. Mantar çalışma grubu ise yaygın olarak ITS gen bölgesine dayanan bir tanımlama sunmaktadır [61].

Çizelge 2.1. Bitkilerde, hayvanlarda, mantarlarda, alglerde ve protistlerde DNA barkodlamada yaygın kullanılan birincil moleküler markörler [60]

| İşaretleyici | Bölge (genom) | Kullanıldığı Grup |
|--------------|---------------|-----------------------|
| <i>rbcL</i> | Kloroplast | Bitkiler Diatomlar |
| <i>Matk</i> | Kloroplast | Bitkiler |

| | | |
|--------------------|--------------|---|
| <i>trnH-psbA</i> | Kloroplast | Bitkiler |
| ITS | Nükleer | Bitkiler Mantarlar |
| <i>COI</i> | Mitokondrial | Hayvanlar Mantar, Kahverengi algler (Phaeophyceae) Kırmızı algler (Rhodophyta) |
| LSU <i>D1 / D2</i> | Nükleer | Mantarlar |
| <i>SSU</i> | Nükleer | Mantarlar (Chytrids/Zygos, Ascomycota, Basidiomycota) |
| <i>RPB1</i> | Nükleer | Mantarlar (tüm gruplar için) |
| <i>RPB2</i> | Nükleer | Mantarlar (tüm gruplar ve Basidiomycota için) |
| <i>MCM7</i> | Nükleer | Mantarlar (tüm gruplar için) |
| LSU <i>D2 / D3</i> | Nükleer | Mantarlar |
| <i>tufA</i> | Kloroplast | Klorofilli yeşil algler (Chlorophyta) |

2.4.4. Algler ve Protistalar Aleminde DNA Barkodlama Kullanımı

Birçok organizmanın vejetatif yapıları göz önünde bulundurularak tespit edilmesi oldukça zordur. Bu durum özellikle çok basit morfoloji ve anatomik yapıya sahip, aşırı yakınsama gösteren ve çevresel faktörlere bağlı olarak geniş fenotipik değişim gösteren ve tam bilinmeyen gelişim evrelerine sahip olan deniz makro algleri için geçerlidir [62]. Bu alandaki uzmanlaşmış taksonomistlerin eksikliği ve belirlemede tanımlayıcı anahtarlarının eksikliği bu organizmaların tanımlanmasını da zorlaştırmaktadır. Moleküler araçlar, bu organizmaların tanımlanması için pratik bir seçenektir ve bu grupların çalışmasında giderek önem kazanmaktadır. Kahverengi (*Phaeophyceae*), kırmızı (*Rhodophyta*), yeşil (*Klorophyta*) alg ve mikroskobik diatomları (*Bacillariophyta*) incelemek için kullanılan dört DNA barkod işaretleyicisi (Çizelge 2.1'de) belirtilmektedir. Ökaryotlarda geniş ekolojik ve çevresel araştırmalarda yaygın olarak LSU D2/D3 markörleri, kahverengi ve kırmızı alglerin belirlenmesinde birincil belirteç olarak standart COI gen bölgesi, diatomlarda *rbcL* gen bölgesi, klorofilli

yeşil algler için, bir plastid uzama faktörü olan Tu geni (*tufA*) kullanılması önerilmektedir [62].

2.5. DNA Barkodlamada Filogenetik ve İstatistik Tabanlı Sınıflandırma Yöntemleri

DNA barkodlamanın rutin veri analiz prosedürü temel olarak, sorgu verilerinin (bilinmeyen taksonomik) durum ile eşleştirilmesini ve tarif edilen türe ait aynı grup organizmalardan önceden oluşturulmuş bir referans veri setiyle eşleştirmesini içerir. Bu bağlamda, barkodlama yöntemleri Austerlitz ve arkadaşlarının belirttiği gibi dört kategoriye ayrılabilir [63].

- (i) Sorgu dizisi ve referans diziler arasındaki eşleşmeyi temel alan benzerlik yöntemleri (hizalama algoritmaları).
- (ii) Komşu birleştirme (NJ) veya maksimum olabilirlik (ML)/Bayesian algoritmaları gibi klasik filogenetik yaklaşımlar.
- (iii) K2P mesafesine (k - NN) dayanan en yakın komşu ve temel biyolojik modelleri olmayan sınıflandırma algoritmalarına dayanan istatistiksel yaklaşımlar.
- (iv) Monte Carlo Markov Zincirlerine (MCMC) dayanan maksimum olabilirlik/Bayes algoritmaları kullanan birleşik teoriye dayanan soy yöntemleri.

Belirtilen yaklaşımlar birçok durumda benzer sonuçlar verebilmektedir. Ancak, genetik çeşitliliğin yüksek olduğu durumlarda hata değerinin de yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda, büyük örneklem büyüklükleri almanın yanında, mesafe yöntemlerinin (NJ, k-NN) daha iyi performans gösterdiği gözlemlenmiştir [63]. Ayrıca, NJ “komşu birleştirme” ağaçlarının kullanım yaygınlığına rağmen, tanımlama başarısını artıran ağaçsız tekniklerin kullanılmasının da başarıyı arttırabileceğini gösterilmiştir. Bu nedenle, DNA barkodlama analizinin kalitesi, numunenin yapılandırmasına en iyi uyarlanmış metot veya metotların seçilmesinden etkilenebildiği belirtilmektedir [63].

BOLD sistemi, benzerlik yöntemlerini uzaklık ağacı yapısıyla birleştiren yaklaşımlar kullanmaktadır. Örneğin COI protein gen bölgesini Gizli Markov Modeli (HMM) profili üzerinden global bir hizalama sistemi kullanarak ve referans kütüphanesinde doğrusal arama yaptırarak sorgulamaktadır. İlk 100 sorgu seçildikten sonra, en yakın referans sekanslarının ilişkisini değerlendirmek için K2P mesafelerine dayanan bir NJ ağacı oluşturmaktadır. BOLD, küçük veri kümelerinin de güvenilir şekilde analiz edilmesini

sağlayan kapsamlı bir veri tabanı sağlamaktadır. Bu nedenle, farklı istatistiksel yöntemleri birleştirerek, örneklerden sağlanan en iyi bilgilere erişebilmekte ve yukarıda belirtilen metodolojik sorunları önleyecek adımlar izlemeye çalışmaktadır [63].

Örnek tanımlama ve türlerin keşfedilme amaçlarının yanı sıra, DNA barkodlama biyolojik çeşitlilik değerlendirmesi için gerçekten güçlü bir araç olarak kullanılabilir. Bu amaçla, tek bağlantı kümeleme algoritmaları, DNA barkod verileriyle Operasyonel Taksonomik Birimler (OTU) tanımada yaygın olarak kullanılmıştır [64-68]. Ratnasingham ve Hebert tarafından [69] yapılan bir çalışmada, beş tek bağlantı kümeleme algoritması, tür sınırlarının geri kazanılmasındaki performansları ve etkinlikleri için değerlendirilmiştir. Hız ve taksonomik performans göz önünde tutularak, RESL, "BOLD Barkod Endeks Sayı" sisteminin [69] etkili bir algoritmik yaklaşımı olarak kabul edilmiştir. Kümeler türlerle yüksek düzeyde uyum gösterdiğinden, bu sistemin, taksonomik bilgi bulunmadığında tür tanımlarını ve grup çeşitliliğini doğrulamak için kullanılabilirliği önerilmiştir.

Mesafeye dayalı yöntemler ile taksonomistler tarafından kullanılan karakter tabanlı teşhis teknikleri arasında ki uyumsuzluktan dolayı DNA barkodu konusunda eleştiriler bulunmaktadır. Her ne kadar türlerin sofistike istatistiksel tanımlanma yöntemleri yakın zamanda geliştirilmiş olsa da [70-71], çeşitli sınırlamalara bağlı olarak DNA barkodlamada sınırlı kullanıma sahiptirler. Örneğin şu anda uygulanan Bayesian yöntemi [72], bir kereden fazla türü tutamamaktadır, bu durum DNA barkodlama kullanımı için kritik bir sınırlama olarak görülmektedir. Mesafeye dayalı yöntemlere alternatif bir diğer yaklaşım türü, karakter tabanlı yaklaşımlardır. Karakter tabanlı yöntemler temel olarak mevcut taksonomik duruma bağlı olarak sınıflandırma kurallarını tanımlar ve ardından bilinmeyen verileri sınıflandırır [73-74]. Karakteristik Nitelikler Organizasyon Sistemi (CAOS), bu prosedür için geliştirilen bir algoritmadır, ancak büyük veri setlerinde BOLD veya GenBank dikkate alınarak test edilmemiştir. Bertolazzi ve ark. iki optimizasyon modeline dayanan bir mantık madenciliği yöntemi kullanımı üzerinde çalışmışlardır [75].

2.6. DNA Barkodlama Konusunda Çalışan Organizasyonlar

Hebert'in COI gen bölgesini evrensel bir markör olarak kullanma önerisinden yalnızca bir yıl sonra, türlerin tanımlanması ve araştırılması için DNA barkodlama potansiyelini araştırmaya ve geliştirmeye yönelik CBOL (Yaşam Barkodu Konsorsiyumu) başlıklı

uluslararası bir girişim başlatılmıştır. Konsorsiyum üyeleri arasında müzeler, herbitatlar, hayvanat bahçeleri, biyolojik çeşitlilik araştırma enstitüleri, üniversiteler, koruma kuruluşları, devlet kurumları ve özel şirketleri yer almaktadır [24]. iBOL (Uluslararası Yaşam Barkodu Projesi), ise organizmaları hızlı ve ucuz bir şekilde tanımlamak için sekans kütüphanelerini ve teknoloji araştırmalarını birleştirme konusunda çalışmaktadır. CBOL Veri Tabanı Çalışma Grubu, GenBank ve Uluslararası Nükleotit Sıra Veri Tabanı İşbirliği (INSDC) üyeleri ile birlikte, veri standardını karşılayan BARCODE'u kurmuşlardır [4]. GenBank ham dizi verilerini nadiren arşivlediği için bu veriler moleküler uygulamalar için sınırlı fayda sağlamakta ve dizi verilerinin herhangi bir kritik değerlendirmesi tam olarak yapılamamaktadır. BOLD bu zorluğun üstesinden gelmek ve bilinmeyen örneklerin tanımlanması ve güvenilir bir temel sağlamak için geliştirilmiştir [69]. BOLD analitik araçların da bütünleştirildiği, DNA barkodlama amacıyla kullanım için geliştirilmiş bir veri tabanıdır. Gerekli tüm bilgiler, numune, toplama ve kimlik bilgileri ile izleme dosyaları ve numune görüntüleri de yer alacak şekilde, deneysel veriler de dahil olmak üzere bu veri tabanında saklanmaktadır. BOLD sisteminde genetik mesafe tahminleri üretmek ve barkod sekanslarından komşu birleştirme fenogramları oluşturmak için çeşitli seçenekler mevcuttur. Halen 250.000 tür için yaklaşık 5 milyon numune barkodu bu veri tabanında bulunmaktadır.

FISH-BOL (Balık Yaşam Biçimi Girişimi), BOLD yapısı içerisinde bir portal görevi görür ve tüm balık türleri için örneklerden türetilen standart bir referans dizisi kütüphanesinin oluşturulmasında yetkili taksonomik tanımlamaları koordine etme yönünde çalışmaktadır. Analiz edilen örnekler için DNA barkodları, görüntüleri ve jeo-uzamsal koordinatları içeren elektronik bir veri tabanı şeklinde değerli bir kamu kaynağı yaratmaktadır. Bu tür bilgiler başlangıçta BOLD aracılığı ile organize ve analiz edilirler. Bu bilgi daha sonra FISH-BOL web sitesine Entegre Taksonomik Bilgi Sistemi (ITIS, bkz. [Http://www.itis.gov](http://www.itis.gov)) aracılığı ile iletilir. Bu bağlamda, FISH-BOL mevcut genomik ve balıkçılık veri tabanlarını tamamlar ve geliştirir [18]. FISH-BOL ayrıca, balık türlerinin doğal tarihi ve ekolojik etkileşimleri hakkında bilgiyi artırmak için güçlü bir araçtır [18].

International Barcode of Life (iBOL), European Concorcium for the Barcode of Life (ECBOL), Database National Center for Biotechnology Information (NCBI), International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), European Molecular Biology Laboratory (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) bu alanlarda çalışma gösteren büyük organizasyonlardır.

Belirtilen konsorsiyumlar kendi altında farklı organizasyonel yapılar bulundurarak araştırmalarını sürdürmekte ve birçok farklı canlı grubu için araştırma yapmaktadır. Deniz Yaşamı Barkodu (MarBOL), Memeli Yaşam Barkodu, Lepidoptera Yaşam Barkodu, Tüm Kuşlar Barkodlama Girişimi (ABBI) ve Formicidae Barkodu gibi farklı DNA barkodlama tanımlama organizasyonları büyük organizasyonların altında çalışan organizasyonlar olarak yer almaktadırlar. ABBI (All Birds Barcode Initiative) kuř türleriyle ilgili, FISH-BOL (Fish Barcode of Life) balık çeşitliliği ile ilgili çalışmakta, EPA (Environmental Protecting Agency) çevreyi koruma amaçlı ekosistem çeşitliliği vb. alanlarda çalışmaktadır. SIGEO (Smithsonian Tropical Research Institute), BIOCODE, ACG (Area de Conservación de Guanacaste), Lepidepteron Project, CMarZ (Marine Habitat), BioCode, Morea, OBIS vb. diğer farklı organizasyonlarda bu alanda çalışmalar yürütmektedir [18]. Var olan laboratuvarlara baktığımızda ise en önemli laboratuvar olarak CCBD (Canadian Center for DNA Barcoding) görölmektedir.

Mikroorganizmalar üzerine araştırmalar yapan ve hizmet sunan bazı veritabanları bulunmaktadır. *S. cerevisiae* için ise *Sachharomyces* Genome Database (SGD) veri tabanı genom sekanslarına ulaşılabilecek bir başka veri bankasıdır.

DNA barkodlama çalışmalarının en önemli kısımlarından biri olan ve kullanıcıların kaynaklara erişimine ve çalışmalarını sisteme eklemelerine olanak sağlayan bu konuda oldukça ileri düzeyde çalışmalar yapan, birçok uluslararası kurum, kuruluş, veri tabanı ve veri kütüphaneleri bulunmaktadır. Ülkemizde henüz DNA barkod veri tabanı içeren herhangi bir kuruluş ya da organizasyon bulunmamaktadır.

2.7. DNA Barkodlamanın Avantajları ve Uygulamaları

Organizmaların morfolojik karakterlere dayanarak tanımlanması çoğu zaman deneyimli taksonomistleri gerektiren zorlu bir süreç olarak kabul edilmektedir. Morfoloji temelli taksonomik prosedürler genellikle zaman alıcıdır ve tür seviyesine her zaman çözüm sağlamamaktadır [76-79]. Dahası, deneyimli bir taksonomicinin bakış açısı altında bile, taksonun fenotipik değişebilirliği yanlış tanımlara yol açabilmektedir [80] [81].

Son yirmi yılda, türlerin ayırt edilmesi için DNA barkodlama ile moleküler kısa standardize DNA parçalarının kullanımını önem kazanmıştır [15,31]. Bu alanda çalışma yapan kişiler tarafından DNA barkodunun geleneksel taksonomik araçlara entegrasyonunun biyoçeşitliliği tek başına geleneksel yöntemlerden daha hızlı ve daha güvenilir bir şekilde açıklayabileceği savunulmaktadır. Ayrıca, taksonomik tanımlama

kriterlerini kullanmanın zaman alıcı olduğu ve giderek daha fazla araştırmacının taksonomik uzmanlıktan uzaklaştığı vurgulanmaktadır [80] [81].

Organizmaların tür düzeyinde tanımlanması, ekonomik ve sosyal öneme sahip birçok uygulamada çok önemli yer edinmektedir. Bu gibi durumlarda, hızlı tanımlama yapılabilmesi arzu edilen bir durumdur. DNA barkodlama uygulanması, biyolojik çeşitliliği değerlendirme çalışmalarında [82], habitatları gözlemlenmede [83-84], patojen yayılımının ve ilişkili vektörlerin incelenmesinde [85], adli tıpta [86], nesli tükenmekte olan türlerin ve bunların ürünlerinin yasa dışı ticaretinin araştırılmasında [87-88], ekolojik besleme çalışmalarında [40], şifalı ve zehirli bitkilerin tespitinde [89] ve konservasyon girişimlerinde [90] kullanım alanı bulmuştur. Kriptik türler veya fenotipik plastisite nedeniyle tanımlanması zor olan taksonların çalışılmasında yararlı olmuştur [91]. DNA barkodlamanın türleri, taksonları ayırt etme ve kriptik türleri ortaya çıkarma yeteneği olduğu birçok araştırmada ortaya konmuştur. Ayrıca DNA barkodu tekniği, sadece morfolojik karakterler kullanarak tanımlanması imkânsız olan, bir türün farklı gelişimsel yaşam aşamalarını tanımaya yardımcı olmuştur.

Bu yaklaşım günümüzde yaygın bir şekilde hiphomycetesler [26], kelebekler [92], ve kuşlar [31], gibi çok hücreli organizmalar için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bazı böcek türlerinin, tanımlanamayan larva aşamalarında veya ön gelişim aşamalarında tespit edilebileceği gösterilmiştir. *Coleoptera dytiscidae* [93], *cicuria (Araneae dictynidae)* [94], trematodlar (*Digenea*) [95], ve tenya (*Cestoda*) türlerini ayırt etmek için DNA dizi verilerinin başarılı bir şekilde kullanıldığı belirtilmektedir [96].

Bir organizmanın yumurtadan tanımlanması, özellikle deniz taksonları için dağılım alanlarını veya coğrafi dağılımlarını anlamak için kritik öneme sahiptir [4]. Deniz canlılarındaki coğrafik dağılım küresel ısınmanın neden olduğu çevresel değişim bağlamında kritik öneme sahiptir. Önceki çalışmalar balık yumurtasının % 60'ından fazlasının fenotipik olarak yanlış tanımlandığını ve özellikle İrlanda balık stokları için bu hatanın diğer balıklar için stok değerlendirmelerinde önemli problemlere neden olduğunu göstermiştir [97].

Bu noktada DNA barkodlama, morfolojik taksonominin doğasında olan sorunların çözümlenmesine yönelik bir girişim olarak kabul görmektedir. Taksonomistlerin sayısının azalması ve adlandırılmış türlerin sayısının artmasıyla birlikte moleküler araçlar, modern taksonomik analizin yerini almada önemli bir araç olarak kabul görmeye başlamıştır. Moleküler taksonomik yöntemlerle türlerin belirlenmesi için sadece az miktarda dokuya (en iyi durumlarda bir tek hücre) ihtiyaç duyulur, analizler numuneyi

önceden bilmeden yapılabilmekte ve hücre gelişiminin tüm aşamalarında uygulanabilmektedir [15,98-99].

Dünyanın dört bir yanındaki büyük doğal tarih müzeleri ve herbritatlar, çok miktarda örnek barındırmaktadır. DNA barkod yaklaşımı, müze ve herbaryum örneklerine uygulanması ile bu yeni bilimin doğrulanabilir taksonomik numuneler üzerinde yüzlerce yıllık tür koleksiyonu arşivlerinden faydalanması sağlanabilir. Bu durum ayrıca, asıl görevi saklanan örnekleri tanımlamak olan deneyimli taksonomistlerin DNA barkodlama yönteminin geliştirilmesine işbirliği sağlamasına olanak sunmaktadır. Bu tür yerlerin en önemli avantajı, DNA barkodlarının, ilk önce deneyimli taksonomistler tarafından geleneksel morfoloji ile tanımlanan gerçek numunelerle bu tür çalışmaları destekleyebilmesidir [100].

Yanlış tanımlamalar geleneksel taksonomi için de bir problemdir, çünkü temel bazı karmaşıklıklar organizmaların farklı yaşam evreleri göz önünde bulundurulduğunda veya bozulmamış organizmaların yokluğunda da ortaya çıkmaktadır. Barkodlamanın tür ve çeşitliliği organizmaya ait parçalardan, yumurta veya larvadan tanımlayabilmesi, çeşitli çalışma alanları için önemli etkilere sahiptir.

Bunlarla birlikte, bu moleküler yaklaşımların da sınırlamaları vardır. Bir barkod yerinin seçimi, geniş bir takson aralığında evrensel uygulama ihtiyacı ile dizi süstitüsyon doygunluğu arasında ortaya çıkan denge nedeniyle karmaşıklaşır [54]. Bazı durumlarda, kloroplast veya mitokondriyal diziler yeterli kalmamaktadır. Örneğin mtDNA genomundaki [46], heteroplazmi ve mitokondriyal kökenli nükleer psödogenler (NUMT: çekirdekte DNA'sında yer alan mtDNA'nın işlevsel olmayan kopyaları) de yanlış tanımlara yol açabilmektedir [101].

Barkodlama teknolojisi taksonomik tanımlama iş akışı için önemli bir yardım görevi görmesine rağmen, kapsamlı taksonomik analizlerin ve moleküler filogenetiklerin yerini alamayacağı vurgulanmaktadır. Bu tekniğin birincil rolü filogenetik ağaçlar oluşturmak değil, doğrulanmamış referans materyallerin kullanımıyla tanımlanamayan organizmaların hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlamak olduğu vurgulanmaktadır [102].

2.8. DNA Barkodlama ve Koruma

Filogenetik çeşitlilik, türler arasındaki taksonomik ayrışmanın ölçülmesi, ilgilenilen alanlarda biyolojik çeşitlilik modellerinin öngörebilmesinde kullanılabilir. Bu

yönteme göre, koruma alanlarının, filogenetik çeşitliliklerine göre, alandaki türlerin sayısına göre tasarlanması veya önceliklendirilmesi gerekmektedir. DNA barkodu kullanarak nispeten hızlı ve ucuz biyoçeşitlilik değerlendirmesi gerçekleştirilebilmektedir. Morfolojiye dayalı değerlendirmeler daha fazla zaman alıcıdır, daha pahalıdır ve onlarca yıl süren eğitim gerektiren yetenekli emek gerektirir. Biyolojik çeşitliliğin korunmasında DNA barkodlarının potansiyel kullanımlarından biri kritik koruma noktaları oluşturmak için metagenomik çalışmalardan da yararlanarak biyolojik çeşitliliğin hızlı değerlendirilmesidir [41].

DNA barkodu kullanmanın en önemli uygulanan alanlarından biri, uluslararası (yasadışı) ticarete katılan nadir türlerin korunmasıdır. Örneğin morfolojik karakterlerin (balıklarda yüzgeçler, kafalar) cinsler arasında ve cins içinde ayırt etmede kullanımı zor olduğundan, ticari olarak avlanan köpekbalığı türlerini tanımlamak için COI gibi mtDNA dizilerini kullanmışlardır [50].

Maun gibi önemli ahşap türlerinin ticareti (meliaceae familyası içerisinde tehdit altında sayılan tür), DNA barkodu kullanılarak izlenmektedir. Tek başına ITS ile yapılan DNA barkodu, kriptik türleri ortaya çıkarmıştır ve Uluslararası Nesli Tükenmekte Olan Türlerin Ticaretine İlişkin Sözleşme'de (CITES) türlerin belirlenmesinde faydalı olduğu belirtilmiştir [87].

DNA barkodu, balıkçılıkta istismar edilen balık stoklarının periyodik olarak izlenmesinde ilk adım olarak önerilmektedir [24]. Balıklar için egzotik türlerin çevresel örneklerde izlenmesini, istila potansiyelinin değerlendirmesini, giriş kaynaklarının lokalize edilmesini, tekli ve çoklu girişimlerin ayırt edilmesini ve karmaşık örneklerdeki çoklu türlerin tanınmasını sağlanabileceği savunulmaktadır [21]. Av kalıntılarının mide içeriğinden belirlenmesi, DNA barkodlama için değerli bir uygulamadır. Bu bilgi balıkçılık yönetimi ve konservasyon çalışmalarına katkıda bulunabilecek tropik zincir ilişkilerini anlamak için oldukça faydalı olabilmektedir.

2.9. DNA Barkodlama Biyogüvenlik ve Halk Sağlığı

Yaygın vektörlerin yol açtığı parazit enfeksiyonlarından kaynaklanan hastalıklar ve ölümler insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır [103]. Parazitlerin taksonomik olarak tanımlanması zordur, çünkü yaşam döngüleri boyunca (larva ve/veya pupa) farklı gelişim aşamalarından geçmektedirler, birden fazla konakçı içerebilmektedirler ve bazen konakçı dokuların derinliklerinde yaşayabilmektedirler [103]. Bir konakçı, taksonomik

olarak farklı türlerden oluşan parazit topluluklarını taşıyabilir. Taksonomik belirleme, konakçı ve parazit arasındaki etkileşimlerin anlaşılması için çok önemlidir; insanları, evcil ve vahşi hayvanları etkileyen parazitler hastalıkların anlaşılmasında önemlidir[104]. Virulans ve bulaşma gibi parametreleri belirlemek için, parazit ve konak arasındaki ekolojik-evrimsel ilişkiyi anlamak çok önemlidir. Parazitin doğru taksonomik olarak tanımlanması ayrıca ana rezervuarlarının daha fazla tanınmasını ve farklı hastalıklara neden olan morfolojik olarak benzer türler arasında farklılaşmayı anlamamızı sağlar [104].

Leishmaniasis deri, mukoz membranlar ve iç organları etkileyen bir hastalıktır ve kum sinekleri tarafından taşınmaktadır. Araştırmacılar, *Lutzomyia* sinek cinsinin 20 türünün analizinde, farklı filogenetik kollara ait iki türün Leishmaniasis'i yüksek konsantrasyonda ilettiğini, insanlarda ve diğer memelilerde hastalık için vektör olarak görev yaptığını keşfetmişlerdir. Bilim adamları, iklim değişikliğinin konakçı tür ve hastalığın coğrafi dağılımını değiştirebileceğini belirtmektedirler [85].

Tropikal bölgelerde, sivrisinekler önemli patojen vektörleri temsil ederler. Yaklaşık olarak 41 farklı taksonomik grupta 3.500 tür yer almaktadır. Sivrisinekler virüslerin, nematodların ve protozoaların iletiminde vektörler olarak davrandıkları için tıbbi olarak önemlidirler. Bazı sivrisinek türleri sıtma, dang humması, chikungunya ateşi, Japon ensefaliti, sarı humma ve diğer hastalıkların yayılmasında rol oynayarak milyonlarca insanın sağlığını doğrudan etkilemektedir [49]. Afrika'da, 80 ülkede 120 milyondan fazla insanı enfekte eden lenfatik filaryazi yapan sivrisinekleri tanımlamak için DNA barkodlama kullanılmaktadır [105].

Günümüzde yaygın olarak türlerin DNA barkodları ile tanımlanmasının güvenlik açısından bir diğer önemli kullanımı, bitkisel karışımların veya preparasyonların ifşa edilmesi hususudur. Doğal kaynaklardan gelen aktif maddeler, batı tıbbının temelidir ve birçok farmasötik ilacın öncüsü olarak bilinirler. Son yıllarda, doğal şifa için şifalı bitkiler kullanan tedaviler, batı dünyasında popülerlik kazanmıştır. Çünkü bu tür tedavilerin etkinliği doğru türlerin kullanımına bağlı olarak artmaktadır [106-107]. Bu türlerin bazılarının insanlar için toksik olduğu bilinmektedir ve oldukça tehlikeli olarak kabul edilmektedir. Yanlış tanımlama, potansiyel olarak hayati tehlike arz eden zehirlenmelere neden olabilecek, karışımların, istenmeyen aktif bileşiklerin piyasada yer almasına yol açabilir [89]. DNA barkodlarının kullanılmasına, *Actaea racemosa* türünün bitkisel preparatların incelenmesi örnek gösterilebilir. ABD'de menopoz sonrası pek çok kadın

hasta, bu türden bitkisel preparatları hormon tedariki tedavisinin yerine koyar; bu bitki türleri bitki menopoz semptomlarını hafifletmek için östrojen reseptörlerine bağlanan aktif bileşenler içerir. Piyasada satılan 36'dan fazla besin takviyesinin *A. racemosa* özü içermesi gerekirken [108], dokuz tanesinin (% 25), birçoğunun farklı üç *Actaea* türünün özünü içerdiğini belirlemiştir.

Bir diğer önemli araştırma alanı ekolojik nişlerdeki tür dağılımları ve hareketlilikleridir. Bu nişler arasında istilacı yabancı türler ekosistem istikrarı ve insan geçim kaynağı için bir tehdit oluşturabilmektedirler. Turizm ve ticaretin yayılması, arazi kullanımındaki değişiklikler ve iklim değişiklikleri ile birlikte, dünyadaki egzotik türlerin hareket riski artmaktadır. Yeni ortamlara getirilen türlerin % 1'inin invaziv olacağı ve ciddi ekonomik etkilerinin olacağı tahmin edilmektedir [109]. Omurgasız zararlıların tespiti parazitlerin tanımlanması ile benzer problemler taşımaktadır; zararlı böceklerin yumurta ve larva safhalarında teşhis edilmesi neredeyse taksonomik yöntemlerle imkansız olduğu için, bazı ülkeler DNA barkodlama teşhis aracı olarak benimsemiştir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) ve Kaliforniya Gıda ve Tarım Bakanlığı (CDFA), Kaliforniya'daki belirli bir haşere türünü izlemek için DNA barkodlamayı kullanmaktadır. Örneğin açık kahverengi elma güvesi, Avustralya'dan gelen istilacı bir türdür [110].

Gıda güvenliği konusunda, DNA barkodlama işlenmiş gıda ürünleri üzerinde kullanılabileceğinden, barkodlama tekniklerinin yararlı bir şekilde uygulanabileceği diğer bir konudur. Ticari zincir boyunca ürünlerin takip edilmesi, tüketicinin güvenliği ve sağlığı için kritiktir öneme sahiptir [4].

2.10. DNA Barkodunun Eksiklikleri ve Sınırlamaları

Bazı araştırmacılar tarafından DNA barkod analizlerinin deneysel ve metodolojik tasarım açısından eksiklikleri ve kısıtlamaları bulunduğu belirtilmektedir. Metodolojik yöntem hakkındaki temel eleştiri noktası, morfolojiye dayanan klasik taksonomik yöntemlerle uyuşmayan mesafeye dayalı yöntemlerin uygulandığı yönündedir. Tek bir lokus DNA sekansından bir filogeni çıkarmanın ayırım yapmada yeterli olamayacağı yaygın olarak öne sürülen bir durumdur. Bu araştırmacılar tarafından bütün bu durumlar göz önünde tutularak DNA barkodlama yaklaşımının numunelerin ilk incelemesi için hızlı ve kolay bir yöntem olarak kullanılmasını tavsiye etmektedirler. Metodolojik açıdan bakıldığında bazı taksonlardaki COI gen bölgesi ayrışma oranları, örneğin mercan resiflerinde [111]

ve Cnidaria'da [112] yaşayan *Anthozoa* (yani mercanlar ve deniz anemonları) ve *Porifera* (süngerler) tüm filogeniyi çözmek için yeterli olmadığı belirtilmektedir [112]. Mitokondri, maternal olarak kalıtsal bir organel olduğu için, nadir görülen hibridizasyon ve introgresyon durumlarında, örneklerin yanlış tür olarak teşhis edilebildiği vurgulanmaktadır. Bu durumda tür düzeyinde teşhis mümkün olamamaktadır ve hibridler, DNA barkodlama ile aynı soydan gelen türlerden ayırt edilememektedir. Polimorfik bölgelerin çoğunlukla atasal soylardan geldiği ve bu bölgelerin seçim işaretçisi içinde ayırt edilmesi için uzun zamanın gerekli olduğu belirtilmektedir. Yakın zamanda ayrışım gösteren türler üzerinde çalışırken de benzer bir problem ortaya çıktığı belirtilmektedir [63]. Bu gibi durumlarda taksonomik yaklaşıma dayanan kesin bir teşhis hayati öneme sahip olmaktadır. Örneğin ton balığı türlerinde bildirilen mitokondriyal introgresyon vakaları bulunmaktadır, bu nedenle diğer lokuslardan (nükleer veya ribozomal) belirteçlerin bu cinslerin ayrımı için kullanılması önerilmektedir [113]. Ayrıca nükleer mitokondriyal psödogenlerin (NUMTS), nükleer psödogenler için ikame oranlarının daha düşük olması beklendiğinden yanlış tanımlamaları tetikleyebileceği öne sürülmüştür [114-115]. Bunun yanında NUMT'lerin çoğu 200 bp'den daha kısadır ve barkodlama primerleri tarafından büyütülme olasılığı düşüktür [116]. Somatik mutasyondan veya çapraz türlerin transferinden kaynaklanan heteroplasmisi de sorunlara neden olabilmektedir, çünkü bu durumlarda ayrışma oranı filogeni tarafından çıkarıldan düşük olmaktadır [117] [118].

COI gen bölgesi seçici olarak nötr bir işaretleyici bölgesi olarak kabul edilmektedir, ancak COI bölgesi çeşitliliğinin aynı zamanda örnek seçimi ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir [119]. Örneğin, Foltz ve diğ. [120] üreme ile ilgili farklılıkların COI dizi çeşitliliğini etkileyebileceğini göstermişlerdir. Türlerdeki ayrışma oranları, son seçici taramadan bu yana geçen süreyi yansıtmaktadır, seçici taramaların mtDNA için belirleyici olduğu belirtilmiştir [121]. Öte yandan, seçici süpürücüler spesifik olmayan çeşitliliği arttırmakta ve barkotlama boşluğunu daha belirgin hale getirmektedirler, bu da doğru filogeniyi geri kazanma şansını arttırmaktadır [122]. Barkodlama aralığı, tür içi ve türler arası varyasyonel farkın bir ölçüsüdür ve ayırt edici türlerin seçiminde markörün gücünü göstermektedir. Bununla birlikte, belirli bir eşik değer uygulanırsa, mevcut dizilerden bu değerden daha farklı olan numunenin yeni bir taksonu temsil ettiği varsayılmaktadır. Bu yöntem, hem yanlış pozitiflere (spesifik olmayan değişkenliği olan türlerin varlığına bağlı olarak yanlış tanımlama) hem de yanlış negatiflere (spesifik olmayan değişkenliği yüksek türlerin varlığına bağlı olarak yanlış tanımlama) açıktır.

Popülasyonun büyüklüğü ve mutasyon oranı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin bileşiminin etkili olmasından, bu tür bir eşiğin tüm hayvanlar için geçerli olduğunun varsayıp sayılmaması tartışma konusudur. Bu nedenle, türlerin keşfi için DNA barkodu oldukça tartışılabilir bir konu olduğu vurgulanmaktadır [123-124]. Genç türler veya bazı taksonlar belirgin bir barkod boşluğu bulundurmazlar [23,125-126]. Beklendiği gibi, bu alandaki boşluğun çeşitli çalışmalarda açık olduğu gösterilmektedir [30,43,127]. COI'nin gen bölgesinin ayırım konusunda diğer gen bölgeleri ile uyumsuzluğu da bildirilmiş bir durumdur. Örneğin, neogastropodların bütün mitokondriyal genomlarına dayanan bir çalışmada COI'nin en düşük filogenetik performans gösterdiğini ortaya konmuştur [128]. Böyle bir durumda, COI gen bölgesini başka bir markör ile birleştirmenin daha sağlıklı sonuçlar elde edeceği vurgulanmaktadır. Örneğin süngerler sınıfında yer alan demospongia'da yüksek derecede desteklenmiş bağlantılar veren 28S rRNA ve COI kullanılarak elde edilen sonuçların iyileştirilebileceği gösterilmiştir [129]. Öte yandan izopod familyası ve derin deniz cinsi Pseudomma ile ilgili olarak 18S ve 28S rRNA dahil diğer gen bölgeleriyle COI uyumlu vakalar da bildirilmiştir [130-131].

DNA barkodlama konusunda bir diğer eksiklik noktası olarak deneysel tasarımın eksiklikleri olduğu varsayılmaktadır. Çoğunlukla uzman taksonomistler tarafından tanımlanan ve müzelerde saklanan arşivlenmiş örnekler, DNA barkod kütüphaneleri için mükemmel bir kaynaktır. Bu numunelerin çoğu formaldehit içerisinde korunmaktadır, ancak DNA'yı formaldehit korumalı dokulardan geri kazanmak zordur, çünkü bu işlem ekstra prosedürler gerektirmektedir. Bununla birlikte, büyük barkodlama projelerinde balıklar için [132-133] ve zooplankton türleri için elde edilen barkod yapıları, formaldehit içerisinde korunan dokulardan elde edilmiştir. Veri tabanlarına yüklenen örnekler, belirli türler arası varyasyonları etkilemektedir ve belirli bir tür için toplanan örnek sayısı arttıkça, türler arası değişim sınırlarının belirsizleşebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle, iyi örneklenmiş cins, daha az kapsamlı çalışılan cinslere oranla daha düşük sapma oranlarına sahiptir. Daha fazla cins örneklendiğinde bu farkın daha az belirginleşeceği düşünülmektedir [18].

2.11. *S. cerevisiae*

S. cerevisiae, tomurcuklanarak ve askospor oluşturarak üreyen, funguslar alemi içerisinde yer alan bir maya türüdür. Eski çağlardan beri birçok ürün (bira, ekmek ve şarap) yapımında kullanılmaktadır. Tarihte ilk olarak üzüm kaynaklarından izole edildiği

tahmin edilmektedir. Günümüzde ise birçok geleneksel üründen izolasyonu yapılabilmektedir. Bu maya cinsinin suş ve türleri, olgun meyvelerin yüzeylerinde, sindirim kanallarında, böceklerin ve sıcakkanlı hayvanların vücut yüzeylerinde, toprak ve su kaynaklarında bulunabilmektedir [134]. Meyen tarafında 1838 yılında bu cins ortaya atılmış ve 1870 yılında Rees tarafından tanımlaması yapılmıştır. Bu mikroorganizma üzerindeki yapılan özellikle moleküler biyolojik çalışmalar sınıflandırılmasında önemli değişikliklere gidilmesini gerektirmiştir. Tüm ökaryotik biyoloji için önemli bir model organizma olarak kabul edilen *S. cerevisiae* farklı çalışma alanlarında kullanılan laboratuvar türleri de bulunmaktadır [135].

S. cerevisiae moleküler biyoloji alanında model prokaryot bir organizma olan *Escherichia coli*'ye benzer şekilde, üzerinde en çok çalışılmış model ökaryotik tek hücreli bir organizmadır. Optimum laboratuvar koşullarında, YPD besiyeri ortamlarında haploid suşları, yaklaşık 90 dakikada, sentetik ortamlarda ise yaklaşık 140 dakikada hücre sayısı ikiye katlamaktadır [136]. *S. cerevisiae* mayaları, en iyi 28-30 ° C sıcaklıklarda, yeterli bir besleyici kaynağın bulunduğu, aerobik koşullar altında, nötr veya hafif asitli bir pH ortamında kültürlenirler [137]. *S. cerevisiae* kültürleri genellikle YPD (yeast extract peptone dextrose) ortamında, azami hücre yoğunluğa 2×10^8 hücre/ml'ye ulaşır. Koloniler taze katı YPD ortamına yerleştirildikten 2-3 gün sonra gelişerek çıplak gözle görülebilmektedir. Bu koloniler düz, pürüzsüz, nemli, parlak, krem veya mat renktedirler. 1970 yılında bu cinsin 41 adet heterojen tür içerdiği belirtilmekteydi, 1984 yılında 7 tür daha eklenmiştir. 1985 yılında genetik analizler ile var olan türler 4 ilişkili tür grubuna ayrılmıştır fakat fizyolojik testlerde daha fazla gruba ayrılmıştır. 1990 yılında birçok alt grubu içeren 7 tür öngörülmüştür [137]. *S. cerevisiae* türünün taksonomik sınıflandırılması aşağıda (Çizelge 2.2.) verilmiştir.

Çizelge 2.2. *S. cerevisiae* taksonomik sınıflandırılması [137]

| | | | |
|-----------|-------------------------|--------|----------------------------|
| Alem; | Fungi | Takım: | Saccharomycetales |
| Şube: | Ascomycota | Aile: | Saccharomycetaceae |
| Alt Şube: | Saccharomycotina | Cins: | Saccharomyces |
| Sınıf: | Saccharomycetes | Tür: | <i>S.cerevisiae</i> |

2.11.1. *S. cerevisiae* Hücre Yapısı ve Metabolizması

S. cerevisiae hücreleri prokaryot hücrelerle karşılaştırıldığında, hücreleri bir hücre duvarı ile çevrilidir. Kalın hücre duvarı maya hücresine şeklini veren ve ona çevresel mekanik ve termik koşullara karşı koruma sağlayan esas olarak manoproteinler ve glukanlardan oluşan tabakadır. Ayrıca, bu duvar hücrenin turgor basıncı ile ozmotik patlamasını önlemektedir ve hücre zarına zarar verebilecek büyük moleküller için elek görevi görmektedir [138]. Hücre duvarı zorlu çevresel koşullara rağmen maya hücresine hayatta kalma şansı vermekte, aynı zamanda hücrenin üreme, tanıma ve besin alımı için çevre ile iletişim kurmasına izin vermektedir. Hücre duvarı, periplazmik boşlukta hücre zarına glukan ve kitin zincirleri ile bağlıdır. Ayrıca maya metabolizmasının düzenlenmesinden sorumlu çeşitli enzimler içermektedir [138].

S. cerevisiae membranlarının lipit çift tabakası, yüksek ökaryotik hücrelerin zarlarına benzer şekilde polar lipitlerden ve proteinlerden oluşur [139]. Bu nedenle, bu proteinler ya zarın bir kısmına gömülü olarak ve bir taraftan çıkıntı yaparak veya lokal olarak zarın içine gömülmüş olarak bulunurlar. Bu proteinlerin fonksiyonları amino asit ve şeker taşıyıcılardan ATPaz enzimlerinde görev almaya kadar değişiklik gösterir. Ancak, aynı zamanda hücre iskeletinin bir parçası olarakta görev yaparlar [140]. Aynı şekilde, plazma zarı hidrofilik moleküller için nispeten geçirimsiz bir bariyer oluşturur. Maya hücreleri metabolik gereksinimlerini karşılamak için, özel proteinler ile membran boyunca amino asitlerin, şekerlerin veya iyonların seçici olarak alımına ve salgılanmasına aracılık ederler. Steroller olarak kolesterolü daha yüksek bulunduran ökaryotların aksine, maya plazma zarı esas olarak ergosterol içermektedir [139]. Anaerobik koşullar altında hücre zarlarının lipit bileşimi, aerobik koşullar altında büyütülen hücrelere kıyasla farklılık göstermektedir. Anaerobik koşullarda geliştirilen hücrelerde, plazma zarı daha fazla doymuş yağ asidi, daha az toplam sterol, ergosterol ve skualen içerir. Bahsedilen bu farklılıklar, hücrenin bu bileşikleri oksijen olmadan sentezleyememesiyle açıklanmaktadır. *S. cerevisiae* hücrelerinde yeni koşullara özgü adaptasyon, temel olarak transkripsiyon düzeyinde gerçekleşebilmektedir [140].

Prokaryotlara ve bitki hücrelerine benzemelerine karşın, maya hücreleri bir veya daha fazla vakuol içerirler. Bunların önemi, maya metabolizmasında protein sentezi için gereken çeşitli enzimlerin ve amino asitlerin depolanmasında görev almalarındandır. Benzer şekilde, hücre metabolizmasının bozunma ürünleri burada vakuollerde depolanır [141]. Mayalar kemoorganotrof canlılardır, bu nedenle enerji kaynağı olarak organik

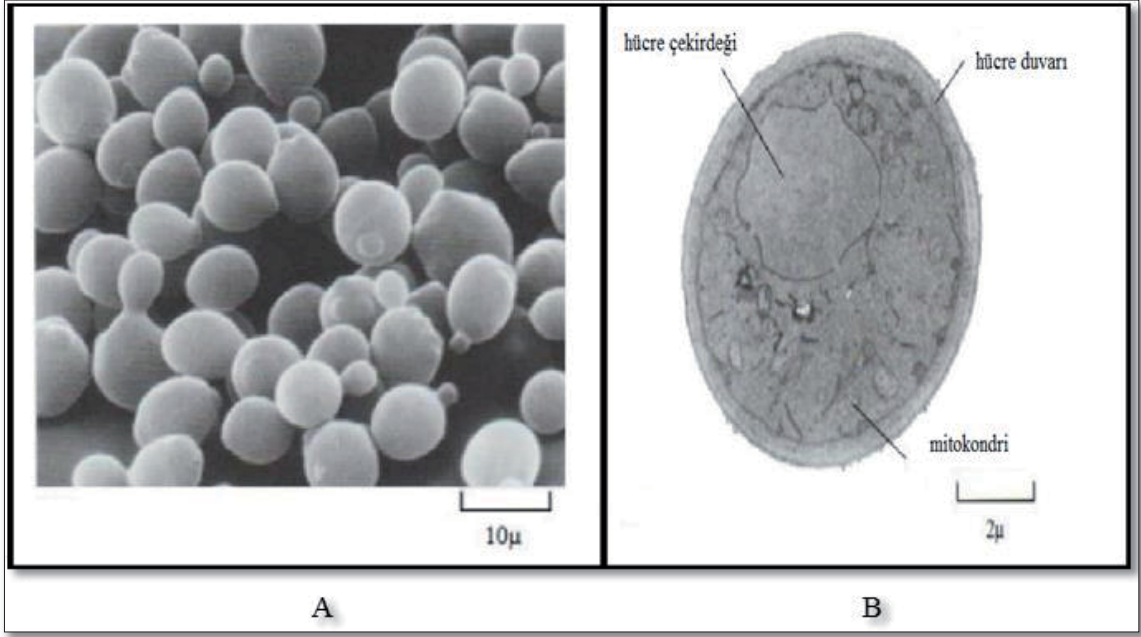
bileşikler kullanırlar ve büyümeleri için güneş ışığı gereksinim duymazlar. *Saccharomyces* cinsinin mayaları karbon ve enerji kaynağı olarak çok çeşitli şekerler kullanabilir. Şeker kullanımları hem genetik yetenek hem de düzenleyici mekanizmalarla yönetilir. Mayalarda tercihen glikoz ve fruktoz gibi heksozlar kullanılır [142]. Glikoz, glikolitik yoldan ve Krebs döngüsünden ATP şeklinde enerjiye dönüştürülen ana karbon ve enerji kaynağıdır [143]. Bir disakkarit olan sükroz ise hücre dışı enzim olan invertaz tarafından glikoza ve fruktoza hidrolizden sonra hücreye alınıp metabolize edilir. Maltoz, maltoz geçirgenliği ile hücreye aktarılır, mannaz enzimi tarafından iki glikoz molekülüne dönüştürülür ve metabolize edilir [143]. İlginç bir şekilde, sukroz, maltoz veya galaktoz gibi şekerler glikoz varlığında metabolize edilmez [142]. Bazı mayalar, özellikle gıda ve çevresel biyoteknoloji uzmanları için ilgi çekici olan, biyopolimerler, pentozlar, alkoller, polioller, hidrokarbonlar, yağ asitleri ve organik asitler gibi birtakım geleneksel olmayan karbon kaynaklarını da kullanabilirler [143]. *S. cerevisiae* fakültatif bir anaerobdur, yani oksijenle veya oksijen olmadan büyüebilir. Oksijen varlığında, glukoz CO₂, H₂O ve enerjiye dönüştürüldüğü mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyona uğrar. Anaerobik koşullarda, alkolik fermantasyonda olduğu gibi, mayalar verimli bir şekilde büyüemezler, çünkü enerjileri sadece glikolizden türetilir ve şekerler bunun yerine etanol, gliserol ve CO₂ gibi ara yan ürünlere dönüştürülür [140,143]. Daha sonra, etanol Krebs ve glikooksilat döngüleri ve ayrıca mitokondriyal elektron taşıma zinciri kullanılarak tüketilir.

Solunum ve fermantasyon süreçleri, başta glikoz ve oksijen konsantrasyonları olmak üzere çevresel faktörlerce düzenlenir. Solunumda piruvat, mitokondride asetil-CoA'ya dekarboksilize edilir. Son aşamada Krebs döngüsünde tamamen maya büyümesini teşvik etmek için CO₂, enerji ve ara maddelere oksitlenir [143]. Glikoz konsantrasyonları yeterince yüksek olduğunda, solunumda kullanılan enzimler bastırılır ve fermentasyon solunumun yerini alır [143]. Etanol bir kez oluştuğunda, büyüme ortamına ayrıca gliserol, asetik asit, H₂S ve esterler gibi diğer fermantasyon yan ürünleri de salgılanır. Son olarak, N, P, S, Fe, Cu, Zn ve Mn gibi elementler tüm mayalar için zorunludur ve genellikle büyüme ortamına eklenmeleri gerekmektedir[144]. Mayaların çoğu doğrudan amonyum iyonlarını ve üreyi özümseyebilirken, çok az sayıda tür nitratları azot kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Fosfor ve kükürt genellikle sırasıyla inorganik fosfatlar ve sülfatlar şeklinde emilirler [143]. *S. cerevisiae* klasik tanımlama özellikleri ve gıda endüstrisinde kullanım alanları aşağıda (Çizelge 2.3.) verilmiştir [145].

Çizelge 2.3. *S. cerevisiae*'nin klasik tanımlama yöntemleri (A), gıda endüstrisindeki yaygın kullanım alanları (B) [137].

| A. Klasik Tanımlama Yöntemleri | B. Yaygın Kullanım Alanları |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Makroskobik Tanımlama | ✓ Ekmek mayası olarak kullanım |
| ✓ Beyaz kremi | ✓ Fırıncılık sektörü |
| ✓ Pürüzsüz yüzey | ✓ Bira üretimi |
| ✓ Dairesel koloniler | ✓ Etil alkol üretimi |
| Mikroskobik Tanımlama | ✓ Şarap üretimi |
| ✓ Küresel hücreler | ✓ CO ₂ üretimi |
| ✓ Dağınık tek hücre veya üzüm salkımı | ✓ Vitamin,mineral,protein üretimi |
| ✓ Gram pozitif | ✓ Biyokütle üretimi |
| Biyokimyasal Tanımlama | |
| ✓ Sakkaroz testi | |
| ✓ Glukoz testi | |
| ✓ Laktoz testi | |
| ✓ Trehaloz testi | |
| ✓ Galaktoz testi | |
| ✓ Maltoz testi | |
| ✓ Nitrat indirgem testi | |
| ✓ Sellobiyoz testi | |

S. cerevisiae, ökaryotik bir hücre yapısına sahip olduğundan metabolizma açısından bitki ve hayvan hücreleriyle benzer ilişkilere sahip olan küçük, tek hücreli bir organizmadır [141]. Ökaryotlara kıyasla, birçok temel hücresel işlem membrana bağlı organeller üzerinden gerçekleştirilir. Plazma zarı, hücre bileşenlerini dış ortamdan ayırırken, nükleer zar, genetik materyali kaplar ve korur [146]. Ayrıca, mitokondrial membran metabolik enerji oluşumunda rol alırken, endoplazmik retikulum (ER) ve golgi cisimciği protein ve lipid sıralama ve sentezinde rol oynar. Benzer şekilde, vakum ve peroksizomal membranlar özel metabolik ve sindirim fonksiyonlarını yerine getiriler [139]. Maya hücresinin bir başka önemli özelliği de, ökaryot grubun bir üyesi olarak hücre iskeletine sahip olmasıdır. Bu hücre içi ağ, hücreyi mekanik olarak destekler ve hareketine izin verir ve iki tip aktin filamentinden oluşur: aktin kabloları (uzun aktin filamentleri demetleri) ve aktin yamaları (hücre zarı ile ilişkili küçük filament toplulukları). Benzer şekilde, hücrenin aktin hücre iskeletinin yönü, ana hücreden küçük bir yavru hücre oluşturmak için tomurcuklanma yoluyla bölünme biçiminde belirgin olan asimetrik bölünmeye izin verir [141,144].



Şekil 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* (A) hücre kümesinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü. (B) hücreye ait çekirdek, mitokondri ve kalın hücre duvarını gösteren, bir maya hücresinin enine kesitinin transmisyon elektron mikroskobu görüntüsü [141]

2.11.2. *S.cerevisiae* Hücre Döngüsü

S. cerevisiae, genellikle diploid formunda bulunmaktadır fakat hem haploid hem de diploid hücreler olarak bulunabilirler [147]. Haploid ve diploid hücrelerin boyutları, büyüme evresine bağlı olarak ve suştan suşa değişmektedir. Tipik olarak, diploid hücreler 5 x 6 µm elipsoidal şekle sahiptirler ve haploid hücreler ise yaklaşık 4 µm çapa sahip sferoid şekildedirler [136]. Üstel büyüme sırasında, haploid kültürler diploid kültürlerden daha hızlı ürerler. Yeterli besin verilirse, hem haploidler hem de diploidler tekrarlanan vejetatif büyüme ve mitoz döngüsüne geçerler [146]. Mayaların vejetatif hücre bölünmesi karakteristik olarak, bir yeni hücrenin ana hücreden bir çıkıntı olarak başlatıldığı tomurcuklanma, ardından nükleer bölünme, hücre duvarı oluşumu ve son olarak hücre ayrılması ile oluşur. Ayrıca haploid hücrelerin öncekine bitişik görünen tomurcukları bulunurken, diploid hücrelerin zıt kutuplarda görünen tomurcukları vardır. Her bir ana hücre genellikle 20-30 tomurcuktan daha fazlasını oluşturmaz ve yaşı, hücre duvarında kalan tomurcuk izlerinin sayısına göre belirlenebilir [136]. Zayıf bir karbon kaynağına maruz kalan düşük azotlu ortamlarda diploid hücreler, dört haploid spor (ascus) üreten mayoz ve sporülasyona maruz kalırlar. Sporlar aşırı çevresel koşullara karşı büyük bir

dirence sahiptir. Sporlar zengin besin koşullarına yerleştirilirse, haploidler olarak çimlenir ve büyümeyi başlatırlar [146]. Cinsel üreme mayanın normal biyolojisinde de çok önemlidir. Haploid sporlar a veya α olmak üzere iki çiftleşme tipinden biri olarak mevcut olabilir. Çiftleşme tipi a haploitleri, “a” faktör feromon üretirken, α çiftleşme tipi, “ α ” faktörü feromon üretmektedirler. Bu türlerin her ikisi de daha fazla haploid hücre üretmek için tomurcuklanabilir. Her bir hücre tipi, karşıt çiftleşme tipindeki hücreler tarafından üretilen feromon için bir hücre yüzey reseptörüne sahiptir. Bu faktör a haploidlerinin hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur ve α faktörü hücreler üzerinde aynı etkiye sahiptir [146].

Sonuç olarak, birbirlerinin varlığında, zıt çiftleşme tipine sahip haploidler çoğalmayı keser ve birbirlerine doğru çıkıntıların gelişimini başlatırlar. Sonunda, bir diploid oluşumuyla sonuçlanan hücreler arası temas ve ardından hücre füzyonu oluşmaktadır [146].

2.11.3. *S. cerevisiae* Hücre Genetik Yapısı ve Fonksiyonu

Tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*, tüm genom sekansı belirlenen ilk ökaryotik organizmadır. Genom, 16 kromozom haploid kümesinde organize edilen yaklaşık 12052 kb'den oluşur [136]. Tüm ökaryotların bir özelliği olan DNA, çekirdek içinde konsantre halde bulunur ve replikasyon döngüsü sırasında kromozomlara ayrılır. Nükleer DNA, 6183 açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. Bunların yaklaşık 5800'ünün gerçek protein kodlama genlerine, tRNA için 275 kodun, snRNA'lar için 40 kodun ve kromozom 12 üzerindeki rRNA için 140 gen kodunun görev aldığı tahmin edilmektedir. Çok hücreli organizmaların genomlarının aksine, maya genomu toplam sekansın % 72'sini temsil eden genlerle oldukça kompakt olarak bulunmaktadır. Genomun yaklaşık % 4'ü intronlardan oluşmaktadır [148]. Proteinleri kodlayan genler arasında proteomun % 11'i metabolizmada, % 3'ü enerji üretimi ve depolanmasında, % 3'ü DNA replikasyonda, % 7'si transkripsiyonda ve % 6'sı translasyonda görev alır. Hücreler arası haberleşmeye yaklaşık 430 protein katılmaktadır ve 250 protein yapısal rollere sahiptir [148]. Tüm protein kodlayan genlerin maya genomunda belgelenmesine rağmen, hala bilinmeyen bir işlevi olan genlerin önemli bir yüzdesi bulunmaktadır. Bunların yaklaşık yarısı ya karakterize edilmiş bir protein sınıfının farklı bir motifini içerir veya maya ya da diğer organizmalardan fonksiyonel olarak karakterize edilen gen ürünleri ile yapısal olarak ilişkili proteinleri kodlayan genlere karşılık gelmektedir [149]. *S. cerevisiae*'nin

çoğu suşunda genetik materyalin bir parçası olarak, 2-µm dairesel plazmidlerinin varlığı kendi replikasyon sürecinde işlev gördüğü yönündedir [149]. Tam genom rekonstrüksiyonundan faydalanılarak, son biyokimyasal ve fizyolojik bilgiler ışığında, *S. cerevisiae*'nin metabolik ağı yeniden yapılandırılmıştır. Toplam 708 ORF'in olası 1035 metabolik reaksiyon gerçekleştirme sürecinde yer aldığı belirtilmiştir [150]. Bu reaksiyonların % 85'inden fazlası sitoplazmik veya mitokondriyal membran boyunca iç ve dış taşınımı içerirken, diğer reaksiyonlar esas olarak amino asitlerin, nükleotidlerin ve vitaminlerin metabolizmasında rol oynar [150]. Ayrıca, ORF'lerin çoğu, aerobik solunumun son aşamaları olan elektron taşıma zincirinde ve kompleks karbonhidratların parçalanmasında yer aldığı belirtilmektedir [150]. Mitokondriyal genler ve bunların mozaik intronik yapısı ilk olarak *S. cerevisiae*'de tanımlanmıştır ve ilk dizilen mitokondriyal gen bu organizmadan elde edilmiştir. Bununla birlikte, bilinen maya mtDNA dizisi hala eksiklikler barındırmaktadır ve birçok hata içermektedir [151]. *S. cerevisiae*'den mitokondriyal genom, düşük gen yoğunluğu ve yüksek oranda heterojen baz kompozisyonu ile karakterize edilmektedir. A + T içeriği yüksek oranda temsil edilirken, G + C içeriği genlerin toplam baz çiftlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır [151]. Genom sekansı yaklaşık 85000 baz çift uzunluğundadır ve mitokondriyal translasyon yapısının bileşenlerini kodlayan 10 gen ve mitokondriyal proteinlerin yaklaşık % 15'ini içeren yedi intronla ilişkili ORF'ler içermektedir [149]. ORF'lere ek olarak, genomda sitokrom c oksidaz alt birimleri, ATP sentaz alt birimleri, apositokrom b ve ribozomal protein için genler yer almaktadır [151]. Mitokondriyal DNA'dan tamamen yoksun olan maya suşları rho^o mutantları olarak bilinmektedirler. Rho^o mutantların genleri, mitokondriyal ribozomlar üzerinde sentezlenen solunum polipeptitlerinde, yani sitokrom b ve sitokrom oksidaz, ATPaz komplekslerinin alt birimleri eksiktir. Rho^o mutantları solunum yetersizliğine ve morfolojik olarak anormal olmasına rağmen, yaşayabilmekte ve hala mitokondrileri bulunmaktadır [149]. *S. cerevisiae* ayrıca bağımsız bir replikon gibi davranan ve Mendel tipi genetik aktarıma sahip olmayan bir genetik eleman olarak kalıtsal olan bir RNA bağımlı RNA-polimerazı kodlayan 20S dairesel tek iplikli RNA içerir [149]. Sadece kromozomal genlerin mutasyonları, heterozigos diploidlerin sporlanmasından sonra tetratlarda Mendelian (mendel yasalarına uyan ayırım) ayırımı gözlemlenmektedir. Bu özellik kromozomal sentromerlerin ayrışmasına bağlı bir durumdur. Buna karşın, diğer nükleik asitlerin yokluğu veya değiştirilmesiyle ilişkili fenotiplerde Mendel olmayan kalıtım görülür [149]. Maya araştırma topluluğu *S. cerevisiae*'nin tam genom sekansı bilgisinden

yararlanan ilk organizasyondur. Daha sonra diğer model organizmalar için de genom sekansları mevcut hale gelmiştir [152]. Maya, kurt, sinek, fare ve insan genomları arasındaki bütün genom sekanslarının karşılaştırmalı analizleri, evrim sekans değişimi ve fonksiyonların korunma seviyesinde incelenmiştir. En azından proteinler için sekans benzerliğinin genellikle fonksiyonel benzerliğin açık bir şekilde değerlendirilmesine yol açtığı açıkça ortaya çıktığından, moleküler biyolojide “büyük bir birleşme” olmuştur.

2.11.4. *S. cerevisiae* Hücrelerinin Morfolojik ve Fizyolojik Karakterleri

Yaşlanma süreci, farklı hücresel büyüme seviyelerinde birçok dönüşüm içerir. Sonuç olarak, morfolojik ve fizyolojik değişiklikler, sonuçta hücre fenotipinin değişmesinin en önemli nedeni olarak ortaya çıkar. Ölüm aşamasına yaklaşan yaşlanan anne maya hücreleri, genç hücrelere kıyasla görünüm ve fizyolojide çarpıcı değişiklikler göstermektedir. Gözlenebilir özelliklerden biri, eski hücrelerin genç hücrelere göre çok daha büyük olması ve hücre büyüklüğünde ki bu büyük farktır. Ayrıca, hücre bölünmesi döngüsü, yeni hücreye kıyasla uzar, eski hücrelerin hücre iskeleti çökmüş gibi görünür ve sonuçta normal noktalar ve filamentler yerine yamalı aktin filamentleri görüntülenir [146]. Düzensiz hücre bölünmesi döngüleri nedeniyle, bu hücrelerin bazıları nükleer fragmentasyon veya endomitozise bağlı olarak bir veya daha fazla çekirdek görünürken, çekirdek kromatinleri normal görünümdeki kompakt tek çekirdek gösteren genç hücrelerin aksine daha yaygın görünür [146]. Ek olarak, yaşlı hücrelerde esas olarak mitokondriyal kökenli olan ROS (reaktif oksijen türleri) konsantrasyonunu arttırmaktadır. Son olarak, yaşlanan hücreler, fosfatidilserin maruziyeti, nükleer DNA parçalanması ve kromatin marjinalleşmesi gibi apoptotik fenotipler gösterirler [153]. Besinler tükendiğinde normal hücre boyutundaki maya, durağan faza ulaşacaktır. Açlık yanıtı, hücresel metabolizmada genetik olarak kontrol edilen bir değişikliğe yol açar. En belirgin olanı, glikojen ve trehaloz gibi rezerv karbonhidratların metabolizasyonudur. Ayrıca, sabit fazdaki hücreler daha kalın ve daha sert hücre çeperi oluştururlar. Glikojen açlıkta yavaşça bozulur, ancak hayatta kalan hücreler açısından trehaloz membran stabilizasyonu ve diğer metabolik olmayan fonksiyonlar için önemli gibi görünmektedir [153]. Aynı şekilde, protein sentezi yavaşlar ve hücre yüzeyi gevşek ve kırışmış bir görünüme sahip olur [153]. Sabit fazda maya hücreleri iki ayrı hücre popülasyonu şeklinde düşünülebilir: “sakin” ve “sakin olmayan” hücreler. Sakin popülasyon, düşük metabolik aktiviteye sahip ve bölünmemiş bir G₀ durumunda tutuklanan ayrılmayan

hücreleri temsil eder. Bu hücreler sadece iki fazlı büyüme eğrisindeki son hücre bölünmesi sırasında oluşturulurlar. Normal maya hücrelerinden daha yüksek bir yoğunluğa sahip olan ve sukroz gradyanlarındaki sakin olmayan sabit hücrelerden ayrılabilen yavru hücreler olarak tanımlanmaktadırlar. Aksine, sakin olmayan hücreler yüksek ROS seviyelerini gösteren ve son olarak apoptozise uğrayan hücrelerdir [153]. Ayrıca, hasarlı hücre materyal, artan miktarda ROS üreten hasarlı mitokondriye atfedilir. ROS üreten mitokondri, tercihli olarak yaşlanan hücrelerde bulunur. Aksi halde, eski mitokondrinin çoğunlukla ana hücre tarafından herhangi bir hücre bölünmesinde kalıtılması gerektiği, ancak yeni sentezlenen mitokondrinin yavru hücreye ayrılması gerektiği yönünde bir düşünce vardır [154]. Ek olarak, uzun bir süre sonra, sakin hücreler de apoptozis işaretlerini göstermeye başlar. Genel olarak, yaşlı anne hücrelerinde ve durağan kültürlerde fenotipler ve yaşlanma nedenleri çok farklı görünmektedir [154]. Maya anne hücresine özgü yaşlanma yoğun olarak araştırılmıştır. Bu işlem, hücre ve organizma yaşlandırması için basit bir model sistemi temsil eder, bu nedenle yüksek hücrelerin yaşlanmasına iyi karakterize edilmiş morfolojik ve fizyolojik değişiklikler açısından benzerlik gösterir. Bununla birlikte, hücre içi oksidatif stresin yanı sıra apoptotik ve nekrotik özelliklerin artması, iki yaşlanma sürecinde ortak görünmektedir [153].

2.12. Dünyada ve Türkiye’de Kültür Koleksiyonları

Biyoteknolojik proseslerde ve araştırmalarda kullanılan mikroorganizmaların yer aldığı kaynaklar genel olarak uygulamaya yönelik izolasyonlar ve kültür koleksiyonları olarak tanımlanabilir. Ülkemizde üretimde kullanılan suşlar genellikle yurt dışındaki kültür koleksiyonu, ticari kültürler veya işletmelerin kendi ürünlerine yönelik yaptıkları izolasyonlardan elde edilen kültürlerden oluşmaktadır. Ülkemizdeki ve dünyadaki kültür koleksiyonları karşılaştırıldığında dünyada birçok büyük çaplı kültür koleksiyonu organizasyonu yer almaktayken ülkemizi bu konuda dünyanın gerisinde kaldığı gözlemlenmektedir. Dünyada ilk olarak 1962 yılında Dünya Kültür Koleksiyonu Organizasyonu (WFCC) kurulmuştur. Bu organizasyon Uluslararası Birleşik Biyolojik Bilimler ve Birleşik Mikrobiyoloji Cemiyetleri içerisinde yer almakta olup ilk çalışmalarına Avustralya’da başlamıştır. Günümüzde ise merkezi Japonya’dadır. Tüm dünya üzerinde bu kuruluşa 65 ülke ve 489 kültür koleksiyonu üye olarak bulunmaktadır. Üye olan koleksiyonlardan 168’i devlet, 142’si üniversite, 33 tanesi yarı özel yarı devlet,

7'si endüstri, 20'si özeldir. Bütün bu koleksiyonların tamamında 1152175 mikroorganizma türü saklanmaktadır. Türkiye'de ise WFCC'ye üye olan altı koleksiyon bulunmaktadır ve 3721 suş saklamaya alınmıştır [155-156].

Avrupa Kültür Koleksiyonları Birliği (ECCO), Avrupa'da yer alan kültür koleksiyonlarına danışmanlık yapmak ve koleksiyonlar arası işbirliğini desteklemek için 1981'de kurulmuştur. Gönüllü hizmet veren bu kuruluşun merkezi şu anda Almanya'dadır. ECCO kendi üye kültür koleksiyonlarının tanıtımını yapmaktadır. ECCO'nun kendisi de bir WFCC üyesidir. ECCO 1994 yılında kendi içerisinde almış olduğu karar ile yurtdışına ihraç edilen suşların biyolojik silah olarak kötüye kullanımını kontrol etmek amacı ile alınan kararlar doğrultusunda Avrupa ülkelerinden suş satan-alan kişiler/kurumlar arasında karşılıklı anlaşmalar yapılmasını şart koymaktadır. Ayrıca her ülkenin kendine ait yasaları ile de ülkeye giriş çıkış yapan mikroorganizmaların kontrolü sağlanmaktadır. ECCO'ya şu anda 22 Avrupa ülkesi ve 62 kültür koleksiyonu üye olarak bulunmaktadır [156-157].

Türkiye'de Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK), Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS) ve Hayvan Hücrelerinin Kültür Koleksiyonu (HÜKÜK) ECCO üyesi koleksiyonlardır. RSKK Türkiye'de ilk olarak kurulan kültür koleksiyonudur. Günümüzde RSKK'nın elinde 1305 değişik suş bulunmaktadır. Bunlar, bakteriler, mayalar olmak üzere 300 farklı türe aittir. RSKK'da Türkiye açısından epidemiyolojik önemi sahip olan suşlar, standart ve referans suşlar, birçok biyolojik madde üretiminde, farklı bilimsel araştırmalarda, eğitim amaçlı ve farklı endüstri alanlarında kullanılan suşlar yer almaktadır. RSKK 2002 yılında "Dünya Kültür Koleksiyon Federasyonu" (WFCC) üye olmuştur. Ayrıca "Mikroorganizma Dünya Bilgi Merkezi" nin " (WDCM) 828 numaralı üyesidir. Avrupa Kültür Koleksiyonu Organizasyonu'na ise 2003 yılında üyeliği gerçekleşmiştir. Türkiye'de Dünya Kültür Koleksiyon Federasyonu'na üye olan başka kültür koleksiyonları arasında, "Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu Araştırma ve Uygulama Merkezi", "Hayvan Hücrelerinin Kültür Koleksiyonu", "TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Kültür Koleksiyonları", "Muğla Üniversitesi Kültür Koleksiyonu", "Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu" yer almaktadır [158].

Dünyadaki kültür koleksiyonları içerisinde başta Amerika ATCC (American Type Culture Collection) olmak üzere, Alman, Kanada, Japon, Fransız ve diğer birçok büyük kültür koleksiyonlarında *S. cerevisiae* mayasının çok fazla sayıda suşları mevcut bulunmaktadır. Ülkemizdeki kültür koleksiyonlarında ise bu mayanın suşları yetersiz

denecek sayılardadır. Ülkemizdeki üniversitelerde araştırmacıların izole ettiği *S. cerevisiae* suşlarının birçoğu ise tür tespiti yapılmamış ve kayıt altına alınmamıştır [156,158].

2.13. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *E. coli* veya maya gibi canlı bir organizma kullanmadan *in vitro* koşullarda DNA'nın enzimatik olarak kopyalanması için yeni, popüler bir moleküler biyolojik tekniktir. Bu teknik az miktarda DNA molekülünün logaritmik bir şekilde birçok kez çoğaltılmasına izin verir. Daha fazla DNA mevcut olduğunda, analizler daha kolay bir şekilde yapılabilir [159]. PCR tekniği 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir [159]. PCR tekniği sekanslamada kullanmak için DNA'yı çoğaltmayı, DNA-bazlı filogeni veya genlerin fonksiyonel analizini, kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması (adli bilimlerde ve babalık testlerinde kullanılan), ve bulaşıcı hastalıkların (enfeksiyon hastalıkları HIV, CMV, mikoplazma, zatürre, kanser, lösemi ve lenfoma kanseri, frengi, mantar ve protozoal hastalık, hepatit) tespiti ve teşhisi gibi çok çeşitli deneylerin ve analizlerin gerçeleştirilmesinde kullanılmaktadır [160].

1993 yılında Mullis ve Michael Smith, PCR ile ilgili çalışmaları için Kimyada Nobel ödülü almışlardır. PCR, genellikle bir termal döngüleyicide küçük reaksiyon tüplerinde küçük reaksiyon hacimleri (0.2-0.5 ml) içerisinde gerçeleştirilir. Termal döngüleyici, reaksiyonun her aşamasında gereken sıcaklıkları elde etmek için reaksiyon tüplerini ısıtır ve soğutur. Birçok modern termal döngüleyici, PCR tüplerini tutan bloğun sadece elektrik akımını tersine çevirerek hem ısıtılmasını hem de soğutulmasını sağlayan Peltier etkisinden yararlanır. Çoğu termal döngüleyici, reaksiyon tüpünün üstünde yoğuşmayı önlemek için ısıtılmış kapaklara sahiptir. Isıtılmış bir kapağı olmayan daha eski tip PCR çeşitleri reaksiyon karışımının üstünde bir yağ tabakası veya tüpün içinde bir balmumu topu gerektirmekteydi [159].

2.13.1. PCR Kullanımı

PCR, bir DNA zincirinin kısa, iyi tanımlanmış bir bölümünü büyötmek için kullanılır. Bu tek bir gen veya genin sadece bir kısmı olabilir. Canlı organizmaların aksine, PCR işlemi sadece kısa DNA fragmanlarını kopyalayabilir; genellikle 10 kb'ye kadar. Bazı özel

yöntemler, ökaryotik bir hücrenin kromozomal DNA'sından çok daha az olan 40 kb boyutunda fragmanları da kopyalayabilir.

Bir PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için bazı temel bileşenler gerekmektedir [159].

Bunlar;

- ✓ Büyütülecek DNA parçasının bir bölgesini içeren DNA şablonu veya cDNA
- ✓ Büyütülecek bölgenin başlangıcını ve sonunu belirleyen primerler
- ✓ Taq polimeraz veya DNA-Polimeraz (büyütülecek bölgeyi kopyalamada kullanılacak enzimler)
- ✓ Yeni DNA'nın oluşturulmasında kullanılacak nükleotidler
- ✓ DNA-Polimeraz için uygun bir kimyasal ortam sağlayan tampon çözeltiler.

PCR reaksiyonu bir termal döngüleyicide gerçekleştirilir. Bu döngüleyici sistem, içindeki reaksiyon tüplerini, reaksiyonun her aşaması için gereken tam sıcaklığa kadar ısıtan ve soğutan bir makinedir [159].

2.13.2. Primerler

Büyütülecek DNA parçası, primerlerin seçilmesiyle belirlenir. Primerler çoğaltılacak DNA fragmanının başlangıcına ve sonuna bağlanan tamamlayıcı olan kısa (genellikle 18-25 bp) zincir uzunluğundaki nükleotitlerdir. Yeni DNA zincirinin bağlandığı ve sentezlendiği başlangıç ve bitiş noktalarındaki DNA şablonuna yapışırlar. PCR işlemi, yirmi ila otuz beş döngüden oluşan bir seriden oluşur. Bu döngülerin her biri üç adımdan oluşur[159].

- ✓ İpliklerin ayrılması için çift iplikli DNA'nın 94-96 °C'ye ısıtılması gerekir. Bu adım denatürasyon denir. Yüksek sıcaklık etkisi ile iki DNA zincirini birbirine bağlayan hidrojen bağlarını kopmaktadır. Birinci döngüden önce, hem şablon DNA'nın hem de primerlerin tamamen ayrıldığından emin olmak için uzun süre (1-2 dakikadan 5 dakikaya kadar) denatürasyon gerçekleştirilir. Ayrıca Taq-polimeraz bu aşamada aktive edilir.
- ✓ DNA iplikçiklerinin ayrılmasından sonra, sıcaklık düşürülür böylece primerler kendilerini tek DNA iplikçiklerine bağlayabilirler. Bu adıma tavlama veya yapışma evresi denir. Bu aşamadaki sıcaklık primerlere bağlıdır ve genellikle erime sıcaklığının 5 °C altındadır (genelde 45-60 °C). Tavlama adımı sırasında

yanlış bir sıcaklık, primerlerin şablon DNA'ya hiç bağlanmamasına veya rastgele bağlanmaya yol açabilir. Bu aşamada gerekli olan süre 1-2 dakika aralığındadır.

- ✓ Son olarak, DNA-Polimeraz çoğaltma işlemini gerçekleştirir. Polimeraz enzimi tavllanmış primerden başlayarak ve DNA zinciri boyunca ilerler. Bu adım uzatma olarak adlandırılır. Uzatma sıcaklığı, DNA-Polimeraz'a bağlıdır. Bu adımın süresi hem DNA-Polimerazın kendisine hem de çoğaltılacak DNA fragmanının uzunluğuna bağlıdır.

PCR ürünü fragman büyüklüğü agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlenir. Agaroz jel elektroforezi, DNA'nın agaroz jel içine enjekte edilmesinden ve jele bir elektrik akımı uygulanmasından oluşan bir prosedürdür. Sonuç olarak, daha küçük DNA iplikçikleri, jel boyunca daha büyük iplikçiklerden pozitif akıma doğru daha hızlı hareket eder. PCR ürününün boyutu, aynı zamanda jelin içinde, bilinen büyüklükte DNA parçalarını içeren bir DNA merdiveni ile karşılaştırılarak belirlenir. [159].

2.13.3. Farklı Amaçlara Yönelik Kullanılan Özel PCR Türleri

➤ Nested PCR

Nested PCR, beklenmedik primer bağlama bölgelerinin amplifikasyonu nedeniyle ürünlerdeki kontaminasyonları azaltmak için tasarlanmıştır. Ardışık iki PCR çalışmasında iki primer seti kullanılır; ikinci set, ilk çalıştırma ürünü içinde ikincil bir hedefi büyütmeyi amaçlar. Bu çok başarılı, ancak ilgili diziler hakkında daha ayrıntılı bilgi gerektiren bir PCR türüdür [161].

➤ Ters PCR

Ters PCR, yalnızca bir dahili dizi bilindiğinde PCR yapılmasına izin vermek için kullanılan bir yöntemdir. Bu, özellikle çeşitli genomik sekansların yan dizilerinin tanımlanmasında yararlıdır. Bu, yöntem bir endonükleaz ile kesmeden önce bir dizi parçalama ve kendi kendine ligasyon işlemlerini içerir. [162].

➤ RT-PCR (Ters Transkripsiyon PCR)

Ters Transkripsiyon PCR, bir hücre veya doku içerisinde RNA kütüphanesi bilinen bir sekansı büyütme, izole etme veya tanımlama için kullanılır. Esas olarak, Ters transkriptaz (RNA'yı cDNA'ya dönüştürmek için) tarafından transkripsiyonla önceden

hazırlanmış PCR, belirli genlerin ne zaman ve nerede eksprese edildiğini belirlemek için ekspresyon haritalamasında yaygın olarak kullanılır. [162].

➤ **Asimetrik PCR**

Asimetrik PCR, orijinal DNA'nın bir sarmalını diğerine tercihen daha fazla çoğaltmak için kullanılır. İki tamamlayıcı iplikten sadece birisinin ideal olduğu bazı sıralama ve hibridizasyon çalışmalarında kullanım bulmaktadır. PCR her zamanki gibi yapılır, ancak seçilen iplik için primerlerin çok fazla olması ile gerçekleştirilir. Sınırlayıcı primer tutulduktan sonraki reaksiyonda daha sonra yavaş (aritmetik) yükselme nedeniyle, ilave PCR çevrimleri gerektirir. "LATE-PCR" olarak bilinen işlemde yapılan son bir değişiklik, sınırlayıcı primer konsantrasyonu azaldıkça reaksiyon verimini korumak için fazla primerden daha yüksek erime sıcaklığına (T_m) sahip sınırlayıcı primer kullanımı gerektirir [163].

➤ **Kantitatif PCR (Q-PCR)**

Kantitatif PCR, PCR ürününün (tercihen gerçek zamanlı) miktarını hızlı bir şekilde ölçmek için kullanılır, dolayısıyla başlangıç DNA, cDNA veya RNA miktarlarını nicel olarak ölçmek için dolaylı bir yöntemdir. Bu PCR tipi yaygın olarak, bir sekansın olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılır ve numunedeki kopya sayısını gösterir [164].

➤ **Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RTQ-PCR)**

Genellikle kafa karıştırıcı olarak RT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR) olarak bilinir. QRT-PCR veya RTQ-PCR daha uygun kısaltmalardır. Bu yöntem, büyütülmüş ürünün miktarını gerçek zamanlı olarak ölçmek için floresan boyaları ve problemleri kullanır [165-166].

➤ **Touchdown PCR**

Touchdown PCR, döngüleri arasındaki tavlama sıcaklığını düşürerek spesifik olmayan primer bağlanmasını azaltan bir PCR çeşididir [167].

➤ **Koloni PCR**

Bakteriyel klonlarda (*E.coli*) doğru ligasyon ürünleri taranması için kullanılır. Seçilen koloniler bir agaroz plakasından steril bir öze ile toplanır ve ana karışım veya steril suya

yerleştirilir. Primerler (ve ana karışım) eklenir - PCR protokolünün 95 °C'de uzun süre başlatılması gerekir [168].

➤ **Allele Özgü PCR:**

Tek nükleotid Polimorfizmlerine (SNP'ler) dayanan bir teşhis veya klonlama tekniğinde (DNA'daki tek baz farklılıkları) kullanılır. Alleller arasındaki farkları içeren bir DNA sekansı hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirir ve 3 'uçları SNP'yi kapsayan primerleri kullanır. Sıkı koşullar altında PCR amplifikasyonu, şablon ve primer arasındaki uyumsuzluk varlığında çok daha az etkilidir, bu nedenle SNP'ye özgü bir primer ile başarılı amplifikasyon, bir sekansta spesifik SNP'nin varlığını işaret eder [169].

➤ **Polimeraz Döngü PCR (PCA-Assembly or Polymerase Cycling Assembly)**

Kısa üst üste binen segmentleri olan uzun oligonükleotitlerin bir havuzu üzerinde PCR gerçekleştirerek uzun DNA sekanslarının yapay sentezini sağlar. Oligonükleotitler, hassasiyet durumlarına göre geçiş yapar ve örtüşen bölümler, PCR fragmanlarının sırasını belirler, böylece nihai uzun DNA ürünü seçici olarak üretilir [170].

➤ **After-The-Exponential PCR (LATE PCR)**

(LATE-PCR) olarak bilinen bu PCR tipinde sınırlayıcı primer konsantrasyonu orta reaksiyonu azaltırken, reaksiyon etkinliğini korumak için fazla primerden daha yüksek bir erime sıcaklığına sahip bir sınırlayıcı primer kullanılır [171].

➤ **Çevirmeli PCR**

Gen sentezinde doğru DNA moleküllerini elde etmek için kullanılan paralel bir yöntemdir. Karmaşık bir sıralamadan önce, DNA molekülleri kütüphanesi, benzersiz olarak oluşturulur. Tag-yönlendirilmiş primerler daha sonra PCR ile istenen sekanslara sahip moleküllerin çoğaltımını sağlarlar [172].

➤ **Helikaz Bağımlı PCR**

Geleneksel PCR'a benzer, ancak denatürasyon ve tavlama/uzatma döngüleri arasında geçiş yapmak yerine sabit bir sıcaklık kullanır. DNA'yı çözen bir enzim olan DNA helikaz, termal denatürasyon yerine kullanılır [173].

➤ **Sıcak Başlangıç PCR**

PCR'nin ilk başlatma aşamaları sırasında spesifik olmayan amplifikasyonu azaltan bir tekniktir. Polimeraz eklenmeden önce reaksiyon bileşenlerinin denatürasyon sıcaklığına (örneğin 95 °C) ısıtılmasıyla gerçekleştirilebilir. Polimerazın, ortam sıcaklığındaki aktivitesini, bir antikorun bağlanmasıyla veya sadece yüksek sıcaklık aktivasyon aşamasından sonra ayrışan kovalent olarak bağlı inhibitörlerin mevcudiyeti ile inhibe eden özelleşmiş enzim sistemleri ile geliştirilmiştir. Sıcak başlangıç / soğuk bitiş PCR, ortam sıcaklığında inaktif olan ve uzama sıcaklığı anında aktive edilen yeni hibrit polimerazlarla elde edilir [174].

➤ **Eşliğe Özgü PCR (ISSR PCR)**

DNA parmak izi için, basit dizi tekrarları arasındaki bölgeleri büyüten, çoğaltılmış parça uzunluklarının benzersiz bir parmak izini üretmek için kullanılan bir PCR yöntemidir [175].

➤ **Ligasyon Aracılı PCR**

İlgilenilen DNA'ya bağlanan küçük DNA bağlayıcılarını ve DNA bağlayıcılarına bağlanan çoklu primerleri kullanır; DNA dizilimi ve DNA ayak izi için kullanılmıştır [175].

➤ **Metilasyona Özel PCR (MSP PCR)**

Johns Hopkins Tıp Okulu'nda Stephen Baylin ve Jim Herman tarafından geliştirilmiştir ve genomik DNA'daki CpG adalarının metilasyonunu saptamak için kullanılmaktadır. DNA ilk olarak metillenmemiş sitozin bazları urasil'e dönüştüren sodyum bisülfid ile muamele edilir ve bu da PCR primerleri tarafından timin olarak tanınır. Daha sonra, primer dizileri içindeki herhangi bir CpG adası dışında aynı olan primer setleri kullanılarak, değiştirilmiş DNA üzerinde iki PCR gerçekleştirilir. Bu noktalarda, bir primer seti, metillenmiş DNA'yı büyütmek için sitozinlerle DNA'yı tanır ve bir set, metillenmemiş DNA'yı çoğaltmak için uracil veya timin üzerinden DNA'yı tanır. QPCR kullanan MSP, metilasyon hakkında nitel bilgi yerine nicel bilgi elde etmek için de kullanılabilir [176].

➤ **Miniprimer PCR**

9 veya 10 nükleotit kadar kısa primerlerden ("smalligos") uzayabilen termostabil bir polimeraz (S-Tbr) kullanır. Bu yöntem, daha küçük primer bağlanma bölgelerine PCR'ın hedeflemesine izin verir ve 16S (veya ökaryotik 18S) rRNA geni gibi korunmuş DNA sekanslarını büyötmek için kullanılır [177].

2.14. DNA Sekanslama

Watson ve Crick, 1953'te Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins tarafından geliştirilen kristalografiyi kullanarak deneysel ölçümlerinden üretilen kristalografik verilerden, üç boyutlu DNA yapısını ortaya çıkarmışlardır [178-179]. Bu moleküler biyoloji alanında çok büyük bir yenilik olarak karşılanmıştır, bununla birlikte araştırmacılar DNA'yı 'okuma' veya dizileme işlemleri için yeni tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duymuşlardır [180].

İlk çabalar, mikrobiyal ribozomal rRNA ve transfer tRNA gibi nispeten daha saf ve erişimi daha kolay RNA molekülleri üzerinde denemelerin yürütölmesiyle başlamıştır. En hazır kaynaklardan veya tek iplikli RNA bakteriyofajlarının genomlarının diziliminden faydalanılmıştır (*Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı tRNA bunlardan birisidir) [181]. Buna paralel olarak, Fred Sanger ve meslektaşları, iki boyutlu fraksiyonlamadan faydalanarak [182] radyokimyasal işaretli RNA fragmentlerinin tespitine dayanan bir teknik geliştirmişlerdir [183]. Walter Fiers'in laboratuvarı, 1972'de, bu iki boyutlu fraksiyonlama yöntemini kullanarak, bakteriyofaj MS2'nin ilk tam protein kodlayan gen sekansını çıkarmışlardır [184].

Bununla beraber Ray Wu ve Dale Kaiser araştırmalarında, Enterobacteria faj λ 'nın 5 ' yapışkan uca sahip olduğu gözlemini kullanarak ve bu fikirden faydalanarak radyoaktif nükleotit zincirine ekleme işlemi için DNA polimerazı kullanmışlardır [185]. Bu araştırmayı spesifik oligonükleotidler kullanılarak uygulamanın genelleştirilme süreci takip etmiştir. Radyoaktif nükleotidlerin dahil edilmesi, sadece bakteriyofajlarda değil, bütün canlı DNA'larında nükleotidlerin sırasını çıkarmak için kullanılabilme şansı sağlamıştır [186].

Büyük bir etki yaratacak bir sonraki pratik değişiklik, iki boyutlu fraksiyonlamadan (genellikle hem elektroforez hem de kromatografiden oluşuyordu), çok daha fazla çözme gücü sağlayan poliakrilamid jeller yoluyla tek bir ayırma ile değiştirilmesi olmuştur. Yaygın olarak 1970'lerin ortalarında Alan Coulson ve Sanger'in 'artı' 'eksi' sistemini ve

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal klevaj tekniği kullanılmıştır [187]. DNA parçalarını ozmek için hala poliakrilamid jeller kullanılırken, Maxam ve Gilbert tekniği kullanılan yaklaşımlarda önemli farklılıklar göstermiştir. Ekleme işlemlerinde DNA polimeraza dayanmak yerine, radyo-etiketli DNA zincirini belirli bazlarda parçalayan kimyasallarla muamele edilmiştir; sistem bir poliakrilamid jeli üzerinde çalıştırıldıktan sonra, parçalanmış fragmanların uzunluğu (ve böylece spesifik nükleotitlerin pozisyonu) belirlenmiş ve bu şekilde sonuç elde edilmiştir. Bu yaygın olarak benimsenen ilk teknik olmuştur ve bu nedenle 'ilk nesil' DNA diziliminin gerçek doğuşu olarak düşünülmektedir.

Bununla birlikte, DNA sıralama teknolojisinin ilerlemesini sonsuza dek değiştiren büyük atılım, Sanger'ın “zincir sonlandırması” ya da dideoksi tekniğinin gelişmesiyle birlikte 1977'de ortaya çıkmıştır [188]. Zincir sonlandırma tekniği, DNA iplikçiklerinin monomerleri olan deoksiribonkleotitlerin (dNTP'ler) kimyasal analoglarını kullanmıştır. Dideoksinkleotitler (ddNTP'ler), DNA zincirlerinin uzatılması için gereken 3 ' hidroksil grubundan yoksundur ve bu nedenle sonraki dNTP'nin 5 ' fosfatı ile bir bağ oluşturamaz [189]. Radyo-etiketli ddNTP'lerin, standart dNTP karışımındaki DNA uzatma reaksiyonuna karıştırılması, dideoksi nükleotitler, iplikçik uzadıkça rasgele dahil edilirken, radyo-etiketli ddNTP'ler eklendiğinde daha fazla uzamayı durdurarak, olası uzunluktaki DNA iplikçikleri ile sonuçlanmaktaydı. Bu şekilde her bir ddNTP bazını içeren dört paralel reaksiyon gerçekleştirerek ve sonuçların bir poliakrilamid jelin dört şeridi üzerinde çalıştırılmasıyla, ilgili şablonda bir radyoaktif bant olacağından, orjinal şablondaki nükleotit dizisinin ne olduğunu ortaya çıkarmak için otoradyografi kullanılmıştır. Diğer tekniklerle aynı prensipte çalışırken (olası tüm artımlı uzunluk sekanslarının üretilmesi ve nihai nükleotidin etiketlenmesi), doğruluk, sağlamlık ve kullanım kolaylığı, dideoksi zincir sonlandırma yöntemine (ya da basitçe, Sanger sekanslama) yol açmıştır. Bu sistem DNA'yı sıralamak için yıllarca kullanılan en yaygın teknoloji olmuştur.

İlerleyen yıllarda Sanger sekanslamada bir dizi iyileştirme yapılmıştır; bunlar, esas olarak florometrik tabanlı algılama ile fosfor veya tritium-radyo-etiketlemenin (reaksiyonun dört yerine bir kaptaki meydana gelmesi sağlanmış) ve kılcal bazlı elektroforez sistemi ile birleştirme yoluyla daha geliştirilmiş bir belirleme yöntemi sağlanmıştır. Bu gelişmelerin her ikisi de, gittikçe daha otomatik hale getirilmiş DNA sıralama makinelerinin [190] ve ardından ilk ticari DNA sekans belirleme cihazlarının geliştirilmesine katkıda

bulunmuştur. Giderek artan karmaşık türlerin genomlarını dizmek için kullanılan farklı tasarımlarda dizilim makineleri geliştirilmiştir [191] .

Bu birinci nesil DNA dizilim makineleri, uzunluk olarak bir kilobaz (kb) 'dan biraz daha az sekans okumaları üretmekteydiler: daha uzun parçaları analiz etmek için araştırmacılar, üst üste binen DNA parçalarının ayrı ayrı klonlandığı ve dizildiği ve daha sonra birleştirildiği "av tüfeği dizilimi" gibi tekniklerden yararlanmışlardır [192]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) [193] ve rekombinant DNA teknolojileri [194] gibi tekniklerin geliştirilmesi, sekanslama için gereken yüksek saf DNA konsantrasyonlarının üretilmesi için araçlar sağlayarak genomik devrime yardımcı olmuşlardır. Bundan sonraki takip eden gelişmeler, daha az doğrudan yollardan da gerçekleşmiştir. [195] [196]. Örneğin Leroy Hood'un Applied Biosystems [197] tarafından üretilen, yüzlerce numunenin aynı anda sıralanmasına izin veren [198] ABI PRISM serisi gibi ikinci nesil ve üçüncü nesil sekanslama teknolojileri daha yeni dideoksi sekanslırları, İnsan Genom Projesinde kullanılmaya başlanmıştır [199],[200].

2.15. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)

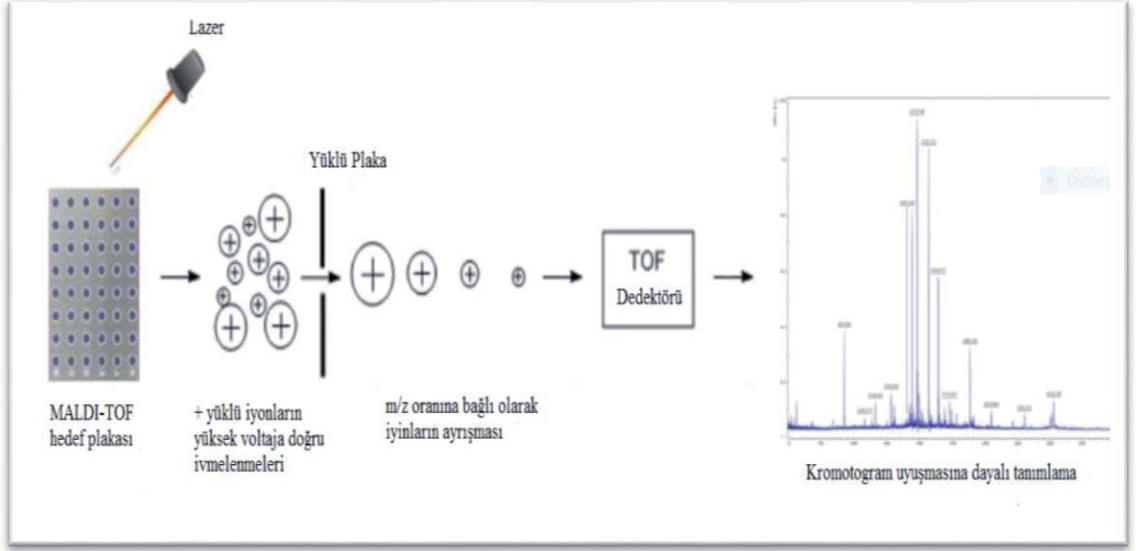
Günümüzde mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan yöntemler arasında en gelişkin yöntem olarak 16S rRNA ve 18S rRNA gen dizilimi kullanan moleküler genetik yöntemler kabul edilmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda matris destekli lazer desorpsiyonu iyonlaşma-uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) mikrobiyal tanı ve teşhis için potansiyel bir araç olarak görülmektedir. MALDI-TOF MS analizlerinde, mikroorganizmalar tüm hücreler veya bunların hücre özütleri şeklinde kullanılarak analiz edilip tanımlanırlar. Süreç hem emek hem de maliyetler açısından hızlı, hassas ve ekonomiktir. MALDI-TOF MS'nin mikrobiyal tanımlama, epidemiyolojik çalışmalar, biyolojik savaş ajanlarının tespiti, su ve gıda kaynaklı patojenlerin tespiti, gibi bir dizi amaç için kullanımı mikrobiyologlar tarafından kabul görmektedir. Yeni izolatların tanımlanması ancak, spesifik cins/tür/alt-tür/türlerin tip suşlarının spektral veri tabanının ve parmak izlerininin mevcut olması halinde mümkün olmaktadır [201].

Mikrobiyal proteomun karakterizasyonu ve farklılaşması, hem jel bazlı hem de jel içermeyen protein ayırma yöntemlerinin kullanılması ile ortaya çıkmıştır. Mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılması için birkaç çalışmada bilgisayar

destekli analiz ile birleştirilmiş, hücre proteinlerinin SDS- PAGE dağılımları dikkate alınmıştır [202].

Kütle spektrometrisi, moleküllerin iyonize edildiği ve kütlelerinin yüklenme oranının (m/z) ölçüldüğü analitik bir tekniktir. İlk ortaya çıkmış olduğu 1900'lerin başında kullanım kapsamı kimya bilimleriyle sınırlıydı. Bununla birlikte, 1980'lerde elektron sprej iyonizasyonunun (ESI) ve matris destekli lazer desorpsiyon iyonlaşmasının (MALDI) geliştirilmesi, kütle spektrometresinin daha büyük biyolojik moleküllere (protein, hücre) uygulanabilirliğini arttırdı. Hem ESI hem de MALDI'da peptitler, molekül üzerine bir veya daha fazla protonun eklenmesi veya kaybı ile iyonlara dönüştürülür. Her iki yöntem de, iyon oluşumunun önemli bir numune bütünlüğü kaybına yol açmadığı “yumuşak iyonlaşma” yöntemlerine dayanır. MALDI-TOF MS, ESI-MS'e göre bazı avantajlara sahiptir. MALDI-TOF MS, tek şarjlı iyonlar üretir, bu nedenle verilerin yorumlanması ESI-MS ile karşılaştırılması kolaydır [203]. Bu sistemlerde kullanılan tam otomasyon sayesinde yüksek verim ve hız sağlamaktadır ve MALDI-TOF kütle spektrometresini büyük ölçekte proteomik çalışmalar için bariz bir seçenek haline getirmiştir [204].

MALDI MS sisteminde analiz edilecek numune, matris olarak bilinen enerji emici, organik bir kimyasal bileşik çözeltisi ile karıştırılarak ve yüzeyi kaplanarak hazırlanır. Matris kuruma sonrasında kristalleştikten, matrisin içine hapsolmuş olan örnek de aynı zamanda kristalleşir. Matris içindeki numune, bir lazer ışınıyla otomatikleştirilmiş bir modda iyonize edilir. Lazer ışınıyla desorpsiyon ve iyonlaşma, numunedeki analitlerden tek tek protonlanmış iyonlar üretir. Protonlanmış iyonlar daha sonra sabit bir potansiyelde hızlandırılır, bu parçacıklar kütle/şarj oranı (m/z) temelinde birbirlerinden ayrılırlar. Yüklenen parçacıklar daha sonra dörtlü kütle analizörleri, iyon tuzağı analizörleri, uçuş süresi (TOF) analizörleri gibi farklı kütle analiz dedektörleri kullanılarak tespit edilir ve ölçülür. Sistemin çalışma prensibini veren iş akış diyagramı aşağıda (Şekil 2. 2) verilmiştir.



Şekil 2.2. MALDI-TOF MS'de iş akışını gösteren şematik diyagram.

Mikrobiyolojik uygulamalar için çoğunlukla TOF kütle analiz dedektörleri kullanılır. MALDI-TOF analizi sırasında, iyonun m/z oranı, uçuş tüpü boyunca hareket için gereken süreyi belirleyerek ölçülür. Birkaç TOF analizöründe, uçuş tüpünün arka ucunda bir iyon aynası bulunur ve bu, iyonları uçuş tüpünden bir dedektöre yansıtmaya yarar. Böylece, iyon aynası sadece uçuş tüpünün uzunluğunu artırmakla kalmaz, iyonlar arasındaki enerji farklılığını da düzeltir [205]. Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması, ya bilinmeyen organizmanın peptid kütle parmak izinin (PMF), veritabanında bulunan peptid kütle parmak izleri ile karşılaştırılmasıyla ya da bilinmeyen organizmanın biyobelirteçlerinin kütlelerinin proteome veritabanı ile eşleştirilmesiyle gerçekleştirilir. TOF ölçüm bilgilerine dayanarak ve bir karakteristik spektrumdan yararlanarak PMF'leri üzerinden numune belirlemesini gerçekleştirir [205].

Mikroorganizmaların tür cinsinde tanımlanması için, birkaç matriks proteini ile birlikte başlıca ribozomal proteinleri temsil eden, 2/20 kDa'lık tipik bir kütle aralığındaki m/z değerleri kullanılır. Mikrobiyal bir hücrenin kuru ağırlığının yaklaşık % 60 ila % 70'ini temsil eden yüksek oranda bulunan ribozomal proteinlerin karakteristik yapısı, 2 ila 20 kDa'lık kütle aralığındadır [206]. Protein moleküler kütlelerinin bir veri tabanının oluşturulmasından önce, bir organizmanın tam genom dizisi bilgisini gerektirmektedir [206].

Her ne kadar kültür koşulları mikrobiyal fizyolojisiyi ve protein ekspresyon profilini derinlemesine etkilese de MALDI-TOF MS tarafından mikrobiyal tanımlamayı etkilememektedir. Valentine ve arkadaşları dört farklı kültür ortamında üç bakteri türü elde etmiş ve mikrobiyal MALDI-TOF MS tanımlamasının kültür koşullarından bağımsız olduğunu bulmuşlardır [207]. Başka bir araştırma grubu da ise hem kültür koşullarının hem de kültür süresinin MALDI-TOF MS tarafından mikrobiyal tanımlamayı etkilemediğini bildirmişlerdir [208].

MALDI-TOF MS için matris olarak bir çok organik bileşik kullanılmış, ancak mikrobiyolojik uygulamalar, *α*-siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA), 2,5-dihidroksi benzoik asit (DHB) ve 3,5-dimetoksi; 4-hidroksisinamik asidin (sinapik asit) en faydalı olduğu bulunmuştur. Matris çözeltisi, su ve etanol/metanol veya asetonitril içeren organik çözücüler ve matrisi çözen trifloro asetik asit (TFA) gibi güçlü bir asit karışımından oluşur. Solventler, mikroorganizmaların hücre duvarına nüfuz eder ve hücre içi proteinleri çıkarır. Çözücü buharlaştığında, protein moleküllerinin ve matris çözeltisi içinde tutulan diğer hücrel bileşiklerin "birlikte kristalleşmesi" gerçekleşir [209].

MALDI-TOF MS tarafından mikroorganizmaların tanımlanması için numune hazırlama işlemi, izole edildiği kaynağa veya hücre duvarının bileşenlerinin kimyasal doğasına bağlıdır. Araştırmacılar, farklı mikroorganizma grupları için farklı numune hazırlama yöntemlerini değerlendirmişlerdir. Bazı mikroorganizmalar, doğrudan hücre profili olarak adlandırılan doğrudan MS tarafından tanımlanabilir, bazıları için ise bütün hücre lizatları veya ham hücre özütleri hazırlanır. Doğrudan hücre profillemeye, tek bir mikroorganizma kolonisi toplanır ve doğrudan numune plakasına yerleştirilir ve hemen matris çözeltisi ile kaplanır. *Neisseria spp.* gibi gram negatif bakteriler [210], *Yersinia spp.* [211] ve *Vibrio spp.* [212], doğrudan hücre profili kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır.

Hücre duvarlarının kompleks yapıları nedeniyle aerobik actinomycetes, nocardia ve mikobakteri MALDI-TOF analizinden önce özel işlem prosedürleri gerektirir [201].

Bakterilerde olduğu gibi, mayaların MALDI-TOF MS tarafından tanımlanması için çeşitli numune işleme yöntemleri araştırılmıştır, bunların dışında formik asitle 'hazırlama ekstraksiyonunun' en uygun olduğu bildirilmiştir [213-214].

“MALDI Biotyper” olarak adlandırılan mikrobiyal tanımlama yapabilen ilk MALDI-TOF MS sistemi Bruker Daltonics tarafından geliştirilmiştir. MALDI Biotyper, temel bir MALDI-TOF platformu, uygulama ve analiz yazılımları, saha içi bir veritabanı ve numunenin çıkarılması/hazırlanması için basit bir yöntemden oluşmaktaydı [215]. Bruker

MALDI-TOF cihazı ve işletim ve analiz yazılımları ile yazılım ve veritabanı kolayca entegre edilebilmiştir. Bu sistem aynı zamanda dahili organizma kütüphaneleri ekleme seçeneği sağlayarak derecelendirmeye izin vermektedir. Mikrobiyal tanımlama için başka bir MALDI platformu bioMérieux ile işbirliği içinde Shimadzu tarafından tanıtıldı. Shimadzu, enstrümantasyon ve analiz yazılımı “Launchpad” i sunarken, bioMérieux merkezi olarak güncellenen “SARAMIS” veritabanını da sağladı. Daha sonra, Andromas, Bruker ve Shimadzu enstrümanlarıyla uyumlu olan rutin bakteriyolojik tanımlama için farklı türde bir veritabanı ve yazılım sunmuştur [216]. MALDI-TOF MS'nin geliştirilmesinde en büyük çığır açıcı aşama klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri ve mantarların rutin tanımlanması için düzenleyici onay gelmesi ile olmuştur. MALDI Biotyper Sistemi (Bruker Daltonics Inc.), insan örneklerinden kültürlenmiş bakterilerin tanımlanması için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (in vitro tanı). Benzer şekilde, VITEK® MS (bioMérieux Inc.) kültürlenmiş bakteri ve mayaların tanımlanması için, ABD FDA tarafından onaylanmıştır [217]. Tanımlanması için onaylanan bu mikroorganizmaların listesi bireysel sisteme özgüdür [217]. MALDI-TOF MS, ilk olarak 2012 yılında bioMérieux VITEK MS sisteminin Çin Devlet FDA'sı tarafından in vitro diagnostik (IVD) amaçla kullanımı için Çin'deki klinik kullanımda onaylanmıştır [218]. Daha sonra, Çin Devleti FDA ayrıca insan kaynaklı örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların rutin tanımlanması için Bruker IVD MALDI Biotyper Sistemini de onaylamıştır. Bununla birlikte, birkaç araştırma grubu, bilimsel topluluk için serbestçe kullanılabilen bazı açık kaynaklı yazılımlar ve veritabanları geliştirmiştir. Bunlar arasında mMASS, Mass-Up, pkDACCLASS, MALDIquant, SpectraBank, BIOSPEAN, vb. bulunmaktadır [219-222].

MALDI-TOF MS'nin mantar izolatlarının suş tiplemesinde kullanımı henüz başlangıç aşamasındadır ve bakterilerde olduğu kadar başarılı değildir. Mayaların aksine, küfler tanımlamak zordur çünkü karmaşık filogenetik ilişkileri [223] ve daha karmaşık morfolojileri vardır. Bununla birlikte, MALDI-TOF MS ile yapılan suş tiplemesinin *C. albicans* ve *C. parapsilosis* türlerinde mümkün olduğu bildirilmiştir [224-225].

Tek hücreli mantar karakterizasyonu ve tanımlanması için MALDI-TOF MS kullanımını tarif eden ilk çalışma, *Saccharomyces cerevisiae* olarak bildirilmiştir [226]. Mantarlar arasında *Candida*, *Cryptococcus* ve *Pichia* gibi organizmalar dahil askomisetes ve basidiomisetes grubu mayalar için yüksek oranda tekrarlanabilir PMF spektrumları bildirilmiştir. Bununla birlikte, mayaların MALDI-TOF MS tanımlaması için çeşitli ön

işlem prosedürlerini değerlendirilmiş ve emek yoğun olmasına rağmen, formik asit/asetonitril ile tam ekstraksiyonun daha iyi tanımlama sonuçları verdiğini bildirmişlerdir [227]. Çeşitli araştırmacılar MALDI-TOF MS'nin kan dolaşımı enfeksiyonlarındaki çeşitli maya türlerinin tanımlanması için güvenilir ve zaman kazandıran bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir [228-230].

2.16. Funguslarda DNA Barkodlama

Funguslar morfolojik ve fizyolojik olarak, tek hücreli mikro ve makro organizmalara kadar çok çeşitli organizmaları temsil ederler. Fungus türlerinin tanımlanması çoğu zaman zordur, çünkü yalnızca zaman zaman tanımlamaya uygun morfolojik karakterler gösterirler [57]. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, tür düzeyinde taksonomi büyük ölçüde değişmiş ve birçok bilinmeyen tür belirlenmiştir. Bununla birlikte, moleküler markörlere dayalı tanımlamanın çoğu zaman uygun tanımlayıcı materyal ile birleştirilmesi daha uygun görülmektedir [58].

Funguslar hayatın birçok alanında bitkiler, hayvanlar ve insanlar için yararlı veya zararlı (patojenik ve toksijenik) etkilere sahiptirler. Fungusların tür düzeyinde sınıflandırılmaları eski zamanlarda taksonomik yollarla yapılmaktayken günümüzde daha etkili bir tanımlama yapabilmek için moleküler biyolojik çalışmalar önem kazanmaktadır. DNA barkodlama bu konuda günümüzde üzerinde en çok durulan tanımlama yöntemi olarak ortaya çıkmaktadır.

Farklı gen bölgelerinin hangi takson grupları üzerinde yaygın kullanıldığını veren tablo yukarıda (Çizelge2.1) verilmiştir. Uluslararası Mantar Çalışma Grubu (<http://www.fungalbarcoding.org>) tarafından yönetilen Mantar Barkod Veri Tabanı, mantar DNA barkodlama için kullanılan bir dizi bölge belirlemiştir. Her ikisi de nükleer ribozomal RNA genleri grubuna ait olan ITS bölgesi ve nükleer büyük alt birimin (LSU) D1 / D2 bölgesi, en yaygın şekilde sıralananlar arasındadır ve tüm mantar taksonomik gruplarında kullanılabilir. Bu iki bölge, universal primerler kullanılarak kolayca büyütülebilir ve benzer protokoller, farklı mantar gruplarında kullanılabilir. Bu iki bölge referans verisi en fazla bulunan bölgelerdir. Bununla birlikte, bu iki bölge bile çoğu zaman tür düzeyini ayırt edememektedir [58]. Diğer bölgeler, nükleer küçük alt birim (SSU) ve üç düşük kopya protein markörü (RPB1, RPB2 veya MCM7) gibi seçilmiş taksonomik gruplarda uygulanmaktadır. Ayrıca COI gen bölgesi GenBank sorgulamalarına göre funguslarda en çok sorgulama ve araştırma yapılan gen bölgesi

olarak ilk sıralarda yer almaktadır [59-60]. CBOL mantarlar için barkodlamada kullanılan uygun DNA markörlerini belirleme ve onaylama çalışmalarını sürdürmektedir. BOLD ise yaygın olarak ITS gen bölgesine dayanan bir kimlik sunmaktadır [61].Funguslarda yapılan çalışmalarda çekirdek ribosomal genleri, 16S rRNA, *cpn60*, *rpoB*, COI, *rbcL*, *tutA*, RPB1, RPB2, 5.8S, 18S RNA SSU, 28S RNA LSU, ITS'ler LSU D1/D2 markörleri ve çoklu bölge sekans analizleri kullanılarak yapılmaktadır [231-236]. Aşağıda (Çizelge 2.3.) funguslarda DNA barkodlamada yaygın kullanım yeri bulan gen bölgeleri ve primerler gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Funguslarda DNA barkodlamada yaygın kullanım yeri bulan gen bölgeleri ve primerler [229-234]

| Bölge ve Primerlerin Adı | Sekans (5'-3') |
|------------------------------|--|
| ITS | |
| ITS1 ileri yönlü | 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' |
| ITS1F ileri yönlü | 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' |
| ITS4 geri yönlü | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' |
| ITS4BR geri yönlü | 5'-TCAACAGACTTGTACATGGTCC-3' |
| ITS4BR2 geri yönlü | 5'-GGATTATCACCTCAATGAT-3' |
| ITS3R2 geri yönlü | 5'-AAGGTACACCTGTTTGAGTGTC-3' |
| ITS3 | GCATCGATGAAGAACGCAGC |
| ITS2 | GCTGCGTTCTTCATCGATGC |
| ITS2R2 geri yönlü | 5'-GACACTCAAACAGGTGTACCTT-3' |
| ITS5 ileri yönlü | 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' |
| ITS3R3 ileri yönlü | 5'-CACATCGATGAAGAACACAGT-3' |
| 5.8S ileri yönlü | 5'-CGCTGCGTTCTTCATCG-3' |
| 5.8SR geri yönlü | 5'-TCGATGAAGAACGCAGCG-3' |
| UN-UP18S42 ileri yönlü | 5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC-3' |
| UN-LO28S22' geri yönlü | 5'-GTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATG-3' |
| LSU (D1-D2) | |
| LR0R ileri yönlü | 5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3' |
| NL-1 | 5'--GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3' |
| NL-4 | 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' |
| LR5 geri yönlü | 5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3' |
| LR16 geri yönlü | 5'-TTCCACCCAAACTCG-3' |
| SSU | |
| SR1R ileri yönlü | 5'-TACCTGGTTGATQCTGCCAGT-3' |
| NS1 ileri yönlü | 5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3' |
| NS4 geri yönlü | 5'-CTTCCGTC AATTCCTTTAAG-3' |
| PNS1 ileri yönlü | 5'-CCAAGCTTGAATTCGTAGTCATATGCTTGTC-3' |
| NS41 geri yönlü | 5'-CCC GTT GAGTCAAATTA-3' |
| RPB1 | |
| RPB1-Af, RPB1-Ac ileri yönlü | 5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3' |
| RPB1-Cr geri yönlü | 5'-CCNGCDATNTRTRTCCATRTA-3' |

| | |
|--------------------------------|---|
| RPB2 | |
| rRPB2-5F ileri yönlü | GAYGAYMGWGATCAYTTYGG |
| RPB2-7R geri yönlü | CCCATWGCYTGCTTMCCCAT |
| bRPB2-7.1R geri yönlü | 5'-CCCATRGCYTGYYTMCCCATDGC-3' |
| TEF1α | |
| EF1-1018F | GAYTTCATCAAGAACATGAT |
| EF1-1620R | GACGTTGAADCCRACRTTGTC |
| EF1-1002F | TTCATCAAGAACATGAT |
| EF1-1688R | GCTATCATCACAATGGACGTTCTGGAG |
| A133_alternative_f | GARTTYGARGCYGGTATCTC |
| EF1_alterantive_3f | TTYGARGCYGGTATCTC |
| EF1_alternative_3r | GAVACRTTCTTGACGTTGAA |
| 60S L10 (L1) | |
| 60S-908R | CTTVAVYTGGAACCTGATGGT |
| 60S-506F | GHGACAAGCGTTTCTCNGG |
| <i>TEF3</i> EF3-3185F | TCYGGWGGHTGGAAGATGAAG |
| EF3-3538R | YTTGGTCTTGACACCNTC |
| EF3-3188F | GGHGGHTGGAAGATGAAG |
| EF3-3984R | TCRTAVSWGTTCTTGAACCTT |
| EF3-3186F | CYGGHGGHTGGAAGATGAAG |
| EF3-3984R2 | TCRTAVSWGTTCTTGAAC |
| PGK | |
| PGK_480-F | TGTAAAACGACGGCCAGTACGAT ATCCGAGTCGACTTCAAYGTCCC |
| PGK_480-R | CAGGAAACAGCTATGAC TCGAAGACACCRGGGGGACCGTTCCA |
| PGK_483-F | TGTAAAACGACGGCCAGTACGATGAGAACYTGC GHTTCCACRY GAGGAGGARGG |
| PGK_483-R | CAGGAAACAGCTATGACCTTCTTGAAGGTGAARGCCAT |
| PGK_511-F | GTYGSTGCYYTGCCMACCATCAA |
| PGK_511-R | ATCTTGTCRGMRACTTRGCACC |
| PGK_533-F | GTYGAYTTCAAYGTYCC |
| PGK_533-R | ACACDGGDGGRRCCGTCCA |
| <i>TOP1</i> TOP1_501-F | TGTAAAACGACGGCCAGTACGAT ACTGCCAAGGTTTTCCGTACHTACAACGC |
| TOP1 | |
| TOP1-501F | ACTGCCAAGGTTTTCCGTACHTACAACGC |
| TOP1-501R | CCAGTCCTCGTCAACWGACTTRATRGCCCA |
| LNS2 | |
| LNS2-468F | GGCCATGTGCTGAACATGATCGGHCGWGAYTGGAC |
| LNS2-468R | CGGTTGCCRAAKCCRCATAGAACKGG |
| TEF3 | |
| EF3-3185F | TCYGGWGGHTGGAAGATGAAG |
| EF3-3538R | YTTGGTCTTGACACCNTC |

D.Vu ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada hifli funguslar üzerinde veri tabanlarında yer alan veriler üzerinde tanımlamada LSU ve ITS kullanılması sonucunda LSU gen bölgesinin daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır [237].

Goulamova ve ark. tarafından 2012 yılında Bulgaristan'da yapılan çalışmada geleneksel ürünlerinden boza, yoğurt ve peynirde izole ettikleri kültürlerde 14 farklı maya cinsini 26s rDNA analizleri ve GenBank karşılaştırmalarıyla belirlemişlerdir [238]. Ayrıca 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada ITS ve LSU gen bölgelerini kullanarak yeni bir askomisetes cinsine ait beş tür belirlediklerini belirtmişlerdir [239].

Nükler ITS bölgelerinin kullanımı genel olarak funguslarda kullanılan bir bölge iken ITS ile birlikte 5,8 sRNA D1/D2 bölgelerinin kullanımı gen çeşitliliği (farklılığı) açısından Saccharomyceceae grubu için % 1 civarlarında iken bazı fungus grupları için %1 in üzerine çıkabildiğini belirtmişlerdir [240]. Pierce ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları *S. cerevisiae* türünde 20 bazlık genetik delesyonların gen çalışma fonksiyonları üzerindeki etkilerini *S. cerevisiae* kültür havuzunda türlerin başarıyla belirlenebileceğini göstermişlerdir [241].

Wolf ve ark. benzer türler arasındaki gen farklılığındaki düşüşten dolayı ayırmda meydana gelen zorluklardan dolayı öneri olarak tüm genom analizleri veya çoklu bölgelerin aynı anda karşılaştırmada kullanılması önerilmektedir [242]. Francisco ve ark. 2009 yılında genom sekanslama projesinde kullanılmış ve sekans bilgileri olan 55 adetlik *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces paradoxus*'un haploid setleri ile yaptıkları barkodlama çalışmasında spesifik barkodlar üzerinden ayırım yapılabileceğini göstermişlerdir [243].

2.17. Veri Tabanları Yönetimi

Biyoloji, mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanlarında çalışmalar yürüten araştırma ekipleri elde etmiş oldukları araştırma bulgularını yaygın olarak kendi amaçları doğrultusunda kayıt altına almaktadırlar . Bu amaçla geliştirmiş oldukları veri tabanları ve veri yönetim sistemleri temelde kendi çalışmalarını kapsayıcı yönde olmaktadır. Elde edilen verilere gerekli ek verilerde eklenerek meta veri setleri şeklinde kullanıcılara sunulmaktadır. Bu alanda mikrobiyoloji çalışmaları yürüten kuruluşlar elde ettikleri izolasyonların tanımlayıcı bilgilerini (izolasyon kaynakları, tanımlama test sonuçları, izolasyon kimlik numaraları, yılları vb.) sunmaktadırlar. Moleküller biyoloji alanında çalışma yürüten araştırma grupları ise genomik bilgileri, sekans verilerini, protein kodlayıcı genleri, enzim kodlayıcı genleri ve gen interaksiyon ağlarını farklı veri

tabanları ile ilişkilendirerek veya özel araştırma sonuçları olarak sunmaktadırlar. Mikrobiyal veri bankaları mikrobiyologlar için büyük veri setleri kullanarak yer geldiğinde farklı veri tabanları ile entegre bilgi hizmetleri sunmaktadırlar[244-245].

Bu noktada çalışma gösteren mikrobiyal veri bankalarının bir kısmı çalışmalarında FIMS (field information management system/araştırma bilgi yönetim sistemi) veya LIMS (labratory information management system/labratuvar bilgi yönetim sistemi) gibi bilgi yönetim sistemi ve protokolleri uygulamaktadırlar[246-247].

Bu tip araştırmalarda FIMS yönetim sistemi dikkate alınırken, Voucher özgün tür tanımlamalarının yapılması, tür isilerinin verilmesi, tür orijini ve zamanı, coğrafik enlem boylam bilgileri, elde edilme zamanı ve bilgisi, izolasyonların kaynağı, izolasyonu elde eden kişi, tanımlamaları yapan kişi gibi prosedürlerin açıkça belirtilmesini gerektirmektedir[246].

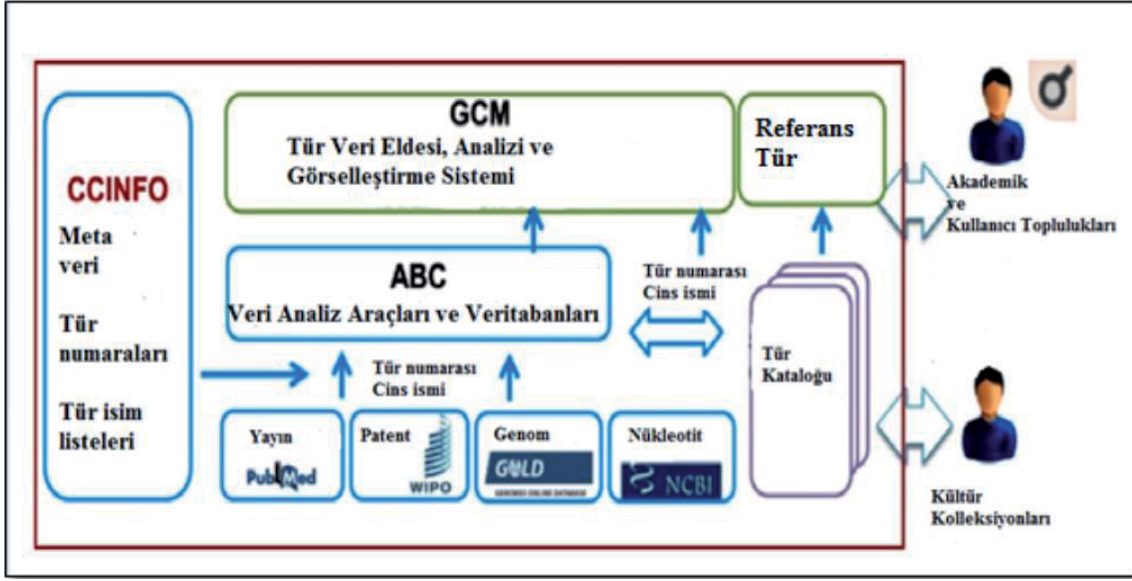
LIMS yönetimi dikkate alınarak yürütülen sistemlerde ise ekstraksiyon, PCR, sekanslama ve derleme prosesleri boyunca proses takibi, uygun biyoinformatik yazılımlar kullanılarak açık erişim veri tabanlarına ekleme, son veri işleme prosesleri, yapı bildirim, düzenlemelerin objektif olabilmesi ve tekrarlanabilmesi için görünür açık düzenlemelerin ve prosedürlerin olması yönünde hareket etmektedirler[246-247].

DNA barkodlama çalışmalarında barkodlamada kullanılan izolasyonların kaynağı, izolasyonu yapan kişiler, izolasyon zamanı, ekstraksiyon prosedürü, kullanılan primerler ve gen bölgeleri, elde edilen jel görüntüleri, sekans dataları, dataları işleme araçları, elde edilen sorgulama sonuçları ve barkod yapıları gibi bilgilerin sunulması gerekmektedir [246].

Bu hususta evrensel olan kabul edilen ve bu alanın öncülerinin çalışmalarına baktığımızda Dünya Mikroorganizmalar Veri Merkezi (WDCM/World Data Center for Microorganisms), 50 yıl önce Dünya Kültür Koleksiyonları Federasyonu (WFCC/World Federation of Culture Collection) -Microbial Araştırma Merkezi'nin (MIRCEN/Microbial Research Center) veri merkezi olarak kurulmuştur. WDCM, tüm dünyadaki mikrobiyal kaynak merkezlerini ve mikrobiyologlar için büyük veri teknolojisini kullanarak entegre bilgi hizmetleri sunmayı amaçlamaktadır. Dünya Kültür Koleksiyonları Federasyonu (WFCC), Uluslararası Mikrobiyolojik Topluluklar Birliği'nin (IUMS/ International Union of Biological Sciences), COMCOF (Committees, Commissions and Federations/Komiteler, Komisyonlar ve Federasyonlar) ve Uluslararası Biyolojik Bilimler Birliği'nin (IUBS/ International Union of Biological Sciences) bir bilimsel üyesidir. Dünya Kültür Koleksiyonları Bilgi Sistemi (CCINFO/Culture Collections

Information Worldwide), WDCM'nin bünyesinde bir meta veri kaydedici olarak görev yapan bir veritabanıdır[248-249]. Her kültür koleksiyonu için benzersiz bir tanımlayıcı sağlamak ve koleksiyonun sahip olduğu türlerin adlarını listelemektedir. CCINFO 72 ülke ve bölgeden 708 kültür koleksiyonuyla ilgili meta veri bilgileri sağlamaktadır. CCINFO tarafından sunulan istatistiklere göre, 708 kayıtlı kültür koleksiyonundan sadece 60'ı çevrimiçi katalog yayınlamış, 96'sının kataloğu ise bilgisayar ortamında yer almaktadır. Küresel Mikroorganizma Kataloğu (GCM/Global Catalogue of Microorganism), katalog bilgilerini toplamakta ve mikrobiyal kaynakların verilerini almakta, analiz ve görselleştirme sistemi sağlamaktadır. Şu anda GCM, 43 ülke ve bölgede 103 kültür koleksiyonundan 368000 suş içermektedir. Referans Tür Kataloğu (RSC/Reference Strain Catalogue) Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO/ International Standards Organization) ve diğer uluslararası veya bölgesel standartlarda listelenen soyların veritabanını tutmaktadır. RSC, teşhis ve kalite kontrolünde kullanılması önerilen suşlara benzersiz bir tanımlayıcı tahsis eder ve bu nedenle değerli bir çapraz platform referansı olarak hizmet etmektedir[248-249].

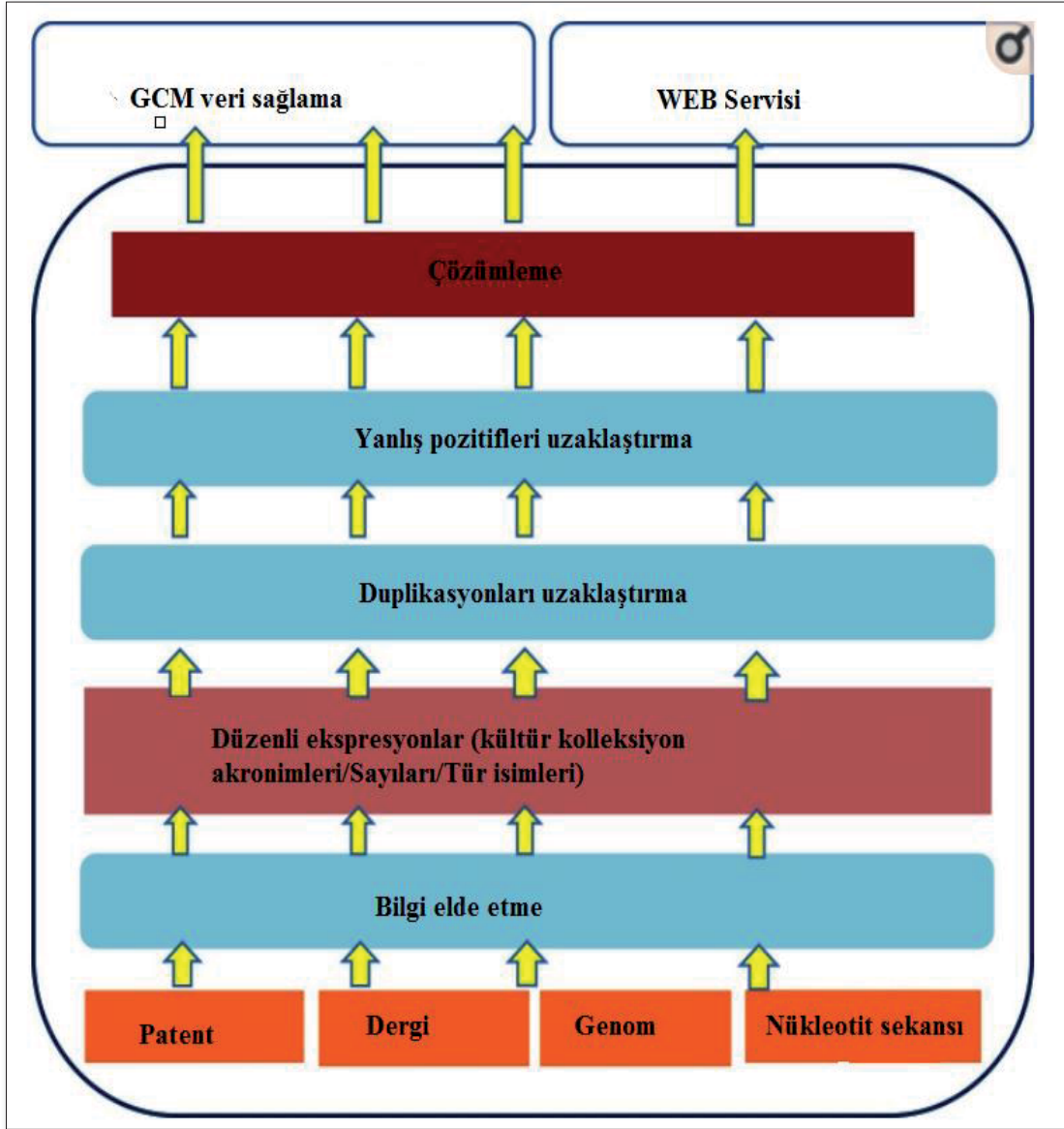
WDCM soy sayıları ve tür adlarını kullanan, Pubmed, WIPO, Genome Online veritabanı ve NCBI nükleotit sekansı veritabanı gibi kamu kaynaklarından bilgi elde etmek için bir veri madenciliği aracı olan Bioresource Citation (ABC) Analizörünü geliştirmiştir. Bioresource Yayın Analizörü (ABC/ Analyzer of Bioresource Citation), WDCM'nin bilgi tabanı oluşturmak üzere kullandığı halka açık veri kaynaklarından suşlarla ilgili yayınları, patentleri, nükleotit sekanslarını ve genom bilgilerini çıkaran bir veri madenciliği aracıdır. ABC mikrobiyal kaynakla ilgili veri ve bilgileri bilimsel literatürden, patentlerden ve biyoinformatik verilerinden etkin ve kesin bir şekilde çıkarmak ve daha sonra kolayca erişilebilir bir veri ambarı oluşturmak için bu verileri entegre etmektir. Bireysel kültür koleksiyonundan katalog bilgileri gönderildikten sonra, WDCM, bu katalog bilgilerini otomatik olarak ABC tarafından çıkarılan her bir suş üzerinde mevcut bilgilerle ilişkilendirmekte; bunu daha sonra Küresel Mikroorganizmalar Kataloğu (GCM) aracılığıyla kullanıma açmaktadır[244,249].



Şekil 2.3. WCDM veritabanının çalışma sistemini özetleyen iş akış şeması [271]

Dünya Kültür Koleksiyon Bilgi Sistemi (CCINFO) dünya çapında kültür koleksiyonları için bir kayıt sistemi ve meta veri arşividir. WFCC, her kültür koleksiyonunun kamu hizmeti sunmadan önce CCINFO veritabanına kaydolmasını önerir. Bir başvuru formu aldıktan sonra, WDCM koleksiyona benzersiz bir kimlik numarası atamaktadır. İlk WDCM numarası 'WDCM1' 1981'de ATCC'ye atandığından beri, WDCM 1130 benzersiz tanımlayıcı atama barındırmaktadır. WDCM numarasının yanı sıra, başvuru formu ayrıca normal olarak kültür koleksiyonu adının kısaltması olan kültür koleksiyonunun kısaltması hakkında bilgi içerir; örneğin, 'Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu' için 'ATCC' ve 'Japonya için' JCM ' gibi. WDCM yönetim sistemi kısaltmanın benzersiz olmasını sağlamaktadır, çünkü kültür koleksiyonunda korunan suşlara atanan sistematik bir numara ile birlikte kısaltma tutulan her bir suş için benzersiz tanımlayıcılık sağlar, örneğin 'ATCC 6051' ve 'JCM 1002'. Türün küresel olarak tanımlanması, kullanımının izlenmesi ve türün çeşitli veri kaynakları arasında kullanılmasının benimsenmesi için benzersiz bir tür sayısı çok önemlidir[249].

ABC yazılımı, CCINFO'da kayıtlı tüm kültür koleksiyonlarının kısaltmaları ve bu koleksiyonlarda korunan tür isimlerinin listesini seçerek çalışır. Kısaltma listesi ve tür adları listesi, yayınların, patentlerin, genomların ve nükleotit dizilerinin veri kaynaklarına karşı arama yapmak için anahtar kelimeler olarak kullanılır. Veri madenciliği sonuçları bir veri ambarı oluşturmak üzere birleştirilir. Temiz bir veri tabanı oluşturulduktan sonra, koleksiyona özgü tanımlama numarası kullanılarak veriler her bir belirli suşa bağlanır[249].



Şekil 2.4. CCINFO tarafından kullanılan veri madenciliği akış şeması [271]

Kültür koleksiyonlarının çevrimiçi bir katalog oluşturmalarına ve kullanıcılara hızlı, doğru ve uygun veri erişilebilirliğine sahip bir sistem sunmalarına yardımcı olmak için WDCM, 2012 yılında Küresel Mikroorganizmalar Kataloğu (GCM/ Global Catalogue of Microorganisms) projesini başlatmıştır. Proje, pilot aşamasında çeşitli gönüllü kültür koleksiyonlarıyla başlatılmıştır. GCM'nin şu anki versiyonu, 43 ülke ve bölgedeki 103 koleksiyondan 46600 bakteri, mantar ve archaea türü içeren 368982 suş hakkında bilgi içermektedir. 103 kültür koleksiyonundan sadece üçte biri bağımsız bir çevrimiçi katalog oluşturmaktadır. GCM web sayfasında yayınlanmadan önce, sistem, veri formatı ve içeriğinin doğrulanması ve tür adlarının filogenetik durumu da dahil olmak üzere otomatik veri kalitesi kontrolü gerçekleştirmektedir. GCM sadece kültür

koleksiyonlarından katalog bilgilerini değil, aynı zamanda ABC veri madenciliği sonuçlarıyla olan bağlantısından dolayı kamuya açık veri tabanlarından çıkarılan türler ve bu türler hakkındaki bilgileri de içermektedir. Çevrimiçi sistem çoklu arama işlevleri sağlamaktadır. Tür isminin ve tür sayısının temel aramasının yanı sıra, gelişmiş arama yayınlarında veya patentlerde marker gen dizisi benzerliği ve anahtar kelimeler gibi çoklu veri alanlarını birleştirebilmektedir. Bu, GCM içeriğinin araştırılmasını büyük ölçüde kolaylaştırmakta ve verilerin farklı veri kaynaklarından entegrasyonunu gerektiren soruları cevaplama imkânı sunmaktadır [249].

Bu tür sistemlerde tek tip veri formatları sağlamak için veri standartları kullanımına başvurulmaktadır. Mevcut durumda, kültür koleksiyonlarının kataloglarında veriler çeşitli veri biçimlerinde yer almaktadır. Farklı koleksiyonların farklı veri alanları vardır. Aynı biyolojik içerik için bile farklı bir alan adına sahip olabilmektedirler. Bu nedenle, katalog bilgisini entegre etmek için bir veri standardına sahip olmak çok önemlidir. Mevcut veri standartlarının ve çevrimiçi kataloğun kapsamlı bir karşılaştırmasından sonra GCM, WDCM minimum veri setlerini (MDS/ minimum datasets) ve OECD biyolojik kaynak merkezleri için “En İyi Uygulama Kılavuzları”ndan yararlanmaktadır. “Microbial” gibi yaygın olarak uygulanan standartlara dayanan önerilen veri setleri (RDS) sistemince geliştirmiştir. Avrupa Mikrobiyoloji Bilgi Ağı (MINE/ Microbial Information Network Europe) WFCC önerilen veri standartlarının yanı sıra Biyolojik Kaynaklara ve Bilgiye Ortak Erişim (CABRI) sistemini yayınlamıştır.

Bu tür sistemlerde filogenetik ağacın göz attığı türler veri ambarında, alt türlerin yanı sıra aynı türe ait türler de otomatik olarak filogenetik bir ağaçtaki bir tür seviyesine bağlanır. Yaşam Kataloğu taksonomik ağacı, mikroorganizmaları düzenlemek ve bilgileri ilişkilendirmek için kullanılır. Bu yerleşik yapı nedeniyle, kullanıcılar ağaç üzerindeki tür adına veya soy sayısına göre göz atabilir veya arama yapabilir [250].

WDCM veritabanı günümüzde veri entegrasyonu için merkezi bir model kullanmaktadır. Semantik web veya bağlantılı veri içeren 'BIG DATA' teknolojisi gibi gelecekteki gelişmeler, sistemin daha geniş veri kaynaklarıyla daha esnek veri entegrasyonu sağlayacağı düşünülmektedir. WDCM ilişkili verilerini çevre, kimya ve araştırma literatürü gibi daha geniş veri kümelerine bağlamak, veri madenciliğine değer katabilir ve yeni ilaçların veya endüstriyel ürünlerin potansiyel kaynakları olarak mikroorganizmaların yeni türlerini hedefleyebilmektedir. Mikrobiyal tür verilerini iklim

bilgisine, tarımsal ve çevresel verilere bağlamak, iklime duyarlı tarım ve gıda güvenliği için araçlar sağlayabilmektedir. WDCM, verilerin birlikte çalışabilirliğini ve araştırma ve geliştirme için gelişmiş araçların sağlanmasına olanak kılmak için araştırma altyapıları, yayıncılar, araştırma fonları, veri sahipleri ve bireysel koleksiyonlar ve araştırmacılarla birlikte çalışmaktadır [251-252].

2.18. Çalışmanın Amacı

DNA barkodlama yaklaşımı kullanılarak elde edilecek avantajlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir;

- Ürün kalitesinin sürdürülebilirliğinin sağlanması
 - Daha etkili ve doğru bir tanımlama yapma
 - Bilinmeyen türleri ortaya çıkarabilme
 - İzlenebilirliğin güçlendirilmesi
- Ürün patent haklarının korunması
 - DNA sekans (dizi) bilgisine sahip olma ve etkili bir şekilde kayıt altına alma
- İnovasyona kaynak veri oluşturulması
 - Büyük veriyi kolay saklama ve erişebilirlik
- Tüketici güvenliğini artırma
- *S. cerevisiae* DNA barkod çalışmalarına ulusal düzeyde katkı sağlama
- Maya üretiminde kalitenin sürdürülebilirliğini sağlamak
- Daha hızlı, etkili ve doğru bir tanımlama yöntemi geliştirerek maya üreticisi ve kullanıcıları olan endüstri grupları için izlenebilirliği güçlendirmek.

Bu çalışmanın temel amacı geleneksel ve biyoteknolojik proseslerde ve gıda endüstrisinde oldukça önemli yer tutan ve aynı zamanda model bir mikroorganizma olan *S.cerevisiae* türlerinin tanımlanmasında kullanılacak DNA barkod gen bölgelerinin ve etkili barkod sekanslarının ortaya konması, ayrıca farklı kaynaklardan izolasyon ve temini yapılan mikroorganizmaların kayıt bilgilerinin bir web tabanlı veri bankasında saklanmasıdır. Bu amaçla farklı kaynaklardan izolasyon ve temini sağlanan maya izolatları klasik tanımlama yöntemleri (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal), MALDI TOF MS tanımlama yöntemleri ve moleküler yöntemlerle ile tür ve alt tür düzeyinde tanımlamalarının yapılması, DNA barkodlarının oluşturulması ve elde edilen bilgiler doğrultusunda bir veritabanının oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında temin edilen maya suşlarının ön denemelerle belirlenmiş gen bölgeleri (ITS,

LSU, RPB2) kullanılarak ileri dizileme yöntemleri aracılığı ile tanımlama ve barkodlama çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve barkod bölgelerinin başarılarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

3 MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Saccharomyces cerevisiae DNA barkodlarının ortaya konulmasında kullanılacak maya izolasyonlarının elde edilmesi için farklı kaynaklardan yararlanılmıştır. Hedeflenen farklı kaynaklar 4 grup altında toplanmıştır. Belirlenen bu gruplar (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4) şu şekilde adlandırılmıştır;

Grup-1 = Ticari kaynaklardan (Ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan) temin edilen izolatlar.

Grup-2 = Kültür kuruluşlarından (Ulusal ve uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarından) temin edilen izolatlar.

Grup-3 = Üniversite araştırmacılarından (Ulusal üniversite araştırmacılarından) temin edilen izolatlar.

Grup-4 = İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan üzüm örneklerinden izole edilen izolatlar.

Toplanan ve izole edilen bütün örnekler sırasıyla klasik metotlar (makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal) ve Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu / İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) metodu kullanılarak tanımlanmış ve DNA izolasyonları tamamlanarak PCR temelli DNA barkodlama analizine tabi tutulmuştur.

3.1.1. Ulusal ve Uluslararası Maya Üreticisi Firmalardan *S. cerevisiae* Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 1)

Grup1'de yer alan maya suşları ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan temin edilmiştir. Grup 1 mayalar 9 adet ulusal firmalardan 10 adet yabancı firmalardan temin edilmiştir. Temin edilen suşlar sıvı besiyerinde NB (Nutrient Broth) canlandırılmış ve ardından YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan petri kutuları, aerobik koşullarda 28-30 °C'de 2-7 gün inkübe edildikten sonra besiyerinde gelişim gösteren ve uygun morfolojik özelliklere sahip koloniler seçilmiştir. İki kez tekrarlanan bu işlemde sonra saf olduğuna karar verilen kültürlerden, tüpteki yatık agarlı besiyerlerine ekimler yapılmış ve aynı koşullarda inkübe edilerek bu izolatların stok kültürleri elde edilmiştir.

Elde edilen kültürlerin ön tanımlamaları yapıldıktan sonra uygun şartlarda (yatık agarlı besiyerlerinde (YGC) 4 °C ve % 50 gliserollü besiyerlerinde -18 °C'de) stok kültürleri hazırlanarak muhafaza altına alınmıştır [253-255].

3.1.2. Ulusal ve Uluslararası Kültür Koleksiyonu Kuruluşlarından *S. cerevisiae* Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 2)

Grup 2'de yer alan maya suşları ulusal ve uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarının stoklarında buldukları kültürlerden temin edilmiş ve bu suşlar için başlık 3.1.1'de ki izolasyonlara (ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan temin edilen suşlar) uygulanan saflaştırma işlemleri benzer şekilde uygulanmıştır. Elde edilen kültürlerin ön tanımlamaları yapıldıktan sonra uygun şartlarda (yatık agarlı besiyerlerinde (YGC) 4 °C ve % 50 gliserollü besiyerlerinde, -18 °C) stok kültürleri hazırlanarak muhafaza altına alınmıştır [253-255]. Bu kuruluşlardan temin edilen suşlardan kontrol olarak kullanılacak referans mikroorganizmalar *S. cerevisiae* ATCC® 9763™, *S. cerevisiae* ATCC® 6328™, *S. cerevisiae* RSK 08022 olarak seçilmiştir.

3.1.3. Ulusal Üniversite Araştırmacılarından *S. cerevisiae* Suşlarının Temin Edilmesi (Grup 3)

Grup 3'de bulunan maya suşları ulusal üniversite araştırmacılarının stoklarında buldukları kaynaklardan temin edilmiş ve bu suşlar için de başlık 3.1.1'de ki izolasyonlara (ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan temin edilen suşlar) uygulanan saflaştırma işlemleri benzer şekilde uygulanmıştır. Ulusal üniversite araştırmacılarından temin edilen suşlar Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 16 adet, Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 31 adet ve Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 15 adet sağlanmıştır. Elde edilen kültürlerin ön tanımlamaları yapıldıktan sonra uygun şartlarda (yatık agarlı besiyerlerinde (YGC) 4 °C ve %50 gliserollü besiyerlerinde, -18 °C) stok kültürleri hazırlanarak muhafaza altına alınmıştır [253-255].

3.1.4. İç Anadolu Bölgesi Şehirleri Üzüm Bağlarından Toplanan Örneklerden *S. cerevisiae* Suşlarının İzole Edilmesi (Grup 4)

Grup 4'de yer alan maya suşlarının izolasyonunda kullanılacak üzüm örneklerinin, İç Anadolu Bölgesi şehirlerinde her bir izolasyon alanında toplanan toprak ve üzüm

örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Örneklerin hangi miktarlarda toplandığı bir örnekleme planı (Çizelge 3.1.) doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Örnekleme işlemi rastgele çoklu örnekleme yöntemi kullanılarak yapılmıştır [155-156].

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan örnekleme planı

| Örnekleme Planı | | |
|----------------------------------|---------------------------------|---|
| Örnek Kaynağı | Bölge | Örneklem |
| Üzüm bağlarından (Olgun üzüm) | İç Anadolu Bölgesi Şehirleri | Her bir şehir için |
| | | 6 adet (600g) (1 bağdan 3 farklı noktadan 2 tekrarlı örnek alınmıştır) |
| Üzüm bağlarından (Toprak) | İç Anadolu Bölgesi Şehirleri | 6 adet (600g) (1 bağdan 3 farklı noktadan 2 tekrarlı örnek alınmıştır) |

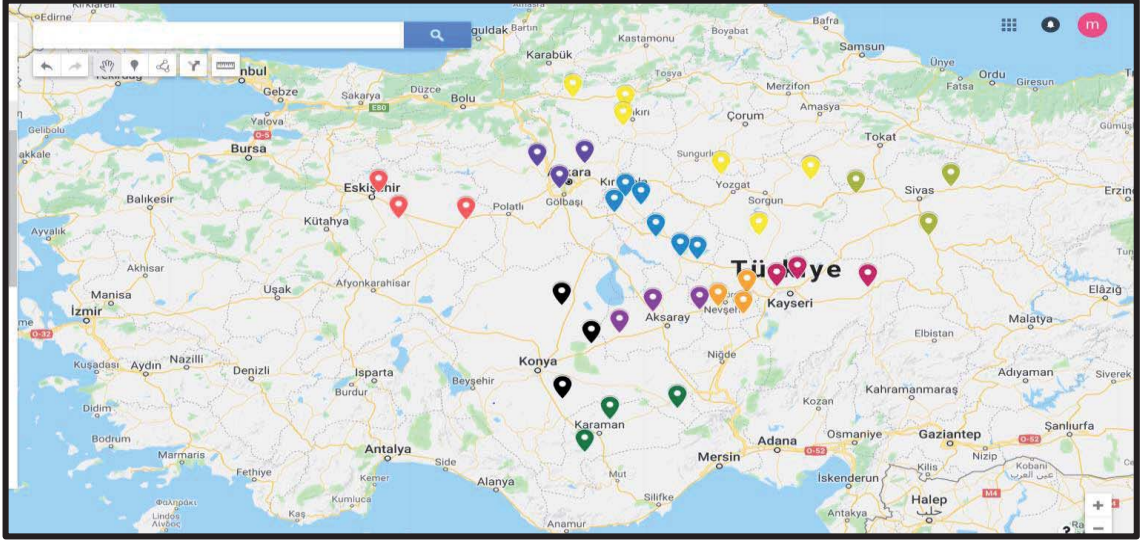
İç Anadolu bölgesi şehirlerinden üç yıl üst üste (2016, 2017 ve 2018) hasat dönemlerinde örnek toplama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu örnek toplama sürecinde örneklerin hangi şehir bölgelerinden ve hangi konumlardan alındığına dair bilgiler aşağıda (Çizelge 3.2) verilmiştir.

Çizelge 3.2. İç Anadolu Bölgesi'nden üzüm ve toprak örneklerinin toplandığı şehir bölgeleri ve GPS konumları

| Şehir-1 | Kayseri1 | Kayseri2 | Kayseri3 |
|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| GPS Kodu | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | 38°43'55.5"N 36°23'37.9"E | 38°52'12.3"N 35°33'34.2"E |
| Şehir-2 | Kırıkkale1 | Kırıkkale2 | Kırıkkale3 |
| GPS Kodu | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | 39°40'46.9"N 33°42'21.4"E | 39°35'37.0"N 33°23'09.0"E |
| Şehir-3 | Kırşehir1 | Kırşehir2 | Kırşehir3 |
| GPS Kodu | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E |
| Şehir-4 | Nevşehir1 | Nevşehir2 | Nevşehir3 |
| GPS Kodu | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | 38°29'33.6"N 34°54'42.5" | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E |
| Şehir-5 | Aksaray1 | Aksaray2 | Aksaray3 |

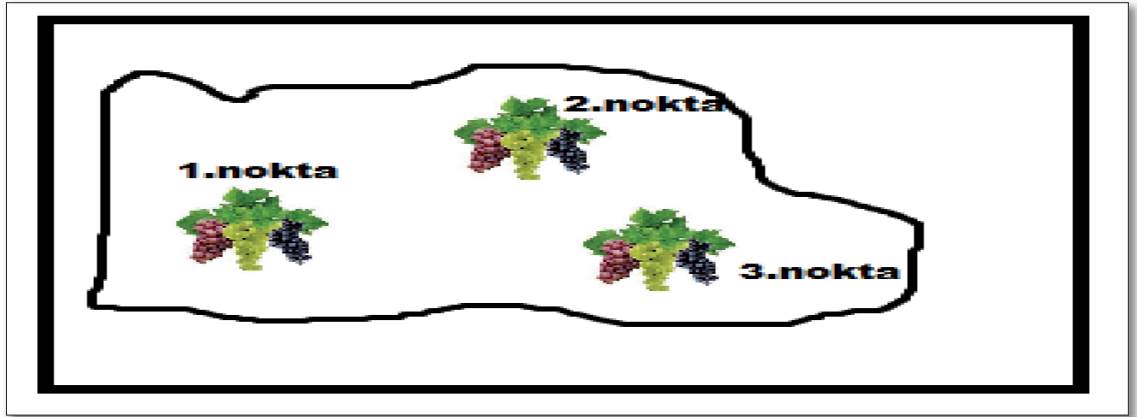
| | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| GPS Kodu | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | 38°15'15.2"N 33°26'54.0"E |
| Şehir-6 | Ankara1 | Ankara2 | Ankara3 |
| GPS Kodu | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E |
| Şehir-7 | Eskişehir1 | Eskişehir2 | Eskişehir3 |
| GPS Kodu | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | 39°31'18.8"N 31°37'52.1"E | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E |
| Şehir-8 | Çankırı1 | Çankırı2 | Çankırı3 |
| GPS Kodu | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E |
| Şehir-9 | Karaman1 | Karaman2 | Karaman3 |
| GPS Kodu | 37°27'06.5"N 34°08'18.2"E | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | 36°57'42.2"N 33°01'54.1"E |
| Şehir-10 | Sivas1 | Sivas2 | Sivas3 |
| GPS Kodu | 39°57'24.1"N 37°44'02.8"E | 39°47'54.9"N 36°15'31.5"E | 39°20'46.7"N 37°06'37.4"E |
| Şehir-11 | Konya1 | Konya2 | Konya3 |
| GPS Kodu | 38°11'30.3"N 33°09'40.5"E | 37°33'23.0"N 32°46'11.5"E | 38°42'02.4"N 32°45'46.9"E |
| Şehir-12 | Yozgat1 | Yozgat2 | Yozgat3 |
| GPS Kodu | 39°21'10.2"N 35°05'54.2"E | 39°59'47.2"N 34°39'02.0"E | 39°57'17.7"N 35°42'45.3"E |

Örnek toplama işlemi yapılırken İç Anadolu Bölgesi'nde yukarıda GPS konumları verilen şehir bölgelerinin görsel konumları aşağıda (Şekil 3.1) verilmiştir.



Şekil 3.1. İç Anadolu Bölgesi şehirlerinden toplanan örneklerin toplandığı noktaları gösteren GPS konumları

Örnekleme yapılırken her bir şehirdeki uygun bulunan üzüm bağından örnek toplama işlemi 3 farklı noktadan ve her noktadan 2 paralel toprak ve 2 paralel üzüm olmak üzere bir arazi bölgesinden toplam 12 örnek olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Aşağıda (Şekil 3.2.)’de verilen örnekleme planına uygun rastgele çoklu örnekleme işlemi gerçekleştirilmiştir [155-156].



Şekil 3.2. Bir yetiştiricilik arazi bölgesinde rastgele üç farklı noktadan örnekleme.

Toplanan örneklerin düzenli kayıtlarının oluşturulması için bir örnek kodlama planı oluşturulmuştur. Belli bir şehir bölgesinde uygulanan rastgele örnekleme planı için kullanılan kodlama planı aşağıda (Çizelge 3.3.)’de verilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Toplanan örnekleri tanımlamada kullanılan örnek kodlama planı

| | Üzüm Örnekleri (Ü) | | | Toprak Örnekleri (T) | | | | |
|-----------|--|---------|---------|--|---------|---------|--|--|
| | 1.nokta | 2.nokta | 3.nokta | 1.nokta | 2.nokta | 3.nokta | | |
| 1.Paralel | A1 | B1 | C1 | A1 | B1 | C1 | | |
| 2.Paralel | A2 | B2 | C2 | A2 | B2 | C2 | | |
| 1.nokta | ÜA1=1.parelel üzüm örneği ÜA2=2.parelel üzüm örneği TA1=1.parelel toprak örneği TA2=2.parelel toprak örneği | | 2.nokta | ÜB1=1.parelel üzüm örneği ÜB2=2.parelel üzüm örneği TB1=1.parelel toprak örneği TB2=2.parelel toprak örneği | | 3.nokta | ÜC1=1.parelel üzüm örneği ÜC2=2.parelel üzüm örneği TC1=1.parelel toprak örneği TC2=2.parelel toprak örneği | |

Arazi bölgelerinden toplanan üzüm ve toprak örnekleri için ortalama 500 g - 600 g aralığında örnekleme yapılmıştır [155-156]. Örnekler toplanırken aseptik koşullar dikkate alınarak çalışılmış, bu kapsamda örnekler toplanırken kilitlenebilen steril naylon buzdolabı poşetleri (Ser marka, Türkiye), steril eldiven ve steril bistüri kullanılmıştır. Örneklerin en kısa sürede bozulmadan laboratuvar ortamına ulaştırılması için soğuk zinciri sağlayacak (Şekil 3.3.) araç içi soğutma kabı ve ısı yalıtımı sağlaması için strafor kutu kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Örneklerin taşınmasında kullanılan araç içi soğutma kabı

Laboratuvara getirilen toprak ve üzüm örnekleri maya izolasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi için hazırlanmıştır. Bu amaçla ayrı ayrı 100 g tartılan toprak ve üzüm örneklerine homojenizasyon ve seri dilüsyon işlemleri uygulanmıştır. Seri dilüsyonları

hazırlanmış örneklerden YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Petri kutuları, aerobik koşullar altında 28-30 °C'de 2-7 gün inkübe edildikten sonra besiyerinde gelişim gösteren ve uygun morfolojik özelliklere sahip koloniler seçilmiştir. Bu kolonilerden saf kültür elde etmek amacıyla yine YGC besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimler yapılmış ve 28-30 °C'de inkübasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İki kez tekrarlanan bu işlemde sonra saf olduğuna karar verilen kültürlerden, tüpteki yatık agarlı besiyerlerine ekimler yapılmış ve 28-30 °C'de inkübe edilerek izolatların stok kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen kültürlerin ön tanımlamaları yapıldıktan sonra uygun şartlarda (yatık agarlı besiyerlerinde (YGC) 4 °C ve % 50 gliserollü besiyerlerinde -18 °C) stok kültürleri hazırlanarak muhafaza altına alınmıştır [253-255].

3.2. Metot

3.2.1. Mayaların İzolasyonu

Toplanan ve soğuk zinciri korunarak laboratuvara ulaştırılan örneklerdeki mayaların izolasyonu için dilüsyon ve canlandırma amacıyla Nutrient Broth (Merck, Almanya) ortamı kullanılmıştır. Stomacher cihazında (Seward, Almanya) homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Homojen karışımdan 1 mL örnek alınarak seyreltme sıvısı (Nutrient Broth) ile tüplerde desimal seyreltme (1/10) derecelerinde seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Mayaların izolasyonunda seyreltilmiş örneklerden 0,1 mL alınarak uygun bir seçici mikolojik besiyeri (YGC (Merck, Almanya)) üzerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları, aerobik koşullarda 28-30 °C'de 2-7 gün inkübe edildikten sonra, gelişimin gözlemlendiği uygun dilüsyonlu petrilere tipik morfolojik görünüme sahip kolonilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu kolonilerin tek koloni düşürme tekniği kullanılarak saf kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürler yatık agarlı besiyerinde 4 °C'de ve % 50 gliserol içeren ortamda, -80 °C'de stoklanmışlardır [253-255].

Ayrıca ticari kaynaklardan, ulusal üniversite araştırmacılarından ve kültür koleksiyonlarından elde edilen kültürlerin direk olarak Nutrient Broth besiyerinde canlandırmaları sağlanmıştır. Ardından tek koloni düşürme yöntemiyle saf kültürleri elde edilip benzer şekilde yatık agarlı besiyerinde 4 °C'de ve % 50 gliserol içeren ortamda, -80°C'de stoklanmışlardır [253-255].

3.2.2. Suşların Klasik Yöntemlerle Tanımlaması

İzolasyonları yapılan maya suşları fenotipik tanımlamaları yapılması amacıyla makroskopik ve mikroskopik testlere tabi tutulmuştur. Makroskopik değerlendirmede koloni gelişim şekli, rengi, karakteristik özellikleri, mikroskopik değerlendirmede ise hücre tipi, hücre dizilişi, şekli, büyüklüğü gibi özelliklere bakılmıştır. Ayrıca tanımlama amacıyla biyokimyasal testler de uygulanmıştır [253-256].

3.2.2.1. Makroskopik Morfolojilerin Belirlenmesi

Makroskopik morfolojilerin belirlenmesi için öncelikle izole edilen maya kültürleri Nutrient Broth besiyerinde canlandırılmıştır. Canlandırma yapılan sıvı kültürlerden bir öze dolusu kültür alınarak, tek hücre düşürme tekniği ile uygun olarak mikolojik besiyerine ((YGC) Yeast Extract Extract Glucose Chloramphenicol) ekim yapılmıştır. Petri kutuları, aerobik koşullarda 28-30 °C'de 2-7 gün inkübe edildikten sonra koloni morfolojileri tek tek incelenmiştir [253-255].

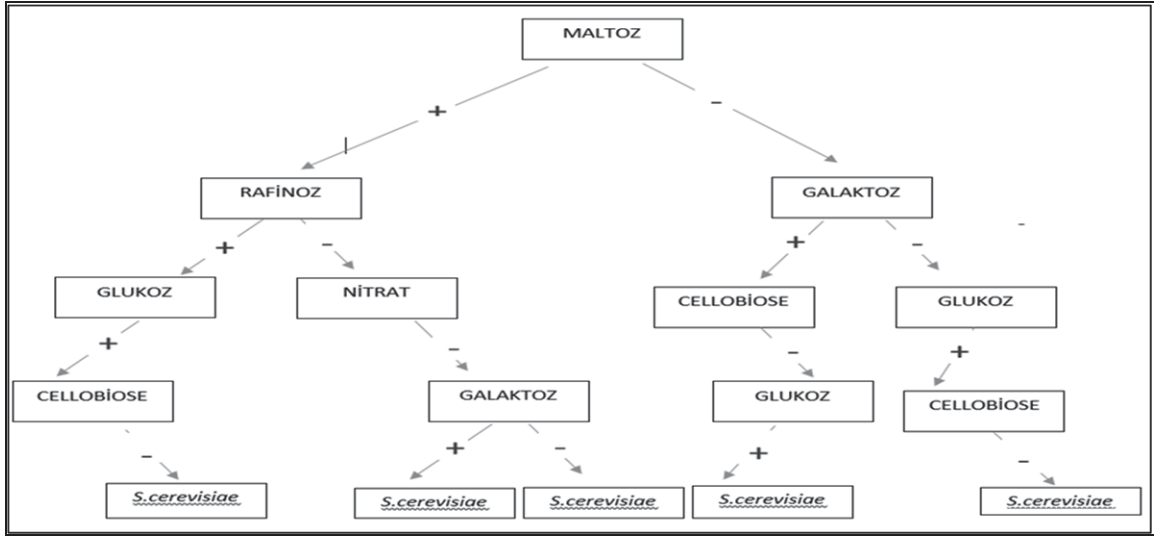
3.2.2.2. Mikroskopik Morfolojilerin Belirlenmesi

İzole edilen suşların tanımlanmasında mikroskopik morfoloji incelemelerinden ayrıca yararlanılmıştır. Mikroskopik morfoloji için basit boyama yöntemi kullanılmıştır. İzolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilen canlandırılmış maya kültürlerinden basit boyama için lam üzerine bir öze dolusu kültür aktararak tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan preparat üzerine boya solüsyonundan (metilen mavisi) dökülerek 20-30 saniye kadar bekletilmiş sürenin sonunda boya dökülüp, preparat su ile yıkanmıştır. Laboratuvar ortamında preparatların kuruması beklenmiş ardından üzerlerine immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi ile incelemeler yapılmıştır [253-255].

3.2.2.3. Biyokimyasal Testler

Suşların tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler temel olarak karbonhidrat fermantasyon testleri ve nitrat indirgenmesi testleridir. Karbonhidrat testlerinden glukoz, galaktoz, maltoz, sellobiyoz, rafinoz testleri uygulanmıştır. Karbonhidrat fermantasyon testlerinde asit ve gaz oluşumu takip edilirken, nitrat indirgenme testinde nitratın nitrite indirgenmesi ve varsa nitritten azot gazı oluşumu incelenmiştir. Biyokimyasal tanımlamada suşların ayırt edilmesinde biyokimyasal temel ayırım değerlendirmeleri

dikkate alınmıştır [253-257]. Bu temel ayırmada kullanılacak ayırım ağacı gösterimi aşağıda (Şekil 3.4.)’de verilmiştir.



Şekil 3.4. *S. cerevisiae* suşlarını tanımlamada kullanılan biyokimyasal testler ve ayırım ağacı

Biyokimyasal testlerde incelenecek canlandırılması yapılmış maya kültüründen pipet ile 0.1 ml alınıp aşağıda (Çizelge 3.4.)’de hazırlanış formülasyonları verilen içerisinde Durham tüpleri bulunan tüpteki besiyerlerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Etüvde, 28-30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her gün bu kültürlerdeki, asit oluşumu (renk değişimi yeşilden-sarıya) ve gaz oluşumu (Durham tüpü gaz kabarcığı) yönünden incelenmiştir. Tüpün dibindeki sarıya dönen renk değişimi, karbonhidratların kullanıldığını göstermektedir [253-257].

Çizelge 3.4. Biyokimyasal test ortam kompozisyonları

| Uygulanacak Biyokimyasal Testler |
|--|
| Maltos Fermantasyon Testi (100 ml için) |
| <ul style="list-style-type: none"> - 1g Tripton (Pepton) - 1 g Maltose - 1 ml (% 0.4) Bromotimol mavisi - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |
| Rafinoz Fermantasyon Testi (100 ml için) |
| <ul style="list-style-type: none"> - 1 g Tripton (Pepton) - 1 g Rafinoz - 1 ml (% 0.4) Bromotimol mavisi - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |
| Glukoz Fermantasyon Testi (100 ml için) |

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - 1 g 1 g Tryptone (Pepton) - 1 g Glukoz - 1 ml (% 0.4) Bromotimol mavisi - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |
| Nitrat İndirgenme Testi (100 ml için) |
| <ul style="list-style-type: none"> - Nitrat Broth veya 1 g Tripton (Pepton) - İndikatörler - Asetik asitte çözündürülmüş sülfanilik asit - Asetik asit (30%) 200 ml - Sülfanilik asit 1.6 g - Asetik asitte çözündürülmüş Dimetil-naftilamin ya da alfa-naftilamin - Asetik asit 5 N 200 ml - α-naftilamin, 1 g - 1 g Potasyum Nitrat - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |
| Sellobioz Fermantasyon Testi (100 ml için) |
| <ul style="list-style-type: none"> - 1 g Tripton (Pepton) - 1 g Sellobioz - 1 ml (% 0.4) Bromotimol mavisi - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |
| Galaktoz Fermantasyon Testi (100 ml için) |
| <ul style="list-style-type: none"> - 1 g Tripton (Pepton) - 1 g Galaktoz - 1 ml (% 0.4) Bromotimol mavisi - 0.5 g NaCl - Durham Tüpü |

3.2.2.4. İzole Edilen Suşların Kodlanması

İzolasyonu gerçekleştirilen suşların gerek stok kültürlerinin muhafazası ve erişimi gerekse kayıtların uygun bir veri tabanı altında başarıyla saklanabilmesi için izolasyon sağlayıcı kuruluşu, izolasyonun yapıldığı kaynağı, tarihi, alt kaynağı ve izolasyon numarasını belirtecek bir kodlama sistemi aşağıda (Şekil 3.5.)’de gösterilen şekilde oluşturulmuştur [256].

| HU | F | 17 | M | 3 | A | 1 | 0 | 0 | 1 |
|---------------------------|--------------------------------------|-----|--------------------------|------|-------------------------------|-------------|--------------|---|---|
| Hacettepe Üniversitesi | Gıda Mühendisliği Laboratuvarı | Yıl | İzolasyonu Yapan Kişi | Grup | Bölge, Ürün türü vb. | Alt Grup | Suş numarası | | |

Şekil 3.5. Suşların kayıt altında tutulmasında kullanılacak kodlama sistemi

3.3. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Metodu ile Tanımlama

Ön tanımlamaları yapılmış ve % 50 gliserol ortamında -80 °C'de muhafaza edilen izolatlar Nutrient Broth sıvı besiyerinde canlandırılmış ve ardından YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenical) katı agarlı besiyerine ekimleri yapılarak saflık kontrolleri yapılmıştır ve saf koloniler elde edilmiştir. Bütün izolatların 28 °C'de 48 saat inkübasyonun ardından 72 ile 120 saat içinde MALDI-TOF MS ile analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada Tarım ve Orman Bakanlığı, Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ulusal Gıda Stater Kültür Gen Bankası altyapısında bulunan matriks destekli lazer desorpsiyon iyonlaştırma uçuş zamanı teknolojisine dayalı çalışan VITEK® MALDI-TOF MS (bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, France) otomatik mikrobiyal tanımlama sistemi kullanılmıştır.

3.3.1. MALDI-TOF MS Analizleri İçin Örnek Hazırlama

Maya izolatları, örneklerden protein ekstraksiyonu yapmaya gerek kalmaksızın doğrudan hedef üzerinde ekstraksiyon yöntemi kullanılarak MALDI-TOF MS analiz için hazırlanmıştır. Burada tek bir koloninin bir kısmı öze ile paslanmaz çelik katmana sahip bir polipropilen taşıyıcıdan oluşan tek kullanımlık bir hedef plaka (target slide, bioMérieux, Marcy Etoile, Fransa, ürün no. 410893;) üzerine doğrudan uygulanmıştır. Hedef plakaya uygulandıktan hemen sonra 0.5 µl formik asit (% 25 [v/v], ürün no:411072; bioMérieux, Fransa) örneğin üzerine doğrudan uygulanarak lize edilmiştir. Formik asit kaplamasının oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dakika süre ile kurumasından sonra örneğin üzerine 1 µl matris çözeltisi (% 3.1 [w/v] α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA), ürün no 411071; bioMérieux, Fransa) uygulanmıştır ve yeniden kurutmaya bırakılmıştır. İzolatlar, Vitek MS hazırlama istasyonunda kütle spektrometrik analizi için hazırlanmış ve izolat bilgileri Shimadzu Biotech Launchpad™, v.2.8 (Shimadzu-Biotech Corp., Kyoto, Japonya) kullanılarak Vitek MS alıcı istasyonuna aktarılmıştır [212,258-259].

3.3.2. MALDI-TOF MS Analizi

Numune hazırlamanın ardından örnekler, doğrusal pozitif iyon modunda, 2.000 ila 20.000 Da arasındaki kütle-şarj oranı aralığındaki Vitek MS MALDI-TOF kütle spektrometresi

ile analiz edilmiştir. Her nokta 50 Hz'de 500 lazer çekimi ile ışınlanmıştır. Hedef plakalar, *Escherichia coli* ATCC 8739 kullanılarak, hem veri toplama öncesi hem de sonrasında kalibrasyon ve kalite kontrolleri yapılmıştır. Spektrumların elde edilmesinden sonra veriler Vitek MS alıcı istasyonundan Vitek MS analiz sunucusuna aktarılmıştır ve Shimadzu Biotech Launchpad™, v.2.8 kullanılarak tanımlama sonuçları gösterilmiştir [212,258-259].

3.3.3. MALDI-TOF MS Ölçümlerinin Veri Analizi

Vitek MS tanımlama sistemi, Shimadzu Biotech Launchpad™, v.2.8 veritabanı ile elde edilen spektrumların özelliklerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu veritabanı bilinen her tür ve alt tür için spektrumlar kullanılarak oluşturulmuştur. Toplanan verilere dayanarak, her bir türe özgü bir tepe ağırlığı verilir. Tanımlama sürecinin bir parçası olarak, yazılım, talep edilen her tür için tanımlanan tepe ağırlıkları ile elde edilen spektrumları karşılaştırır. Elde edilen nicel değer, güven değeri, bilinmeyen organizma ile veritabanındaki her organizma veya organizma grubu arasındaki benzerlik hesaplanır ve ifade edilir. Önemli bir organizma veya organizma grubu korunursa, % 60.0'dan % 99.9'a kadar bir güven değeriyle tek bir tanımlama görüntülenir. “Düşük ayırım” tanımları, birden fazla fakat en fazla dört önemli organizma veya organizma grubu korunursa gösterilir. Bu durumda, güven değerlerinin toplamı 100'e eşittir. Dört organizmadan veya organizma grubundan daha fazlası bulunduğu veya herhangi bir eşleşme bulunmadığında, organizmanın tanımlanmamış olduğu düşünülür [212,258-259].

3.4. PCR Temelli DNA Barkodlama Analizi

Bu çalışmada *S. cerevisiae* suşlarının barkodlarının oluşturulması amacıyla PCR temelli DNA barkodlama stratejisi izlenmiştir. Buna göre örneklerden öncelikle genomik DNA izolasyonu ve DNA saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her bir maya toplam DNA'sı seçilen gen bölgeleri için spesifik primerler kullanılarak ayrı ayrı PCR reaksiyonları ve elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizileri barkod yapılarının ortaya konması için veri analizlerine tabi tutulmuştur.

3.4.1. DNA İzolasyonu

Tür düzeyinde tanımlaması yapılan *S. cerevisiae* suşlarından genomik DNA izolasyonu GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx Ltd., Polonya) kullanılarak, kit protokolünde verilmiş olan metot üzerinde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir [260].

GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx Ltd., Polonya) ile DNA izolasyonu için stok kültürden alınan izolatlar aktifleştirilmiş steril koşullar altında 30 °C'de 24 h inkübe edilmiştir. Tek hücre düşürme tekniğiyle elde edilen saf kültürlerin Nutrient Broth sıvı besiyerine inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. 10⁹ KOB/ml oranında hücre sayısına ulaşan sıvı kültürler kullanılarak (EURx®Genematrix Bacteriai & Yeast Genomic DNA Purification Kit) genomik DNA saflaştırma kitinin protokolü doğrultusunda genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan genomik DNA'ların miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrede (Nanodrop 2000c, ThermoScientific, ABD) 260/280 nm dalga boylarında alınan absorbans değerleri ile kontrol edilmiştir.

DNA izolasyonu kit protokolü doğrultusunda uygun hacimde (yaklaşık 4 ml) olan sıvı kültürler (pellet ağırlığı 50 mg geçmeyecek şekilde), Eppendorf tüplerde 11000 devir/dk hızında 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 300 µl Lyse BG koyularak 11000 devirde, 1 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Ardından pellet içerisine 250 µl Lyse BG eklenmiştir. Uygun enzim (Lyticase) 1 µl ve 2 µl RNaseA karışım üzerine eklenmiş ve vorteks yardımıyla 15 saniye karıştırılmıştır. Karışım 30 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından karışımın üzerine 15 µl ProteinaseK enzimi eklenmiş ve karışım 3 sn vortekslenmiştir. Ardından karışım üzerine 350 µl Buffer Sol BG ilave edilip 15 sn vortekslenmiş ve 55 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen lizat 11000 devirde 2 dk santrifüj edilmiş üst faz mikropipet yardımı ile spin-kolona transfer edilmiştir. Spin kolon 11000 devirde 1 dk santrifüj edilmiştir. Spin-kolon alınıp dipteki süzüntü uzaklaştırılmış ve pellet alıcı (receiver) tüpe yerleştirilerek üzerine 600 µl Wash BG buffer eklenip 11000 devirde 1 dk santrifüj edilmiştir. Alta geçen süzüntü tekrar uzaklaştırılarak spin column yeniden receiver tüpe yerleştirilmiştir. DNA'yı yapısına bağlamış olan spin kolon üzerine 80 °C 'ye ısıtılmış olan 50 µl elution buffer eklenerek spin kolon/alıcı tüp birleştirilmiş ve oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 11000 devirde 2 dk santrifüj edilerek izolasyonu yapılması istenen genomik

DNA alıcı tüpte toplanmıştır. Genomik DNA izolasyonu tamamlanmış ve elde edilen DNA izolasyonları -18 °C de depolanmıştır [260].

İzole edilen ve saflaştırılan genomik DNA'ların miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrede (Nanodrop 2000c, ThermoScientific, ABD) 260/280 nm alınan absorbans değerleri ile kontrol edilmiştir. Buna göre absorbans değeri $A_{260} = 1$ olduğunda DNA miktarı 50 ug/mL'dir. DNA saflığı için ise $A_{260} / A_{280} = 1.8$ formülü kullanılmış ve bu değer genellikle 1.8-2.0 arasında olması sağlanmaya çalışılmıştır [260-261].

3.4.2. PCR Reaksiyonları

Bu çalışma kapsamında öncelikle *S. cerevisiae* barkod bölgeleri olarak ITS (internal transcribed spacer), RPB2 (RNA polymerase II), LSU (Long Sub Unit), SSU (Short Sub Unit), RPB1 (RNA polymerase I) ve TOP1 (DNA topoisomerase I) gen bölgeleri deneme amacıyla ileri çalışmalar için literatür taraması doğrultusunda seçilmiştir [231,262-264]. Bu altı farklı gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak PCR tekniği ile ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PCR'da kullanılacak primer dizileri Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. DNA barkodlama çalışmasında kullanılan gen bölgelerine özgü primerler

| Bölge ve Primerlerin Adı | Sekans (5'-3') |
|--------------------------|---------------------------------------|
| ITS | |
| ITS1 ileri yönlü | 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' |
| ITS4 geri yönlü | 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' |
| LSU (D1-D2) | |
| LR0R ileri yönlü | 5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3' |
| LR5 geri yönlü | 5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3' |
| SSU | |
| PNS1 ileri yönlü | 5'-CCAAGCTTGAATTCGTAGTCATATGCTTGTC-3' |
| NS41 geri yönlü | 5'-CCCGTGTTGAGTCAAATTA-3' |
| RPB1 | |
| RPB1-Af ileri yönlü | 5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3' |
| RPB1-Cr geri yönlü | 5'-CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA-3' |
| RPB2 | |
| fRPB2-5F ileri yönlü | 5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3' |
| RPB2-7R geri yönlü | 5'-CCCATWGCYTGCTTMCCCAT-3' |
| TOP1 | |

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| TOP1-501F | 5'-ACTGCCAAGGTTTTCCGTACHTACAACGC-3' |
| TOP1-501R | 5'-CCAGTCCTCGTCAACWGACTTRATRGCCCA-3' |

PCR'da kullanılan primer dizilerinin özellikleri aşağıda (Çizelge 3.6.)'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. DNA barkodlama çalışmasında kullanılan gen bölgelerine özgü primerlerin teknik özellikleri

| Bölge ve Primer Adı | GC Oranı (%) | Moleküler ağırlık (Da) | Verim OD (Optik dansite) | | Ölçek (umol) | Erime Sıcaklığı T _m (°C) |
|----------------------|--------------|------------------------|--------------------------|---------|--------------|-------------------------------------|
| | | | OD | Konst. | | |
| ITS | | Hesaplanan | | | | |
| ITS1 ileri yönlü | 63.16 | 5844.80 | 5.10 | 25 nmol | 0.03 | 61.70 |
| ITS4 geri yönlü | 45.00 | 6034.00 | 5.00 | 25 nmol | 0.03 | 56.40 |
| LSU (D1-D2) | | | | | | |
| LR0R ileri yönlü | 52.94 | 5139.40 | 4.60 | 25 nmol | 0.03 | 52.40 |
| LR5 geri yönlü | 52.94 | 5210.40 | 4.70 | 25 nmol | 0.03 | 52.40 |
| SSU | | | | | | |
| PNS1 ileri yönlü | 41.94 | 9476.20 | 8.30 | 25 nmol | 0.03 | 69.70 |
| NS41 geri yönlü | 42.11 | 5802.80 | 5.20 | 25 nmol | 0.03 | 53.00 |
| RPB1 | | | | | | |
| RPB1-Af ileri yönlü | 45.00 | 6162.10 | 5.30 | 25 nmol | 0.03 | 56.40 |
| RPB1-Cr geri yönlü | 30.43 | 6968.50 | 6.00 | 25 nmol | 0.03 | 55.70 |
| RPB2 | | | | | | |
| fRPB2-5F ileri yönlü | 35.00 | 6169.00 | 5.70 | 25 nmol | 0.03 | 52.30 |
| RPB2-7R geri yönlü | 50.00 | 5968.50 | 4.90 | 25 nmol | 0.03 | 58.40 |
| TOP1 | | | | | | |
| TOP1-501 ileri | 48.28 | 8810.80 | 7.70 | 25 nmol | 0.03 | 70.40 |
| TOP1-501 geri | 50.00 | 9096.00 | 8.00 | 25 nmol | 0.03 | 72.10 |

Her bir primer bölgesinin çekirdek DNA'sı üzerindeki konumlanmış olduğu gen bölgesi farklılık göstermektedir ve bazı durumlarda bir primerin birden fazla bölgeye denk gelmesi söz konusu olabilmektedir [231,262-264].

Her bir gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR reaksiyon karışımı (5 x FIREPol® Master Mix Solis BioDyne, Estonia) aşağıda (Çizelge 3.7.) verilen bileşen konsantrasyonları dikkate alınarak hazırlanmıştır[265].

Çizelge 3.7. PCR reaksiyon karışımı

| Bileşenler | Hacim |
|------------------------------|---------|
| 5x FIREPol® Master Mix | 6 µl |
| Forward Primer (10 pmol/µl) | 1.5 µl |
| Reverse Primer(10 pmol/µl) | 1.5 µl |
| Kalıp DNA | 5.2 µl |
| Eklenen H ₂ O | 27 µl |
| Toplam karışım(2 örnek +NTC) | 41.2 µl |

Toplam karışım hazırlama işlemi sırasında ilk olarak kullanılacak olan tüm solüsyonlar vortekslenmiştir. Sırayla solüsyonlar Çizelge 3.7.'de verildiği düzene göre PCR tüplerine eklenmiştir. Tüpler termal döngü cihazına (Cube Cycler, NANObiz® Tekn.A.Ş.,Türkiye) konulup PCR programı hazırlanmış, PCR başlatılmış ve PCR tamamlandıktan sonra örnekler alınmıştır. Çoğaltma işlemi sırasında kullanılan PCR protokolü ilgili gen bölgeleri için şu basamaklardan oluşmaktadır: 95 °C de 5 dakika 1 döngü başlangıç denaturasyon aşaması, 95 °C'de 25-30 saniye 25-30 döngü denaturasyon, 54 °C-66°C'de 1 dakika 25-30 döngü bağlanma ve 72 °C de 1 dakika 25- 30 döngü uzama aşamaları ve 72 °C'de 10 dakika son uzama aşaması olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilmiş olan PCR çevrimi aşağıda Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Gen bölgeleri dikkate alınarak gerçekleştirilen PCR programları

| ITS, LSU, RPB1, RPB2 gen bölgeleri içi gerçekleştirilen PCR programı | | | |
|--|----------|-------|-------|
| İşlem | Sıcaklık | Süre | Döngü |
| İlk Denatürasyon | 95°C | 5 dk | 1 |
| Denatürasyon | 95°C | 40 s | 35 |
| Tavlama | 62 °C | 45 s | 35 |
| Uzama | 72°C | 45 s | 35 |
| Son uzama | 72°C | 10 dk | 1 |
| SSU, TOP1 gen bölgeleri içi gerçekleştirilen PCR Programı | | | |
| İşlem | Sıcaklık | Süre | Döngü |
| İlk Denatürasyon | 95°C | 5 dk | 1 |
| Denatürasyon | 95°C | 40 s | 35 |
| Tavlama | 72 °C | 45 s | 35 |
| Uzama | 72°C | 45 s | 35 |
| Son uzama | 72°C | 10 dk | 1 |
| | | | |

3.4.3. PCR Ürünleri İçin Jel Elektroforez Görüntüleme

PCR reaksiyonlarında elde edilen DNA fragmanları %1,5 'lik agaroz jel (Sigma, Almanya) üzerinde elektroforez sisteminde yürütülmüş ardından DNA görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) UV ışık altında 312 nm'de incelenmiştir. Bu sistem için 1xTAE tampon ile agaroz (%1,5) karıştırılarak mikrodalga fırında eritilmiş ve eriyen jel üzerine etidyum bromür (0,5 µg/ml) eklenmiştir. Kullanılacak jel dökme standı hazırlanıp agaroz jel standın üzerine dökülmüş, örnek kuyucuklarını içeren tarak jel yürütme standına yerleştirilmiştir. Daha sonra DNA marker (DNA ladder 100-3000bp) hazırlanmış ve DNA marker agaroz jel kuyusuna yüklenmiştir. PCR ürünleri ile BioShop marka yükleme boyası karıştırılarak jel kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Elektroforezin güç kaynağı açılarak 110 Voltta 50 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağı kapatılıp agaroz jel üzerinde oluşan görüntü UV ışık altında 312 nm'de (Vilber Lourmat, Fransa) incelenmiştir ve ilgili bantlar kaydedilmiştir [266].

3.4.4. Jelden DNA Ürünlerinin Saflaştırılması

Jel ekstraksiyonu GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (EURx Ltd.,Poland) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [267]. Kit protokolü doğrultusunda ekstraksiyonda kullanılacak agaroz jelinin çözündürülmesi işlemi için döndürme kolonuna 30 µl aktivasyon Tampon A uygulanmış ve çözünmüş agaroz solüsyonunu spin-kolonuna aktarana kadar oda sıcaklığında tutulmuştur. Tampon A'nın reçinenin merkezine eklenmesi, zarların tamamen ıslanmasını ve DNA'nın maksimum bağlanmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır. Prosedüre başlamadan önce membran aktivasyonu yapılmıştır. Agaroz jelden DNA içeren kısım kesildikten sonra agaroz parçası tartılarak; ağırlığının 250 mg'ı geçmemesine dikkat edilmiştir. Agaroz dilimi Eppendorf tüpüne yerleştirilmiştir. Jel diliminin ağırlığı 250 mg'ı geçmesi durumunda birden fazla agaroz jel kullanılmıştır.

Elektroforez tamponu, bir jelden DNA izolasyonunu olumsuz yönde etkileyen pH değişikliklerine bağlı olarak tek seferlik kullanılmıştır. 1 hacim jele (100 mg ~ 100 µl) 2.5 hacim turuncu renkli Turuncu A tamponu eklenmiştir. Üç kez ters düz çevirerek karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Isıtma bloğu veya su banyosunda 55 ° C'de inkübe edildikten sonra, agaroz tamamen eriyene kadar her 1-2 dakikada bir iki kez ters çevirerek

kariştirilmiştir. Düzgün, turuncu renkli çözeltilinin görünümü, işlemin tamamlandığını ifade etmektedir. Agaroz dilimleri kullanılan agaroz jel konsantrasyonuna ve agaroz parçasının ağırlığına bağlı olarak 5 ila 10 dakika içinde çözülmüştür [267].

Membrana adsorpsiyonlu, DNA fragmanlarının yıkanması ve elüsyonu işlemleri yapılırken DNA bağlama spin-kolonuna 600 µl çözünmüş agaroz çözeltilisi uygulanmış ve 1 dakika boyunca 11 000 x g'de santrifüjlenmiştir. Spin sütunu çıkarıldıktan sonra, süpernatant dökülmüş ve alıcı tüpüne geri yerleştirilmiştir. Kalan karişım aynı DNA bağlayıcı spin-kolonuna aktarıldıktan sonra ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüjlendikten sonra spin sütunu çıkarılmış, süpernatant tekrar dökülmüş ve alıcı tüpüne geri yerleştirilmiştir. Yıkama A1 tamponu 500 µl eklenmiş ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra spin sütunu çıkarılmış, süpernatant dökülmüş, spin kolonunu değiştirilmiştir.

Yıkama işlemi için AX2 tamponundan 600 µl eklenmiş ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüj edilmiştir. Spin-sütun çıkarılmış, süpernatant dökülmüş, spin-kolon değiştirilmiştir. AX2 yıkama tamponunun kalıntılarını çıkarmak için 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Spin-sütunu yeni alıcı tüpüne (1.5–2 ml) yerleştirilmiştir. Bağlı DNA'yı ayırmak için 50–80 µl elüsyon tamponu eklenmiştir. Elüsyon tamponunun doğrudan membranın merkezine eklenmesi DNA verimini arttırmaktadır. Daha büyük DNA parçalarının (5 kb üzerinde) geri kazanımını iyileştirmek için 80 °C'ye ısıtılmış tampon ile elüe edilmesi önerilmektedir. Tampon, eser tamponlama bileşiklerinin eklenmesiyle ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Elüsyon tamponu, DNA dizilemesi, ligasyon gibi sonraki DNA manipölasyonlarında olumsuz bir etkiye sahip değildir. Spin-kolon/alıcı tüp tertibatı oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüj edilmiştir[267].

Bu şekilde izole edilen DNA ileri analizler için hazır hale getirilmiş olur ve 2–8 ° C'de veya -20 ° C'de saklanması tercihine bağlı olarak -18 ° C'de saklanmıştır [267].

3.5. DNA Dizi Analizi

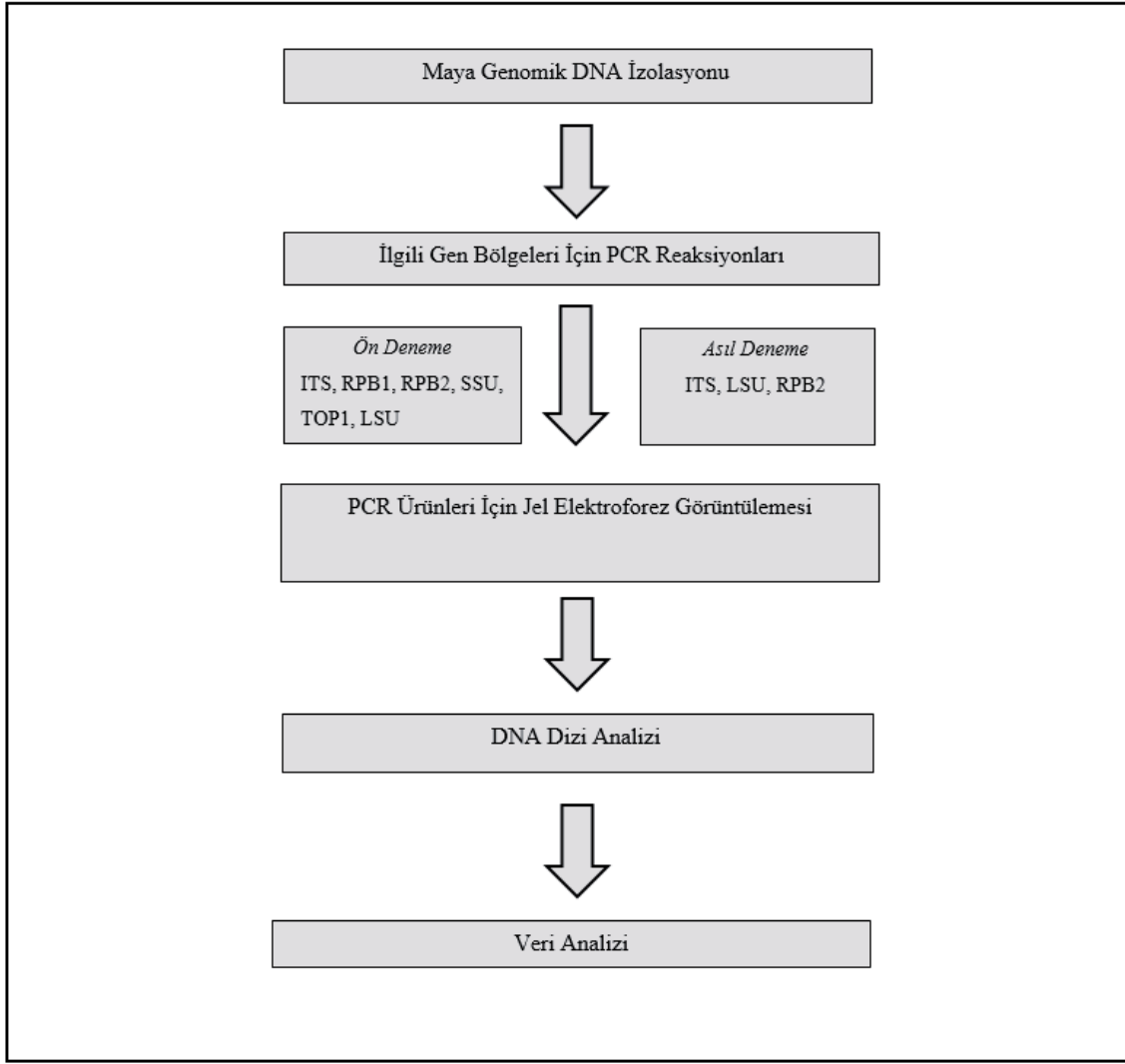
Elde edilen ve çoğaltılan PCR ürünleri sekans analizi yapılcaya kadar -18 °C'de saklanmıştır. Sekanslama işlemine başlanmadan DNA saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada % 1-agaroz jel üzerinde görsel incelemeden sonra, 5 µl PCR ürünü ExoSAP-IT (USB Europe GmbH, Staufen, Almanya) kiti ile saflaştırılmıştır [268]. Kitin kullanımına geçilmeden önce ExoSAP-IT reaktifi -20 °C derin dondurucudan

çıkartılmış saflaştırma işlemi boyunca buzda tutulmuştur. Daha sonra, 5 µl'lik PCR-sonrası reaksiyon ürünü, 2 µl ExoSAP-IT reaktifi karıştırılıp, 7 µl reaksiyon hacminde reaktif elde edilmiştir. PCR ürün hacimlerimiz 5 µl'yi aştığı durumlarda ExoSAP-IT reaktifi orantılı olarak arttırılmıştır. Bir sonraki adımda, bu karışımdaki kalıntı primerler ve nükleotidlerin parçalanması için 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından ExoSAP-IT reaktifinin inaktivasyonu için, 80 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Son durumda kullanılacak olan PCR Ürünleri DNA dizilemesin için kullanıma hazır hale getirilmiştir [268].

Hazır hale getirilen PCR ürünleri 3730XL ABI otomatik dizilim cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak BigDye sonlandırıcılı v3.1 Çevrim Sekanslama Kiti (Applied Biosystems) ile BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti.'nden hizmet alımı yolu ile sekanslanmıştır [27].

Tekrarlanabilen sonuç veren barkod gen bölgelerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak seçilen gen bölgelerinin dizi analizleri her biri farklı gruplardan (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4) seçilen dört suş üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ön deneme amaçlı gerçekleştirilen dizi analizlerinde primerler ileri ve geri yönlü kullanılmıştır. Ön deneme sonuçlarına göre daha yüksek doğrulukta analiz sonuçları almak için ITS gen bölgesi için ileri ve geri yönlü, LSU ve RPB2 gen bölgeleri için ileri yönlü sekanslama dizileri kullanılmıştır. Çalışılan bölgeler için elde edilen DNA sekans verileri iyi kalitede elde edildiğinden kromatogram verilerine göre bazların tanımlanması sırasında zorluklar oluşmamıştır.

PCR temelli barkodlama çalışma sürecini özetleyen şematik gösterim aşağıda (Şekil 3.6.)'da verilmiştir.



Şekil 3.6. PCR temelli barkodlama analizleri sürecini özetleyen iş akış şeması

3.6. Veri Analizi

Sekans bilgileri elde edildikten sonra suşlara ait bu sekans bilgileri kendi aralarında, kontrol suşları ile ve veri tabanlarındaki kayıtlarla karşılaştırılmıştır. DNA barkodlarının belirlenmesi için tür düzeyinde etkili ayrımı sağlayacak gen bölgeleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan veri analiz stratejisi aşağıda özetlendiği gibidir.

3.6.1. FinchTv programı kullanılarak Sekansların Okunması

FinchTV (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) programı kullanılarak sekans verilerinin düzgün okuma bölgelerinin belirlenmesi ve NCBI'de taranacak kısımların ortaya konulması sağlanmıştır [269].

3.6.2. BioEdit Programının ile Sekans Verilerinin Düzenlenmesi

BioEdit programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) kullanılarak işlenecek sekans dizilerinin sıralanması ikili ve çoklu karşılaştırmaların yapılması FASTA formatlarının oluşturulması, ileri ve geri yönlü sekans bilgilerinin, konsensus sekans bilgilerinin oluşturulması işlemleri gerçekleştirilmiştir [270].

3.6.3. BLAST ile Sekans Bilgilerinin Taranması

TheBasicLocalAlignmentSearchTool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı diziler arasındaki bölgesel benzerlikleri dikkate alarak karşılaştırma yapan bir yazılımdır. Program nükleotid dizilerini dizi veri tabanları ile karşılaştırır ve karşılaştırılan diziler üzerinden maksimum skor, toplam skor, yüzde sorgu kapsayıcılığı, E değeri, benzerlik ve erişim bilgisi gibi istatistiksel değerleri hesaplar. BLAST gen familyalarını tanımlamada yardım ettiği gibi diziler arasındaki fonksiyonel ve evrimsel ilişkileri anlamak için de kullanılmaktadır [271].

3.6.4. CLUSTALW ile Filogenetik İlişki Ağaçlarının Oluşturulması

BLAST ile *S. cerevisiae* türleri ile aynı familyaya ait olan ve yakın dizi benzerliği gösteren türlere ait diziler CLUSTALW Multiple Sequence Alignment (Çoklu Dizi Sıralama, <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) programında kullanılmak üzere seçilmiştir [272]. CLUSTALW programlarında kullanılmak üzere ham veriler BioEdit programında FASTA formatına çevrilmiştir. CLUSTALW programı birçok dizinin birlikte sıralanması (alignment) için kullanılan programdır. Program, dizilere ait korunmuş dizi bölgelerini üzerinden türler arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak filogenetik ağaç oluşturmada kullanılmaktadır. Bu program nükleotid ve protein dizilerini sıralayabilmektedir. Türler ait diziler CLUSTALW programına konulmuş ve elde edilen sonuçlar ‘.aln’ dosyası şeklinde kaydedilmiştir. Program kullanımında seçeneğe bağlı parametreler girilirken, dizi sıralayıcısı olarak “Aligner=mafft_default” seçeneği, dizi temizleyicisi olarak “Alignment cleaner=trimal05”, model test edicisi olarak “Model tester=none” seçeneği, ağaç oluşturucu olarak ise “Tree builder=bionj_default” seçeneği seçilmiştir [273]. Bütün bu seçimler ön denemelerle en iyi ayrımı sağlayacak parametrelerin belirlenmesi yolu ile yapılmıştır. CLUSTALW programının GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/ete/>) üzerinde de uygulama bulan ETE3 yaklaşımını kullanarak ağaç yapıları ortaya konulmuştur [274-276]. DNA barkod temelli ağacın

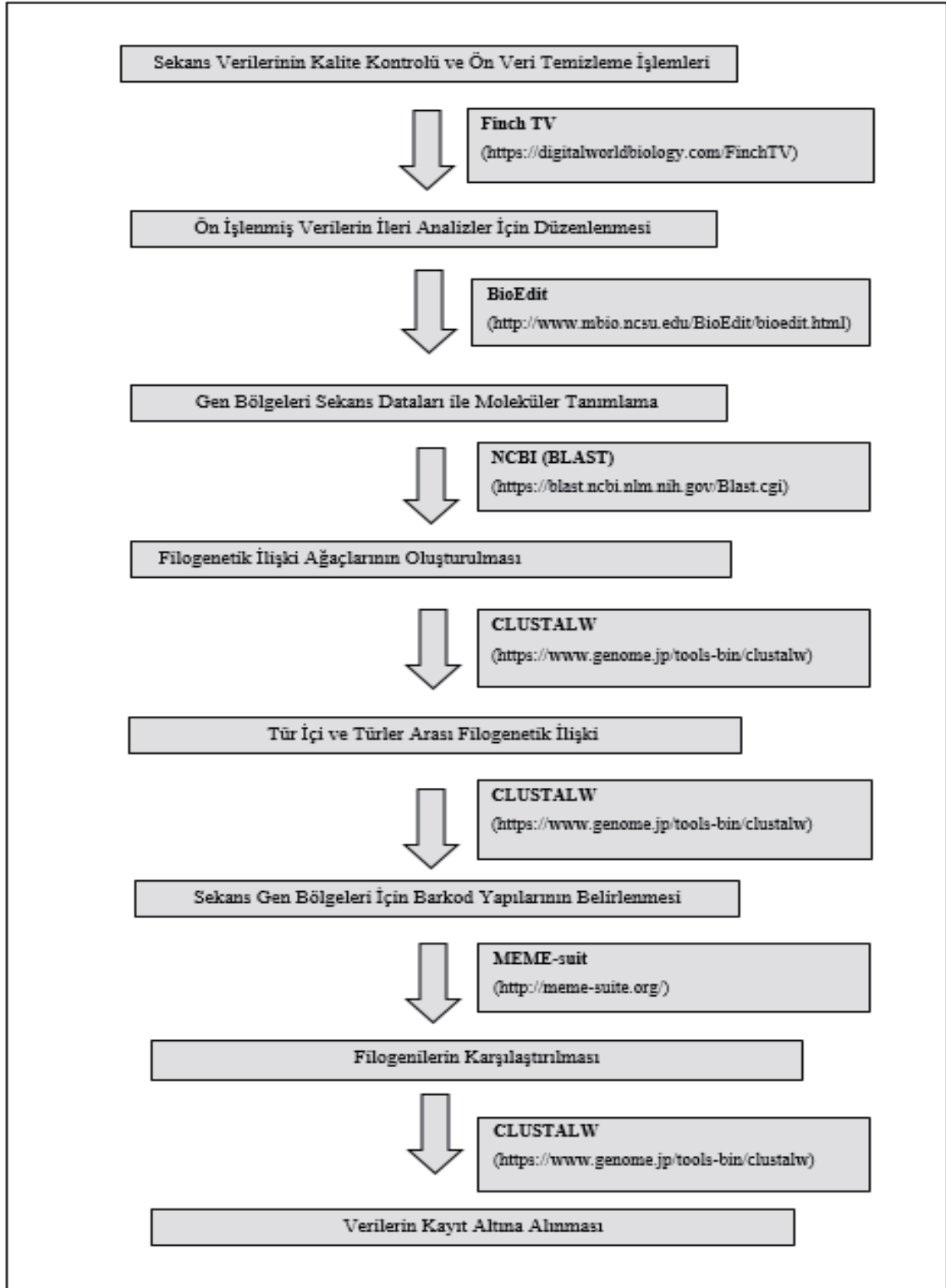
eldesi için mesafe tabanlı “neighbor joining” metodu kullanılmış ve elde edilen filogeninin test edilmesi için bootstrap seçilmiş ve 1000 replikasyon yapılmıştır. Hem ITS sekans verilerini içeren türlere ait dizilerin hem de LSU, RPB2 sekans verilerini içeren türlere ait dizilerin filogenetik ilişkilerinin kurulmasında dallara ait desteklerde, yaklaşık olabilirlik oranı testinin (likelihood) getirdiği Chi2 bazlı parametrik değerlendirme yapılmıştır[274-276].

3.6.5. MEME-Suit Programı ile Barkod Olarak Kullanılabilecek Gen Bölgelerinin Belirlenmesi ve Filogenetik İlişki Ağaçlarının Oluşturulması

Multiple Em for Motif Elucidation (MEME suite - <http://meme-suite.org>), hizalanmamış DNA dizilerindeki motifleri keşfetmenin yanı sıra bu motiflerin yerlerini veritabanında dizi veya genomda tanımlayabilen bir dizi motif bazlı analiz aracıdır [277]. MEME suit programı (<http://meme-suite.org/>) ile izolasyonu ve ön tanımlamaları yapılan izolatların tamamı ve *S. cerevisiae* olarak tanımlanan türlerin DNA barkod bölge belirlemeleri ayrı ayrı denenmiştir. MEME suit programında kullanılmak üzere ham veriler BioEdit programında FASTA formatına çevrilmiştir. MEME suit yazılımı motif bulma, motif güçlendirme, motif tarama gibi farklı uygulamaları bünyesinde barındıran paket bir yazılımdır. Motif bulma (barkod bölgelerinin tespitinde) konusunda klasik mod (classic mode), ayrışım sağlama modu (discriminative mode), farklılıkları güçlendirme modu (differential enrichment mode) seçeneklerini sunabilmektedir. Program birçok dizinin öncelikle hizalanmasını sağlamakta ve elde edilen sonuçları anlamlılıkları yönünden istatistiki olarak değerlendirmektedir. Program, dizilere ait korunmuş ve anlamlı farklı bölgeleri vermektedir.

MEME-suit programı ile çalışılırken sekans tipi olarak DNA, sekans başına yan grup dağılımları sıfır ya da bir, motif sayısı anlamlı ayrımı sağlayacak sayıda (burada 10), arka plan modeli olarak sıfırıncı derece sekans modeli seçilmiştir. Her bir motifin en az 2, en fazla 600 yan grup barındırmasına izin verilmiş, tek zincir üzerinde polindromlar taranmadan sadece sekanslar taranmış ve sekans karıştırma seçilmeden motifler belirlenmiştir. Tüm bu parametrelerin seçimi ön denemeler yapılarak gerçekleştirilmiştir. MEME-suit yazılımından elde edilen barkod motifleri daha sonra CLUSTALW programında filogenilerin tekrar oluşturulması yoluyla izolasyon ham sekans filogenileri ile başarı sağlama açısından karşılaştırılmıştır. CLUSTALW yazılımında izolasyonların ham sekans filogenetik ağaçlarının çıkarılmasında uygulanan parametreler, MEME suit

programında elde edilen barkod sekanslarına da uygulanmıştır. Veri analizi ve DNA barkodu belirleme stratejisine ait işlem akım şeması aşağıda (Şekil 3.7)'de verilmiştir [277].



Şekil 3. 7. Veri analizi ve DNA barkodu belirlemede izlenen yolu gösteren iş akış şeması

3.6.6. Verilerin Kayıt Altına Alınması

Tez çalışması kapsamında izolasyonu ve temini sağlanan klasik yöntemler, MALDI-TOF MS yöntemi ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılan izolasyonların tamamına ait kayıt veri tabanları oluşturulurken iki farklı yaklaşım benimsenmiştir. Bunlardan ilki barkod çalışmasında kullanılan izolatlar için (120 adet) izolat bilgi formlarının düzenlenmesidir. İkincisi ise izolatların tamamı için kayıt ve klasik tanımlama bilgilerinin sorgulanmasına dayalı veri tabanı oluşturulmasıdır. Bilgi formları ve tanımlama test sonuçlarını içeren kayıt verileri bir SQL veri tabanı HTML, PHP, web arayüzü sisteminde kayıt edilmiştir. Oluşturulan sistemin daha sonra uluslar arası kayıt sistemleri ile entegre edilebilmesi için bunlara uygun olarak tasarlanmasına dikkat edilmiştir. Oluşturulmuş olan bu kayıt sorgulama sisteminde izolasyonlara ait sıra numaraları, ID numaraları, tanımlanan tür ismi, takson adı, takson kodu, grubu, grup kodu, örneklem kodu ve klasik tanımlama sonuçlarından makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal test sonuçları yer almaktadır. Makroskobik tanımlama sonuçları sorgulamalarında alt tanımlama karakteristikleri olarak renk, vizkozite, parlaklık-saydamlık, form, yayılma durumları değerlendirmeleri yer alırken mikroskobik tanımlama sorgulamaları altında ise hücre şekli ve hücre dizilişi değerlendirmeleri yer almıştır. Benzer şekilde biyokimyasal değerlendirme sorgulaması altında ise izolasyonların maltoz, galaktoz, glukoz, rafinoz, sellebiyoz karbonhidrat fermantasyon testleri ve nitrat indirgeme test sonuçları yer almıştır. İzolasyonlar için oluşturulan kayıt bilgi formlarında ise izolasyon ID leri, klasik tanımlama sonuçları, MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları, gen bölgelerine spesifik primerler, gen bölgelerinin sekans dataları, ayırım yapmada kullanılan açıklayıcı barkod yapıları, taksonomik bilgiler yer almaktadır. Barkod yapılarının ortaya konulduğu izolasyonlar için oluşturulan kayıt bilgi formuna ait bir örnek aşağıda (Çizelge 3.9)'da verilmiştir. Bu amaçla oluşturulan veri kayıtlarını içeren web veri bankası (“www.dnabarcodfoodomics.com”) üzerinden online erişim sağlanabilmektedir.

Çizelge 3.9. DNA barkodlaması yapılan izolasyonlar için kullanılan örnek doldurulmamış kayıt bilgi formu

| | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Genel Bilgi Formu | | | No: |
| ID | | | |
| Kaynağı | | GPS Kodu: | |
| Takson Adı | | Tarih | |
| | | Takson Kodu | |
| Sınıflandırılma | | | |
| Tür tayini | | | |
| Güvenlik düzeyi | | | |
| Ürün Formatı | | | |
| Depolama Koşulları | | | |
| Besiyeri | | | |
| Gelişme Şartları | | | |
| Sınıflandırılma | | | |
| Klasik Tanımlama Sonuçları | | | |
| Makroskobik Tanımlama | Mikroskobik Tanımlama | Biyokimyasal Tanımlama | |
| Resim | Resim | Test Adı | Değerlendirme |
| | | Maltoz Testi | |
| | | Galaktoz Testi | |
| | | Glukoz Testi | |
| | | Rafinoz Testi | |
| | | Cellobiyoz Testi | |
| | | Nitrat İndirgeme Testi | |
| Değerlendirme | Değerlendirme | Değerlendirme | |
| | | | |
| MALDI-TOF MS Tanımlama Sonucu | | | |
| Family | Genus | Species | Similarity |
| | | | |
| Moleküler Tanımlama Sonuçları | | | |
| Primer Gen Bölgesi | ITS (ileri-geri yön) | LSU (ileri-geri yön) | RPB2 (ileri-geri yön) |
| Primer Sekansı | | | |
| Sekans Datası | | | |
| | ITS | LSU | RPB2 |
| NCBI Blast Sorgulaması: | | | |
| | | | |
| | | | |
| DNA Barkod Yapısı | | | |
| | ITS | LSU | RPB2 |
| Barkod Sekansı | | | |
| Barkod Görseli | | | |

3.7. Kimyasal ve Malzemeler

Kullanılan besiyerleri YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol), nutrient broth (Merck, Almanya), steril naylon torba (Ser marka, Türkiye) temin edilmiştir. Biyokimyasal analizlerde kullanılan glukoz, maltoz, galaktoz, sellobiyoz, rafinoz Triptofan (Pepton), asetik asit, bromtimol mavisi indikatörü , metilenindikatörü, metilen mavisi boyası, gliserol, NAOH, agaroz Merck (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

3.8. İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar değerlendirilirken filogenetik ağaç oluşturan, motif yapılarını ortaya koyan yazılımlar ve istatistiksel yazılımlar kullanılmıştır. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında ve değerlendirilmesinde CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) yazılımı kullanılmıştır [272]. CLUSTALW programının GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/ete/>) üzerinde de uygulama bulan ETE3 yaklaşımını kullanarak ağaç yapılarını ortaya konmuştur [274-276]. DNA barkodlarının ortaya konulmasında (benzer ve farklı motiflerin değerlendirilmesi) MEME-suit programı (<http://meme-suite.org/>) kullanılmış ve sonuçlar özet çıktılar olarak verilmiştir [277]. Elde edilen filogenetik ağaçlardaki grup dağılımlarının benzerlik ve uzaklıklarının değerlendirilmesinde MEGA7 (molecular evolutionary genetics analysis-<https://www.megasoftware.net/>) yazılımı kullanılmıştır [278]. Elde edilen filogenetik grupların grup dağılımlarının istatistiksel önemliliğinin değerlendirilmesinde XLSTAT 2019.1.2 (<https://www.xlstat.com/en/>) istatistik programı kullanılmıştır [279]. Verilerin analizinde grup dağılımlarının görselleştirilmesi için XLSTAT kullanılarak çok boyutlu ölçeklendirme MDS (multi dimensional scaling) yapılmış ve grup dağılımlarının anlamlılığının değerlendirilmesinde ise yine bu yazılıma ait “k-means clustering” kullanılmıştır [279]. Gen bölgelerine ve barkod sekanslarına bağlı ayırım başarıları ayrıca taksonomik gruplara bağlı olarak yüzde ayırım başarıları cinsinden hesaplanmıştır [280]. Verilerin normal dağılıma uygunluğu ve varyans homojenliği kontrol edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılıklar değerlendirme kısmında ekte (Ek1) verilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma (SD) değerleri olarak verilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

S. cerevisiae DNA barkodlarının ortaya konulması çalışmasında kullanılacak olan izolatlar ilk aşamada sadece koloni morfolojisi göz önünde bulundurularak dört farklı kaynaktan (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4) (toplam 287 adet) sağlanmıştır . Tanımlama aşamasında, elde edilen bu izolatlar öncelikli olarak klasik tanımlamaya tabi tutulmuş, ardından MALDI-TOF MS tanımlamaları yapılmıştır. Bir ön tanımlama aşaması olarak kullanılan klasik tanımlama (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) sonuçları dikkate alınarak değerlendirmeye alınan izolasyonlar daha ileri bir tanımlama aracı olarak MALDI-TOF MS tanımlamasına tabi tutulmuş ve bütün sonuçlar göz önünde bulundurularak değerlendirmeler yapılmıştır. Yapılan bu tanımlamaların ardından PCR tabanlı DNA barkodlama çalışmaları için 2016-2017 yılı izolatlarından DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu DNA ekstraksiyonları ile PCR ve sekans analizlerinden elde edilen gen bölgeleri sekans verileri değerlendirmeye alınmıştır. Elde edilen sekans verileri üzerinden veri işleme çalışmaları yürütülerek filogenetik ilişkiler ortaya konmuş ve *S. cerevisiae* türünün ayırımını yapmada başarılı bir şekilde kullanılacak barkod gen bölgeleri tanımlanmıştır.

4.1. İzolasyon ve Saf Kültürün Eldesi

Bu çalışmada, ticari maya üreticisi firmalardan (Grup 1 - 20 adet), farklı kültür koleksiyonu kuruluşlarından (Grup 2 - 3 adet), ulusal üniversite araştırmacılarından (Grup 3 - (16 adet 2016 yılı) + (46 adet 2018 yılı)), İç Anadolu Bölgesi'nde şehirleri üzüm bağlarından toplanan örneklerden yapılan izolasyonlardan ((Grup 4 - 52 adet 2016 yılı) + (Grup 4 - 88 adet 2017 yılı) + (Grup 4 - 62 adet 2018 yılı)) olmak üzere toplam 287 adet kültür izolasyonu eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu izolatlardan tek koloni düşürme tekniği kullanılarak saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürlerin ilk aşamada klasik yöntemler ile (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) tanımlamaları yapılmıştır. Yapılan bu testler doğrultusunda *S. cerevisiae* maya karakteristiğine uygun özellikler taşıyan suşlar belirlenip ileri tanımlama (MALDI-TOF MS) analiz işlemlerinin yapılması amacıyla stok kültürleri oluşturulmuştur.

4.2. İzolasyonu Yapılan Suşların Makroskobik-Mikroskobik Değerlendirilmesi ve Uygun Şartlarda YGC Besiyerinde Gelişim Durumları

Suşların klasik tanımlama işlemlerinin ilk aşamasında fenotipik değerlendirme de dikkate alınacak olan makroskobik-mikroskobik incelemeler ve uygun şartlarda besiyerinde gelişim durumları incelenmiştir. Petri kutularında YGC besiyerlerinde tek koloni düşürme tekniğine uygun olarak geliştirilen suşların makroskobik değerlendirmeleri yapılırken renk, vizkozite, parlaklık/saydımlık, form (üstten/kenardan), kuruluk/yayımla durumları göz önünde bulundurulmuştur. *S. cerevisiae* suşlarının YGC besiyerlerinde tipik makroskobik gelişim karakteristiklikleri krem renginde gelişim, krem formunda ve kıvamında, yarı parlak-yarı mat, yuvarlak kremi pürüzsüz, yumuşak nemli ve düzgün olduğu belirtilmektedir [3][4][8].

Elde edilen izolatların mikroskobik değerlendirmeleri yapılırken basit boyama yöntemi ile hücre şekli ve hücre dizilişlerine bakılmış ve *S. cerevisiae* türünün mikroskobik morfolojilerine uygun (küresel, eliptik, uzun, tomurcuklanmalı hücre şekline sahip ve hücre dağılımı ise rasgele dağınık veya kümeleşme şeklinde) olması beklenmektedir[3][4][8]. Elde edilen bütün bu izolatların aşağıda (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6)'da tanımlamalarında kullanılacak izolasyon kayıt kodları (ID'leri), elde edilmiş oldukları kaynakları, varsa örneğe ait GPS kodu, makroskobik-mikroskobik değerlendirme sonuçları ve 30 °C'de YGC besiyerinde gelişim durumları verilmiştir. Elde edilen sonuçların (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) değerlendirmeleri aşağıda (Başlık 4.1., 4.2., 4.3. ,4.4., ve 4.5.)'de yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Grup 1 - ticari kaynaklardan elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | 30 °C'de YGC Besiyerinde 2 Günde Makroskobik Gelişim Morfolojileri | Mikroskobik Gelişim Morfolojileri | 30 °C'de YGC Besiyerinde 2-7 Günde Gelişim Durumu |
|----|----------------|-----------------|---|---|---|
| 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 2 | HUF16M0T10002 | Dorbi yaş maya | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF16M0T10003 | Pak yaş maya | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | |
|----|---------------|---------------------------------------|--|--|-------------|
| 4 | HUF16M0T10004 | Germ Mautner markhof yaş maya | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 5 | HUF16M0T10005 | Pak instatın maya 125g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 6 | HUF16M0T10006 | Dr.Oetker Instant kuru maya 10g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 7 | HUF16M0T10007 | Pak Instant kuru hamur maya 10g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 8 | HUF16M0T10008 | Yuva Instant kuru hamur maya 10g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 9 | HUF16M0T10009 | Pak kuru hamur mayası 100g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 10 | HUF16M0T10010 | Yuva aktif kuru hamur mayası 100g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 11 | HUF16M0T10011 | Dr.Oetker ekşi kuru hamur mayası 35g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Kümelenme dağılımı | + |
| 12 | HUF16M0T10012 | Piyale Instant kuru hamur mayası | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 13 | HUF16M0T10013 | TIB/Dıbosh winw 10g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 14 | HUF16M0T10014 | Angel Instant kuru hamur mayası 100g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 15 | HUF16M0T10015 | Angel rice leaven 8g | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 16 | HUF16M0T10016 | Dıbosh aktif kuru şarap mayası 12g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 17 | HUF16M0T10017 | Danboili/Lesaffre yeast 13g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 18 | HUF16M0T10018 | Dr oetker germ kein dampel netwending | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 19 | HUF16M0T10019 | Buggeman Instan 500g | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 20 | HUF16M1C0004 | Şarapcılık | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düğüün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

Grup 1 (ticari kaynaklardan elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumu incelendiğinde

bir adet izolasyon (HUF16M100015) uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim gösteremediği gözlemlenmiştir. Geriye kalan 19 adet izolasyonun tamamının hem makroskobik gelişim açısından hemde mikroskobik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun gelişim karakteristikleri gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Grup 2 - farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C’de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | 30 °C’de YGC Besiyerinde 2 Günde Makroskobik Gelişim Morfolojileri | Mikroskobik Gelişim Morfolojileri | 30 °C’de YGC Besiyerinde 2-7 Günde Gelişim Durumu |
|----|----------------|-------------------------------------|---|---|---|
| 1 | HUF16M1C0001 | RSK/Instant kuru maya (08022) | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 2 | HUF16M1C0002 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763™ | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF16M1C0003 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 6328™ | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

Grup 2 (farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C’de gelişme durumu incelendiğinde tüm izolatların uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen üç izolatın tamamı hem makroskobik hem de mikroskobik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik gelişim özellikleri sergilemiştir.

Çizelge 4.3. Grup 3 - ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C’de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | 30 °C’de YGC Besiyerinde 3 Günde Makroskobik Gelişim Morfolojileri | Mikroskobik Gelişim Morfolojileri | 30 °C’de YGC Besiyerinde 2-7 Günde Gelişim Durumu |
|----|----------------|---------|--|---------------------------------------|---|
| 1 | HUF16M2K10001 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Küçük Rastgele dağılım | + |

| | | | | | |
|----|---------------|-------|---|--|-------------|
| 2 | HUF16M2K10002 | HÜBB | Kahverengimsi Akişkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF16M2K10003 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 4 | HUF16M2K10004 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 5 | HUF16M2K10005 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 6 | HUF16M2K10006 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Stafilokok | + |
| 7 | HUF16M2K10007 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 8 | HUF16M2K10008 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 9 | HUF16M2K10009 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 10 | HUF16M2K10010 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 11 | HUF16M2K10011 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 12 | HUF16M2K10012 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Stafilokok | + |
| 13 | HUF16M2K10013 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 14 | HUF16M2K10014 | HÜBB | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 15 | HUF16M2K10015 | HÜBB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Stafilokok | + |
| 16 | HUF16M2K10016 | HÜBB | Pembemsi Pütürümsü Mat Tırtıklı/düzensiz Kuru/dağmık | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Stafilokok | + |
| 17 | HUF18M2Y10001 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat | Küresel, Eliptik veya uzun | + |

| | | | | | |
|----|---------------|-------|--|---|---|
| | | | Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Rastgele dağılım | |
| 18 | HUF18M2Y10002 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 19 | HUF18M2Y10003 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 20 | HUF18M2Y10004 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 21 | HUF18M2Y10005 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 22 | HUF18M2Y10006 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 23 | HUF18M2Y10007 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 24 | HUF18M2Y10008 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 25 | HUF18M2Y10009 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 26 | HUF18M2Y10010 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 27 | HUF18M2Y10011 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 28 | HUF18M2Y10012 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 29 | HUF18M2Y10013 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | |
|----|---------------|-------|--|---|---|
| | | | Nemli/düzgün | | |
| 30 | HUF18M2Y10014 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 31 | HUF18M2Y10015 | AÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 32 | HUF18M2Z10001 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 33 | HUF18M2Z10002 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 34 | HUF18M2Z10003 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 35 | HUF18M2Z10004 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 36 | HUF18M2Z10005 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 37 | HUF18M2Z10006 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 38 | HUF18M2Z10007 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 39 | HUF18M2Z10008 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 40 | HUF18M2Z10009 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 41 | HUF18M2Z10010 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | |
|----|---------------|-------|--|---|-------------|
| 42 | HUF18M2Z10011 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Streptobasil | + |
| 43 | HUF18M2Z10012 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 44 | HUF18M2Z10013 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 45 | HUF18M2Z10014 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 46 | HUF18M2Z10015 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 47 | HUF18M2Z10016 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Streptobasil | Gelişim yok |
| 48 | HUF18M2Z10017 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 49 | HUF18M2Z10018 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 50 | HUF18M2Z10019 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 51 | HUF18M2Z10020 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 52 | HUF18M2Z10021 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 53 | HUF18M2Z10022 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 54 | HUF18M2Z10023 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 55 | HUF18M2Z10024 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzensiz | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | |
|----|---------------|-------|--|---|---|
| 56 | HUF18M2Z10025 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzenli | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 57 | HUF18M2Z10026 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 58 | HUF18M2Z10027 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzenli | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 59 | HUF18M2Z10028 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzenli | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 60 | HUF18M2Z10029 | ÇÜGMB | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak Nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 61 | HUF18M2Z10030 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzenli | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 62 | HUF18M2Z10031 | ÇÜGMB | Pembe Pütürümsü/dağılgan Mat Kuru/düzenli | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

HÜBB* Hacettepe Üniversite Biyoloj Bölümü

AÜGMB** Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

ÇÜGMB*** Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Grup 3 (ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumu incelendiğinde iki adet izolasyon (HUF16M300014, HUF18M2Z10016) uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim göstermediği belirlenmiştir. Geriye kalan 60 adet izolattan 45'i makroskobik gelişim açısından, 58 tanesinin ise mikroskobik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik gelişim özellikleri sergilediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4. Grup 4 - 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Örnek Alınan Bölgenin GPS Kodu | 30 °C'de YGC Besiyerinde 3 Günde Makroskobik | Mikroskobik Gelişim Morfolojileri | 30 °C'de YGC Besiyerinde 2-7 Günde |
|----|----------------|---------|--------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|
|----|----------------|---------|--------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|

| | | | | Gelişim Morfolojileri | | Gelişim Durumu |
|----|--------------|----------------|------------------------------|--|--|-----------------------|
| 1 | HUF16M3A1001 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 2 | HUF16M3A1002 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF16M3A1003 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Streptobasil | + |
| 4 | HUF16M3A1004 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptobasil | + |
| 5 | HUF16M3A1005 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptobasil | + |
| 6 | HUF16M3A1006 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptobasil | + |
| 7 | HUF16M3A1007 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Gelişim yok | Gelişim yok | + |
| 8 | HUF16M3A1008 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptobasil | + |
| 9 | HUF16M3A2012 | Kayseri Toprak | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 10 | HUF16M3A2013 | Kayseri Toprak | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 11 | HUF16M3A2014 | Kayseri Toprak | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 12 | HUF16M3B1016 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 13 | HUF16M3B1016 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|--------------|-------------------|------------------------------|---|--|---|
| 14 | HUF16M3B1018 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptobasil | + |
| 15 | HUF16M3B1019 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 16 | HUF16M3B1020 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 16 | HUF16M3B1021 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 18 | HUF16M3B1022 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 19 | HUF16M3B1023 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 20 | HUF16M3C1030 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptokok | + |
| 21 | HUF16M3C1031 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 22 | HUF16M3C1032 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 23 | HUF16M3C1033 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 24 | HUF16M3C1034 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|--------------|-----------------|------------------------------|--|--|---|
| 25 | HUF16M3C2038 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 26 | HUF16M3C2039 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 27 | HUF16M3C2041 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 28 | HUF16M3C2042 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 29 | HUF16M3D1047 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 30 | HUF16M3D1048 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 31 | HUF16M3D1049 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 32 | HUF16M3D1052 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 33 | HUF16M3D2057 | Nevşehir Toprak | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Kahverengimsi Akşkan/yapışkan Parlak Cıvık/düzensiz Sulu/yayvan | Streptekok | + |
| 34 | HUF16M3E1059 | Aksaray Üzüm | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 35 | HUF16M3E2066 | Aksaray Toprak | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | Pembemsi Pütürümsü Mat Tırtıklı/düzensiz Kuru/dağınık | Streptekok | + |
| 36 | HUF16M3E2070 | Aksaray Toprak | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | Pembemsi Pütürümsü | Streptekok | + |

| | | | | | | |
|----|--------------|-------------------|------------------------------|---|--|---|
| | | | | Mat Tırtıklı/düzensiz Kuru/dağınık | | |
| 37 | HUF16M3E1076 | Ankara Üzüm | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 38 | HUF16M3E1078 | Ankara Üzüm | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 39 | HUF16M3G1085 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 40 | HUF16M3G1086 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 41 | HUF16M3G1087 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 42 | HUF16M3G1088 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 43 | HUF16M3G1089 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 44 | HUF16M3G1090 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 45 | HUF16M3G1091 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptekok | + |
| 46 | HUF16M3H1099 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptekok | + |
| 47 | HUF16M3H1100 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı | Streptekok | + |

| | | | | | | |
|----|--------------|-----------------|------------------------------|---|--|---|
| | | | | mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | | |
| 48 | HUF16M3H1101 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 49 | HUF16M3H1103 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |
| 50 | HUF16M3H1104 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 51 | HUF16M3H1105 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 52 | HUF16M3H1106 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |

Grup 4 (2016 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumu incelendiğinde izolasyonların ikisinin (HUF16M4A1001, HUF16M4A1007) uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim gösteremediği belirlenmiştir. Geriye kalan toplam 50 adet izolattan izolatanın 42'si makroskopik gelişim açısından, 31 tanesi ise mikroskopik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun gelişim karakteristik özellikleri göstermiştir.

Çizelge 4.5. Grup 4-2017 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskopik ve mikroskopik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Örnek Alınan Bölgenin GPS Kodu | 30 °C'de YGC Besiyerinde 2 Günde Makroskopik Gelişim | Mikroskopik Gelişim Morfolojileri | 30 °C' de YGC Besiyerinde 2-7 Günde Gelişim |
|----|----------------|---------|--------------------------------|--|-----------------------------------|---|
|----|----------------|---------|--------------------------------|--|-----------------------------------|---|

| | | | | Morfolojileri | | Durumu |
|----|---------------|------------------|------------------------------|---|---|---------------|
| 1 | HUF17M3A21001 | Kayseri Üzüm | 38°43'55.5"N 36°23'37.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 2 | HUF17M3A31013 | Kayseri Üzüm | 38°52'12.3"N 35°33'34.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF17M3A31014 | Kayseri Üzüm | 38°52'12.3"N 35°33'34.2"E | Beyaz renkte Mat Pürüzlü Sert Altan kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 4 | HUF17M3A32019 | Kayseri Toprak | 38°52'12.3"N 35°33'34.2"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 5 | HUF17M3A32022 | Kayseri Toprak | 38°52'12.3"N 35°33'34.2"E | Saydam renkte Parlak Yayılgan Jelimsi Nemli/düzdün | Küçük yuvarlak kok şeklinde Rastgele dağılım | + |
| 6 | HUF17M3B31038 | Kırıkkale Üzüm | 39°35'37.0"N 33°23'09.0"E | Saydam renkte Parlak Yayılgan Jelimsi Nemli/düzdün | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 7 | HUF17M3B31039 | Kırıkkale Üzüm | 39°35'37.0"N 33°23'09.0"E | Saydam renkte Parlak Yayılgan Jelimsi Nemli/düzdün | Streptobasil | + |
| 8 | HUF17M3B32047 | Kırıkkale Toprak | 39°35'37.0"N 33°23'09.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 9 | HUF17M3C21049 | Kırşehir Üzüm | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | Saydam renkte Parlak Yayılgan Jelimsi Nemli/düzdün | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 10 | HUF17M3C21050 | Kırşehir Üzüm | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 11 | HUF17M3C21052 | Kırşehir Üzüm | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | Saydam renkte Parlak Yayılgan Jelimsi Nemli/düzdün | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 12 | HUF17M3C31062 | Kırşehir Üzüm | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak Jelimsi Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 13 | HUF17M3C31063 | Kırşehir Üzüm | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 14 | HUF17M3C31064 | Kırşehir | 39°27'26.1"N | Krem rengi | Küresel, eliptik | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|--------------------|------------------------------|---|---|---|
| | | Üzüm | 33°57'37.1"E | Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | veya uzun Rastgele dağılım | |
| 15 | HUF17M3C31065 | Kırşehir Üzüm | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 16 | HUF17M3C31066 | Kırşehir Üzüm | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 17 | HUF17M3C32069 | Kırşehir Toprak | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Kok şeklinde Ufak Rastgele dağılım | + |
| 18 | HUF17M3D31086 | Nevşehir Üzüm | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 19 | HUF17M3D31087 | Nevşehir Üzüm | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 20 | HUF17M3D31088 | Nevşehir Üzüm | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 21 | HUF17M3D31089 | Nevşehir Üzüm | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, Eliptik veya uzun tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 22 | HUF17M3D31090 | Nevşehir Üzüm | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 23 | HUF17M3D32092 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 24 | HUF17M3D32093 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 25 | HUF17M3D32094 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 26 | HUF17M3D32095 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün | Streptobasil | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|-----------------|------------------------------|--|--|---|
| 27 | HUF17M3D32096 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 28 | HUF17M3E21109 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 29 | HUF17M3E21110 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 30 | HUF17M3E21112 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 31 | HUF17M3E21113 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 32 | HUF17M3E21114 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 33 | HUF17M3E21115 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 34 | HUF17M3E22117 | Aksaray Toprak | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |
| 35 | HUF17M3E22121 | Aksaray Toprak | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Beyaz renkte Mat Pürüzlü Sert Altın açık krem renk | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 36 | HUF17M3F21122 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 37 | HUF17M3F21123 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 38 | HUF17M3F21124 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 39 | HUF17M3F21125 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz | Küresel, eliptik veya uzun Tomurcuklanma Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|------------------|------------------------------|--|---|---|
| | | | | Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | | |
| 40 | HUF17M3F21126 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 41 | HUF17M3F21127 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 42 | HUF17M3F21128 | Ankara Toprak | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 43 | HUF17M3F21133 | Ankara Toprak | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 44 | HUF17M3F21134 | Ankara Toprak | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 45 | HUF17M3F31135 | Ankara Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 46 | HUF17M3F31136 | Ankara Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 47 | HUF17M3F31137 | Ankara Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 48 | HUF17M3F31139 | Ankara Üzüm | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 49 | HUF17M3F31140 | Ankara Üzüm | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 50 | HUF17M3F32141 | Ankara Toprak | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 51 | HUF17M3F32145 | Ankara Toprak | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|------------------|------------------------------|---|---|---|
| 52 | HUF17M3F32146 | Ankara Toprak | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 53 | HUF17M3F32142 | Ankara Toprak | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 54 | HUF17M3G31147 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 55 | HUF17M3G31148 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Küf benzeri miselli yapı Siyah renk Ağ benzeri dağılım Altın beyaz kahverengi lekeler | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 56 | HUF17M3G31149 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Streptobasil | + |
| 57 | HUF17M3G31150 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 58 | HUF17M3G31151 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 59 | HUF17M3G31152 | Eskişehir Üzüm | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 60 | HUF17M3G31153 | Eskişehir Toprak | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 61 | HUF17M3G31157 | Eskişehir Toprak | 39°31'29.3"N 30°49'50.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 62 | HUF17M3H21172 | Çankırı Üzüm | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Küf benzeri miselli yapılar Siyah renk Ağ benzeri dağılım | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 63 | HUF17M3H21173 | Çankırı Üzüm | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 64 | HUF17M3H21174 | Çankırı Üzüm | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|------------------------------|---|---|---|
| 65 | HUF17M3H21175 | Çankırı Üzüm | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 66 | HUF17M3H22179 | Çankırı Toprak | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 67 | HUF17M3H22180 | Çankırı Toprak | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 68 | HUF17M3H22181 | Çankırı Toprak | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 69 | HUF17M3H22182 | Çankırı Toprak | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 70 | HUF17M3H31185 | Çankırı Üzüm | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 71 | HUF17M3H32189 | Çankırı Toprak | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 72 | HUF17M3H32190 | Çankırı Toprak | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 73 | HUF17M3H32191 | Çankırı Toprak | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 74 | HUF17M3H32194 | Çankırı Toprak | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 75 | HUF17M3H21196 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 76 | HUF17M3H21197 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 77 | HUF17M3H21199 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|------------------------------|--|---|---|
| | | | | kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | | |
| 78 | HUF17M3H21200 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 79 | HUF17M3H21208 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 80 | HUF17M3H21209 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 81 | HUF17M3H21210 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 82 | HUF17M3H21211 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Streptobasil | + |
| 83 | HUF17M3H21212 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 84 | HUF17M3H21213 | Karaman Üzüm | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Streptobasil | + |
| 85 | HUF17M3H22215 | Karaman Toprak | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |
| 86 | HUF17M3H22217 | Karaman Toprak | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Orta koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 87 | HUF17M3H22218 | Karaman Toprak | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 88 | HUF17M3H22219 | Karaman Toprak | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Hafif koyu krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altın kahverengi | İnce uzun basiller Rastgele dağılım | + |

Grup 4 (2017 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30

⁰C’de gelişme durumu incelendiğinde izolasyonların tamamının uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Toplam 88 adet izolattan 79’u makroskobik gelişim açısından, 69’u ise mikroskobik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun gelişim karakteristikleri gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. Grup 4-2018 yılında İç Anadolu Bölgesi’ndeki üzüm bağlarından elde edilen mikroorganizma suşlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 ⁰C’de gelişme durumları

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Örnek Alınan Bölgenin GPS Kodu | 30 °C’de YGC Besiyerinde 2 Günde Makroskobik Gelişim Morfolojileri | Mikroskobik Gelişim Morfolojileri | 30 °C’ de YGC Besiyerinde 2-7 Günde Gelişim Durumu |
|----|----------------|------------------|--------------------------------|--|---|--|
| 1 | HUF18M3A11001 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 2 | HUF18M3A11003 | Kayseri Üzüm | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 3 | HUF18M3A11005 | Kayseri Toprak | 38°45'06.4"N 35°18'25.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 4 | HUF18M3A21007 | Kayseri Üzüm | 38°43'55.5"N 36°23'37.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 5 | HUF18M3A22009 | Kayseri Toprak | 38°43'55.5"N 36°23'37.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 6 | HUF18M3B11002 | Kırıkkale Üzüm | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 7 | HUF18M3B12004 | Kırıkkale Toprak | 39°45'45.9"N 33°30'59.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzensiz Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 8 | HUF18M3B12005 | Kırıkkale | 39°45'45.9"N | Krem rengi | Küresel, eliptik | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|---------------------|------------------------------|--|--|---|
| | | Toprak | 33°30'59.5"E | Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | veya uzun Rastgele dağılım | |
| 9 | HUF18M3B31006 | Kırıkkale Toprak | 39°35'37.0"N 33°23'09.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 10 | HUF18M3B21008 | Kırıkkale Üzüm | 39°40'46.9"N 33°42'21.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 11 | HUF18M3B22010 | Kırıkkale Toprak | 39°40'46.9"N 33°42'21.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 12 | HUF18M3B22011 | Kırıkkale Toprak | 39°40'46.9"N 33°42'21.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 13 | HUF18M3C11001 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 14 | HUF18M3C11002 | Kırşehir Üzüm | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 15 | HUF18M3C12005 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 16 | HUF18M3C12006 | Kırşehir Toprak | 39°05'02.8"N 34°22'50.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 17 | HUF18M3C21008 | Kırşehir Üzüm | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 18 | HUF18M3C22010 | Kırşehir Toprak | 39°22'26.0"N 33°43'21.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|-----------------|------------------------------|--|--|---|
| | | | | Altan kahverengi | | |
| 19 | HUF18M3C32012 | Kırşehir Toprak | 39°27'26.1"N 33°57'37.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Kok şeklinde Ufak Rastgele dağılım | + |
| 20 | HUF18M3D11001 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 21 | HUF18M3D11003 | Nevşehir Üzüm | 38°43'40.4"N 34°57'22.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 22 | HUF18M3D21006 | Nevşehir Üzüm | 38°29'33.6"N 34°54'42.5" | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 23 | HUF18M3D21008 | Nevşehir Üzüm | 38°29'33.6"N 34°54'42.5" | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 24 | HUF18M3D22011 | Nevşehir Toprak | 38°29'33.6"N 34°54'42.5" | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 25 | HUF18M3D32013 | Nevşehir Toprak | 38°34'22.9"N 34°36'59.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 26 | HUF18M3E11003 | Aksaray Üzüm | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 27 | HUF18M3E12005 | Aksaray Toprak | 38°31'04.9"N 33°51'01.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 28 | HUF18M3E21007 | Aksaray Üzüm | 38°32'15.3"N 34°23'52.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 29 | HUF18M3F11001 | Ankara Üzüm | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|---------------------|------------------------------|--|--|---|
| | | | | kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | dağılım | |
| 30 | HUF18M3F11003 | Ankara Üzüm | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 31 | HUF18M3F11005 | Ankara Üzüm | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | |
| 32 | HUF18M3F12007 | Ankara Toprak | 40°05'20.3"N 32°28'45.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 33 | HUF18M3F21010 | Ankara Üzüm | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 34 | HUF18M3F21012 | Ankara Üzüm | 39°51'35.0"N 32°44'31.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 35 | HUF18M3F22018 | Ankara Toprak | 40°07'25.2"N 33°02'13.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 36 | HUF18M3G11001 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 37 | HUF18M3G11004 | Eskişehir Üzüm | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 38 | HUF18M3G12006 | Eskişehir Toprak | 39°48'12.8"N 30°35'36.9"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 39 | HUF18M3G21009 | Eskişehir Üzüm | 39°31'18.8"N 31°37'52.1"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|------------------------------|---|--|---|
| 40 | HUF18M3H11001 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 41 | HUF18M3H11004 | Çankırı Üzüm | 40°42'09.1"N 33°31'22.6"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 42 | HUF18M3H22007 | Çankırı Toprak | 40°31'24.1"N 33°29'40.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 43 | HUF18M3H32012 | Çankırı Toprak | 40°49'28.4"N 32°53'40.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 44 | HUF18M3I11002 | Karaman Üzüm | 37°27'06.5"N 34°08'18.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 45 | HUF18M3I11003 | Karaman Üzüm | 37°27'06.5"N 34°08'18.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 46 | HUF18M3I22005 | Karaman Toprak | 37°27'06.5"N 34°08'18.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 47 | HUF18M3I22006 | Karaman Toprak | 37°19'15.9"N 33°19'46.4"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 48 | HUF18M3J11001 | Sivas Üzüm | 39°57'24.1"N 37°44'02.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 49 | HUF18M3J11004 | Sivas Toprak | 39°57'24.1"N 37°44'02.8"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Alttan kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 50 | HUF18M3J21008 | Sivas Üzüm | 39°47'54.9"N 36°15'31.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|------------------|------------------------------|--|--|---|
| | | | | nemli/düzgün Altta kahverengi | | |
| 51 | HUF18M3J22010 | Sivas Toprak | 39°47'54.9"N 36°15'31.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 52 | HUF18M3K11002 | Konya Üzüm | 38°11'30.3"N 33°09'40.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 53 | HUF18M3K12004 | Konya Toprak | 38°11'30.3"N 33°09'40.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 54 | HUF18M3K21007 | Konya Üzüm | 37°33'23.0"N 32°46'11.5"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 55 | HUF18M3L11001 | Yozgat Üzüm | 39°21'10.2"N 35°05'54.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 56 | HUF18M3L11003 | Yozgat Üzüm | 39°21'10.2"N 35°05'54.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 57 | HUF18M3L12005 | Yozgat Toprak | 39°21'10.2"N 35°05'54.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 58 | HUF18M3L12007 | Yozgat Toprak | 39°21'10.2"N 35°05'54.2"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 59 | HUF18M3L21008 | Yozgat Üzüm | 39°59'47.2"N 34°39'02.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 60 | HUF18M3L21010 | Yozgat Üzüm | 39°59'47.2"N 34°39'02.0"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |
| 61 | HUF18M3L32011 | Yozgat Toprak | 39°57'17.7"N 35°42'45.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele | + |

| | | | | | | |
|----|---------------|------------------|------------------------------|--|--|---|
| | | | | kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | dağılım | |
| 62 | HUF18M3L32014 | Yozgat Toprak | 39°57'17.7"N 35°42'45.3"E | Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremsi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzdün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Rastgele dağılım | + |

Grup 4 (2018 yılında İç Anadolu Bölgesi'ndeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen mikroorganizma suşları) izolatlarının makroskobik ve mikroskobik morfolojileri ile 30 °C'de gelişme durumu incelendiğinde izolasyonların tamamının uygun şartlar altında YGC besiyerinde gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Toplam 62 adet izolattan 62'si makroskobik gelişim açısından, 61'i ise mikroskobik gelişim açısından *S. cerevisiae* türüne uygun gelişim karakteristikleri gösterdiği gözlemlenmiştir.

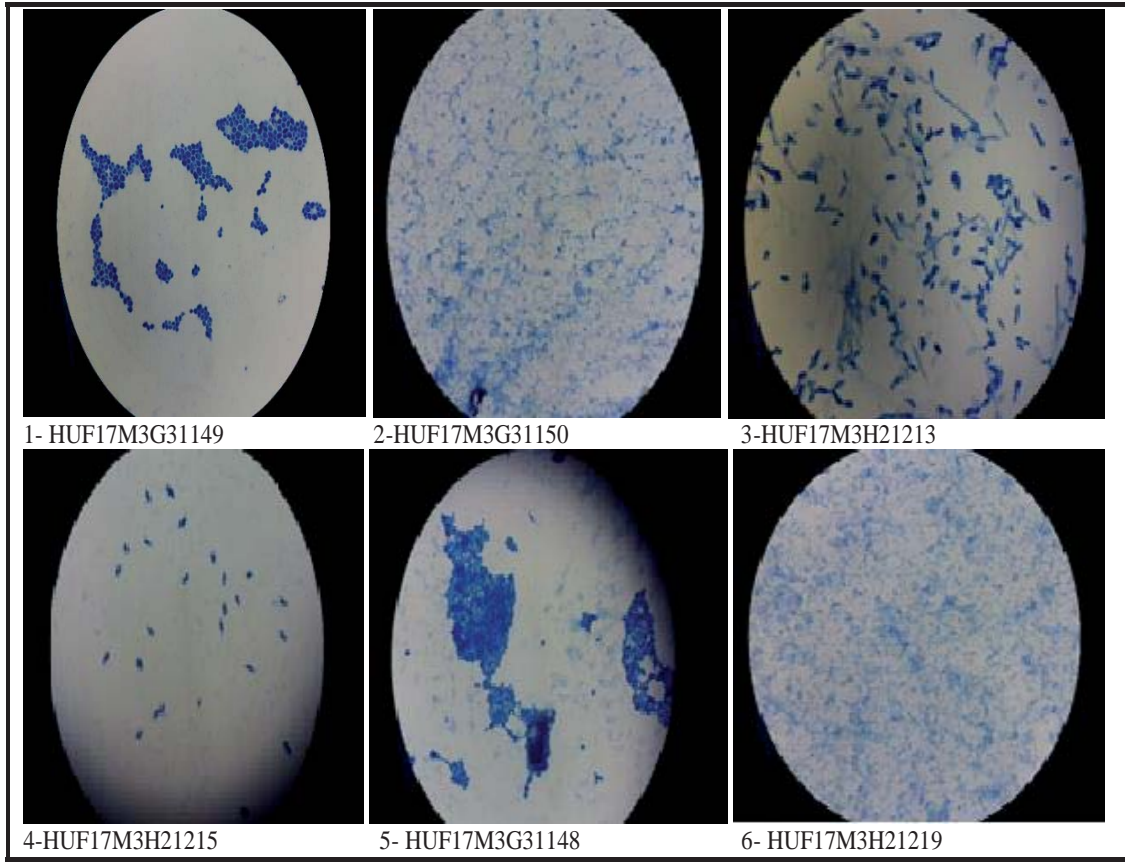
Petri kutularında YGC besiyerlerinde tek koloni düşürme tekniğine uygun olarak geliştirilen suşların makroskobik değerlendirmeleri yapılırken renk, vizkozite, parlaklık/saydamlık, form (üstten/kenardan), kuruluk/yayıma durumları göz önünde bulundurulmuştur. *S. cerevisiae* suşlarının YGC besiyerlerinde tipik makroskobik gelişim karakteristikleri krem renginde gelişim, krem formunda ve kıvamında, yarı parlak-yarı mat, yuvarlak kremsi pürüzsüz, yumuşak nemli ve düzdün olması beklenmiştir [3][4][8]. Yapılan izolasyonların makroskobik incelemeleri sonucunda yaygın olarak aşağıda (Çizelge 4.7.)'de verilen morfolojik gelişim şekilleri gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7. YGC besiyerinde gelişim gösteren farklı makroskobik gelişim tipleri

| | | | |
|----------------------|------------------|-------------------|----------------|
| Krem rengi | Kahverengimsi | Pembemsi | Pembe |
| Krem formunda | Akışkan/yapışkan | Pütürümsü | Akışkan |
| Yarı parlak-yarı mat | Parlak | Mat | Parlak |
| Yuvarlak | Cıvık/düzensiz | Tırtıklı/düzensiz | Cıvık/düzensiz |
| Kremsi/pürüzsüz | Sulu/yayvan | Kuru/dağınık | Sulu/yayvan |
| Yumuşak | | | |
| Nemli/düzdün | | | |

Elde edilen izolatların mikroskobik değerlendirmeleri yapılırken basit boyama yöntemi ile hücre şekli ve hücre dizilişlerine bakılmış ve *S. cerevisiae* türünün mikroskobik morfolojilerine uygun (küresel, eliptik, uzun, tomurcuklanmalı hücre şekline rasgele dağınık veya kümeleşme şeklinde) hücre dağılımına sahip olması beklenmiştir. Yapılan mikroskobik analizlerde izole edilen suşlardan temel olarak birkaç farklı mikroskobik

morfoloji gözlemlenmiştir. Bu mikroskobik gelişim görüntüleri aşağıda (Şekil 4.1) verilen morfolojik gelişim şekillerinde olmuştur.



Şekil 4.1. Elde edilen izolasyonlardan farklı tipteki mikroskobik morfoloji görüntüleri

Tek başına makroskobik değerlendirme dikkate alındığında Grup 1 için 19 adet suş, Grup 2 için 3 adet suş, Grup 3 için 45 adet suş ve Grup 4 için ise birinci aşama (2016 yılı) izolasyonları için 42 adet suş, ikinci aşama izolasyonları (2017 yılı) izolasyonları için 79 adet suş, üçüncü aşama (2018 yılı) izolasyonları için 62 adet suş olmak üzere toplam 250 adet suşun YGC besiyerinde 30 °C'de 48 saatlik *S. cerevisiae* türü makroskobik gelişim morfolojisine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Tek başına mikroskobik değerlendirme dikkate alındığında Grup 1 için 19 adet suş, Grup 2 için 3 adet suş, Grup 3 için 58 adet suş ve Grup 4 için ise birinci aşama (2016 yılı) izolasyonları için 31 adet suş, ikinci aşama izolasyonları (2017 yılı) izolasyonları için 69 adet suş, üçüncü aşama (2018 yılı) izolasyonları için 61 adet suş olmak üzere toplam 241 adet suşun YGC besiyerinde 30 °C'de 48 saatlik *S. cerevisiae* türü mikroskobik gelişim morfolojisine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Bütün izolasyonlar makroskobik ve mikroskobik koloni morfolojileri dikkate alınarak *S. cerevisiae* uygunluğu yönünden değerlendirmeye alındığında, yapılan izolasyonların (2016, 2017, 2018 yılı üzüm bağı izolasyonları dahil) 229 adet suşun tipik *S. cerevisiae* gelişim karakteristiklerine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan 287 adet izolasyondan altı tanesi (HUF16M100015, HUF16M300014, HUF16M4A1001, HUF18M2Z10016, HUF18M2Z10017, HUF18M2Z10019) gelişim sorunu göstererek gelişimlerini kaybetmişlerdir.

4.3. İzolasyonu Yapılan Suşların Biyokimyasal Test Değerlendirmesi

Farklı kaynaklardan kültürleri elde edilen mikroorganizmaların biyokimyasal test değerlendirmeleri yapılırken karbonhidrat fermantasyon testleri ve nitrat indirgeme testleri uygulanmış ve biyokimyasal test ayırım ağacı (Şekil 3.4.) kullanılarak değerlendirmeye gidilmiştir[3][4][7][8]. Bu testler maltoz, glukoz, galaktoz, rafinoz, sellobiyoz gibi karbonhidrat fermantasyon değerlendirme testleri ve nitrat indirgeme değerlendirmesi testlerinden oluşmaktadır. Suşlardan bazılarında uygulanan nitrat indirgeme testinden net bir sonuç elde edilememiştir bu suşlar aşağıda (Çizelge 4.8) verilmiştir. İzolasyonu yapılan suşların biyokimyasal test değerlendirme sonuçları aşağıdaki (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10 Çizelge 4.11 Çizelge 4.12, Çizelge 4.13, Çizelge 4.14, ve Çizelge 4.15) verilmiştir.

Çizelge 4.8. Nitrat indirgenme testine bağlı olarak biyokimyasal değerlendirmesi yapılmamış izolasyonlar

| | | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| HUF16M2K10008 | HUF16M3A11004 | HUF16M3A11005 | HUF16M3A11006 | HUF16M3A11008 |
| HUF16M3A12012 | HUF16M3A12013 | HUF16M3C12039 | HUF16M3C12042 | HUF16M3D12057 |
| HUF17M3A32022 | | | | |

Çizelge 4.9. Grup 1 - ticari kaynaklardan elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Karbon Kaynağı | | | | |
|----|----------------|-----------------|----------------|----------|--------|---------|-----------|
| | | | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | + | + | + | + | - |
| 2 | HUF16M0T10002 | Dorbi yaş maya | + | + | + | + | - |
| 3 | HUF16M0T10003 | Pak yaş maya | + | + | + | + | - |

| | | | | | | | |
|----|---------------|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 4 | HUF16M0T10004 | Germ Mautner markhof yaş maya | + | + | + | + | - |
| 5 | HUF16M0T10005 | Pak instatn maya 125g | + | + | + | + | - |
| 6 | HUF16M0T10006 | Dr.Oetker Instant kuru maya 10g | + | + | + | + | - |
| 7 | HUF16M0T10007 | Pak Instant kuru hamur maya 10g | + | + | + | + | - |
| 8 | HUF16M0T10008 | Yuva Instant kuru hamur maya 10g | + | + | + | + | - |
| 9 | HUF16M0T10009 | Pak kuru hamur mayası 100g | + | + | + | + | - |
| 10 | HUF16M0T10010 | Yuva aktif kuru hamur mayası 100g | + | + | + | + | - |
| 11 | HUF16M0T10011 | Dr.Oetker ekşi kuru hamur mayası 35g | + | + | + | + | - |
| 12 | HUF16M0T10012 | Piyale Instant kuru hamur mayası | + | + | + | + | - |
| 13 | HUF16M0T10013 | TIB/Dibosh winw 10g | + | + | + | + | - |
| 14 | HUF16M0T10014 | Angel Instant kuru hamur mayası 100g | + | + | + | + | - |
| 15 | HUF16M0T10015 | Angel rice leaven 8g | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 16 | HUF16M0T10016 | Dibosh aktif kuru şarap mayası 12g | + | + | + | + | - |
| 17 | HUF16M0T10017 | Danboili/Lesaffre yeeast 13g | + | + | + | + | - |
| 18 | HUF16M0T10018 | Dr oetker germ kein dampel netwending | + | + | + | + | - |
| 19 | HUF16M0T10019 | Buggeman Instan 500g | + | + | + | + | - |
| 20 | HUF16M1C0004 | Şarapçılık | + | + | + | + | - |

Grup 1 (ticari kaynaklardan elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde 19 adet izolasyonun tamamının biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.10. Grup 2 - farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| İzolasyon Bilgisi | | | Karbon Kaynağı | | | | |
|-------------------|----------------|--|----------------|----------|--------|---------|-----------|
| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF16M1C0001 | <i>S. cerevisiae</i> RSK/Instant kuru maya (08022) | + | + | + | + | - |

| | | | | | | | |
|---|--------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|
| 2 | HUF16M1C0002 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763™ | + | + | + | + | - |
| 3 | HUF16M1C0003 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 6328™ | + | + | + | + | - |

Grup 2 (farklı kültür koleksiyonlarından elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde suşların tamamının biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11. Grup 3 - ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Karbon Kaynağı | | | | |
|----|----------------|---------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF16M2K10001 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 2 | HUF16M2K10002 | HÜBB | - | - | + | - | + |
| 3 | HUF16M2K10003 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 4 | HUF16M2K10004 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 5 | HUF16M2K10005 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 6 | HUF16M2K10006 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 7 | HUF16M2K10007 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 8 | HUF16M2K10008 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 9 | HUF16M2K10009 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 10 | HUF16M2K10010 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 11 | HUF16M2K10011 | HÜBB | - | - | + | - | + |
| 12 | HUF16M2K10012 | HÜBB | - | - | + | - | + |
| 13 | HUF16M2K10013 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 14 | HUF16M2K10014 | HÜBB | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim Yok |
| 15 | HUF16M2K10015 | HÜBB | + | + | + | + | - |
| 16 | HUF16M2K10016 | HÜBB | - | - | + | * | + |
| 17 | HUF18M2Y10001 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 18 | HUF18M2Y10002 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 19 | HUF18M2Y10003 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 20 | HUF18M2Y10004 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 21 | HUF18M2Y10005 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 22 | HUF18M2Y10006 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 23 | HUF18M2Y10007 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 24 | HUF18M2Y10008 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 25 | HUF18M2Y10009 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 26 | HUF18M2Y10010 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 27 | HUF18M2Y10011 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 28 | HUF18M2Y10012 | AÜGMB | + | + | + | + | - |

| | | | | | | | |
|----|---------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 29 | HUF18M2Y10013 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 30 | HUF18M2Y10014 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 31 | HUF18M2Y10015 | AÜGMB | + | + | + | + | - |
| 32 | HUF18M2Z10001 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 33 | HUF18M2Z10002 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 34 | HUF18M2Z10003 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 35 | HUF18M2Z10004 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 36 | HUF18M2Z10005 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 37 | HUF18M2Z10006 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 38 | HUF18M2Z10007 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 39 | HUF18M2Z10008 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 40 | HUF18M2Z10009 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 41 | HUF18M2Z10010 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 42 | HUF18M2Z10011 | ÇÜGMB | - | - | + | * | + |
| 43 | HUF18M2Z10012 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 44 | HUF18M2Z10013 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 45 | HUF18M2Z10014 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 46 | HUF18M2Z10015 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 47 | HUF18M2Z10016 | ÇÜGMB | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 48 | HUF18M2Z10017 | ÇÜGMB | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 49 | HUF18M2Z10018 | ÇÜGMB | - | - | + | - | + |
| 50 | HUF18M2Z10019 | ÇÜGMB | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok |
| 51 | HUF18M2Z10020 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 52 | HUF18M2Z10021 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 53 | HUF18M2Z10022 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 54 | HUF18M2Z10023 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 55 | HUF18M2Z10024 | ÇÜGMB | - | - | + | * | + |
| 56 | HUF18M2Z10025 | ÇÜGMB | - | - | + | * | + |
| 57 | HUF18M2Z10026 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 58 | HUF18M2Z10027 | ÇÜGMB | - | - | + | * | + |
| 59 | HUF18M2Z10028 | ÇÜGMB | - | - | + | * | + |
| 60 | HUF18M2Z10029 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 61 | HUF18M2Z10030 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |
| 62 | HUF18M2Z10031 | ÇÜGMB | + | + | + | + | - |

* Test ayırım ağacı (Şekil 3.4.) dikkate alınarak uygulanmamıştır.

HÜBB* Hacettepe Üniversite Biyoloj Bölümü

AÜGMB** Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

ÇÜGMB*** Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Grup 3 (ulusal üniversite araştırmacılarından elde edilen mikroorganizma suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde 48 adet izolasyonun biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.12. Grup 4 - 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Karbon Kaynağı | | | | |
|----|----------------|-----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF16M3A1001 | Kayseri Üzüm | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim Yok |
| 2 | HUF16M3A1002 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 3 | HUF16M3A1003 | Kayseri Üzüm | + | + | + | + | + |
| 4 | HUF16M3A1004 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 5 | HUF16M3A1005 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | + |
| 6 | HUF16M3A1006 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | + |
| 7 | HUF16M3A1007 | Kayseri Üzüm | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim yok | Gelişim Yok |
| 8 | HUF16M3A1008 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | + |
| 9 | HUF16M3A2012 | Kayseri Toprak | + | + | + | + | + |
| 10 | HUF16M3A2013 | Kayseri Toprak | + | + | + | + | + |
| 11 | HUF16M3A2014 | Kayseri Toprak | + | + | + | + | + |
| 12 | HUF16M3B1016 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 13 | HUF16M3B1016 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 14 | HUF16M3B1018 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 15 | HUF16M3B1019 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 16 | HUF16M3B1020 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 16 | HUF16M3B1021 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 18 | HUF16M3B1022 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 19 | HUF16M3B1023 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 20 | HUF16M3C1030 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | + |
| 21 | HUF16M3C1031 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 22 | HUF16M3C1032 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 23 | HUF16M3C1033 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 24 | HUF16M3C1034 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 25 | HUF16M3C2038 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 26 | HUF16M3C2039 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | + |
| 27 | HUF16M3C2041 | Kırşehir Toprak | + | + | + | + | + |
| 28 | HUF16M3C2042 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | + |
| 29 | HUF16M3D1047 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 30 | HUF16M3D1048 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 31 | HUF16M3D1049 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 32 | HUF16M3D1052 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 33 | HUF16M3D2057 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | + |
| 34 | HUF16M3E1059 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 35 | HUF16M3E2066 | Aksaray Toprak | - | - | + | * | + |
| 36 | HUF16M3E2070 | Aksaray Toprak | - | - | + | * | + |
| 37 | HUF16M3E1076 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 38 | HUF16M3E1078 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 39 | HUF16M3G1085 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 40 | HUF16M3G1086 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 41 | HUF16M3G1087 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 42 | HUF16M3G1088 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |

| | | | | | | | |
|----|--------------|----------------|---|---|---|---|---|
| 43 | HUF16M3G1089 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 44 | HUF16M3G1090 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 45 | HUF16M3G1091 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 46 | HUF16M3H1099 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | + |
| 47 | HUF16M3H1100 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 48 | HUF16M3H1101 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 49 | HUF16M3H1103 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 50 | HUF16M3H1104 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 51 | HUF16M3H1105 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 52 | HUF16M3H1106 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |

* Test ayırım ağacı (Şekil 3.4.) dikkate alınarak uygulanmamıştır.

Grup 4 (2016 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde 35 adet izolasyonun biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.13. Grup 4 - 2017 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Karbon Kaynağı | | | | |
|----|----------------|------------------|----------------|----------|--------|---------|-----------|
| | | | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF17M3A21001 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 2 | HUF17M3A31013 | Kayseri Üzüm | + | + | + | + | + |
| 3 | HUF17M3A31014 | Kayseri Üzüm | - | + | + | - | + |
| 4 | HUF17M3A32019 | Kayseri Toprak | + | - | + | + | - |
| 5 | HUF17M3A32022 | Kayseri Toprak | + | + | + | - | - |
| 6 | HUF17M3B31038 | Kırıkkale Üzüm | - | + | + | * | + |
| 7 | HUF17M3B31039 | Kırıkkale Üzüm | - | + | + | * | + |
| 8 | HUF17M3B32047 | Kırıkkale Toprak | + | + | + | + | + |
| 9 | HUF17M3C21049 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 10 | HUF17M3C21050 | Kırşehir Üzüm | + | + | + | + | + |
| 11 | HUF17M3C21052 | Kırşehir Üzüm | - | + | + | * | - |
| 12 | HUF17M3C31062 | Kırşehir Üzüm | - | + | + | * | - |
| 13 | HUF17M3C31063 | Kırşehir Üzüm | + | + | + | + | - |
| 14 | HUF17M3C31064 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 15 | HUF17M3C31065 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 16 | HUF17M3C31066 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 17 | HUF17M3C32069 | Kırşehir Toprak | - | + | + | * | + |
| 18 | HUF17M3D31086 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 19 | HUF17M3D31087 | Nevşehir Üzüm | - | + | + | * | - |
| 20 | HUF17M3D31088 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 21 | HUF17M3D31089 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 22 | HUF17M3D31090 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 23 | HUF17M3D32092 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | - |

| | | | | | | | |
|----|---------------|------------------|---|---|---|---|---|
| 24 | HUF17M3D32093 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 25 | HUF17M3D32094 | Nevşehir Toprak | - | + | + | * | - |
| 26 | HUF17M3D32095 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 27 | HUF17M3D32096 | Nevşehir Toprak | + | + | + | + | + |
| 28 | HUF17M3E21109 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 29 | HUF17M3E21110 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 30 | HUF17M3E21112 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 31 | HUF17M3E21113 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 32 | HUF17M3E21114 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 33 | HUF17M3E21115 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 34 | HUF17M3E22117 | Aksaray Toprak | - | - | + | * | - |
| 35 | HUF17M3E22121 | Aksaray Toprak | - | + | + | * | - |
| 36 | HUF17M3F21122 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 37 | HUF17M3F21123 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 38 | HUF17M3F21124 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 39 | HUF17M3F21125 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 40 | HUF17M3F21126 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 41 | HUF17M3F21127 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 42 | HUF17M3F21128 | Ankara Toprak | - | - | + | * | - |
| 43 | HUF17M3F21133 | Ankara Toprak | - | + | + | * | + |
| 44 | HUF17M3F21134 | Ankara Toprak | - | - | + | * | - |
| 45 | HUF17M3F31135 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 46 | HUF17M3F31136 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 47 | HUF17M3F31137 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 48 | HUF17M3F31139 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 49 | HUF17M3F31140 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 50 | HUF17M3F32141 | Ankara Toprak | - | - | + | * | - |
| 51 | HUF17M3F32145 | Ankara Toprak | - | + | + | * | - |
| 52 | HUF17M3F32146 | Ankara Toprak | - | - | + | * | - |
| 53 | HUF17M3F32142 | Ankara Toprak | - | + | + | * | + |
| 54 | HUF17M3G31147 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 55 | HUF17M3G31148 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 56 | HUF17M3G31149 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 57 | HUF17M3G31150 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 58 | HUF17M3G31151 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 59 | HUF17M3G31152 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 60 | HUF17M3G31153 | Eskişehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 61 | HUF17M3G31157 | Eskişehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 62 | HUF17M3H21172 | Çankırı Üzüm | - | + | + | * | + |
| 63 | HUF17M3H21173 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 64 | HUF17M3H21174 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 65 | HUF17M3H21175 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 66 | HUF17M3H22179 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | + |
| 67 | HUF17M3H22180 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | - |
| 68 | HUF17M3H22181 | Çankırı Toprak | - | + | + | * | + |
| 69 | HUF17M3H22182 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | - |
| 70 | HUF17M3H31185 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 71 | HUF17M3H32189 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | - |
| 72 | HUF17M3H32190 | Çankırı Toprak | - | + | + | * | - |

| | | | | | | | |
|----|---------------|----------------|---|---|---|---|---|
| 73 | HUF17M3H32191 | Çankırı Toprak | - | + | + | * | - |
| 74 | HUF17M3H32194 | Çankırı Toprak | - | + | + | * | - |
| 75 | HUF17M3H21196 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 76 | HUF17M3H21197 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 77 | HUF17M3H21199 | Karaman Üzüm | + | + | + | + | + |
| 78 | HUF17M3H21200 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 79 | HUF17M3H21208 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 80 | HUF17M3H21209 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 81 | HUF17M3H21210 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 82 | HUF17M3H21211 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 83 | HUF17M3H21212 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 84 | HUF17M3H21213 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 85 | HUF17M3H22215 | Karaman Toprak | - | - | + | * | - |
| 86 | HUF17M3H22217 | Karaman Toprak | - | + | + | * | - |
| 87 | HUF17M3H22218 | Karaman Toprak | - | - | + | * | - |
| 88 | HUF17M3H22219 | Karaman Toprak | - | - | + | * | - |

* Test ayırım ağacı (Şekil 3.4.) dikkate alınarak uygulanmamıştır.

Grup 4 (2017 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde 73 adet izolasyonun biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.14. Grup 4 - 2018 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşlarının biyokimyasal test değerlendirmesi

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Karbon Kaynağı | | | | |
|----|----------------|------------------|----------------|----------|--------|---------|-----------|
| | | | Maltoz | Galaktoz | Glukoz | Rafinoz | Sellobioz |
| 1 | HUF18M3A11001 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 2 | HUF18M3A11003 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 3 | HUF18M3A11005 | Kayseri Toprak | - | - | + | * | - |
| 4 | HUF18M3A21007 | Kayseri Üzüm | - | - | + | * | - |
| 5 | HUF18M3A22009 | Kayseri Toprak | - | - | + | * | - |
| 6 | HUF18M3B11002 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 7 | HUF18M3B12004 | Kırıkkale Toprak | - | - | + | * | - |
| 8 | HUF18M3B12005 | Kırıkkale Toprak | - | - | + | * | - |
| 9 | HUF18M3B31006 | Kırıkkale Toprak | - | - | + | * | - |
| 10 | HUF18M3B21008 | Kırıkkale Üzüm | - | - | + | * | - |
| 11 | HUF18M3B22010 | Kırıkkale Toprak | - | - | + | * | - |
| 12 | HUF18M3B22011 | Kırıkkale Toprak | - | - | + | * | - |
| 13 | HUF18M3C11001 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 14 | HUF18M3C11002 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 15 | HUF18M3C12005 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 16 | HUF18M3C12006 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 17 | HUF18M3C21008 | Kırşehir Üzüm | - | - | + | * | - |

| | | | | | | | |
|----|---------------|------------------|---|---|---|---|---|
| 18 | HUF18M3C22010 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 19 | HUF18M3C32012 | Kırşehir Toprak | - | - | + | * | + |
| 20 | HUF18M3D11001 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 21 | HUF18M3D11003 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 22 | HUF18M3D21006 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 23 | HUF18M3D21008 | Nevşehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 24 | HUF18M3D22011 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 25 | HUF18M3D32013 | Nevşehir Toprak | - | - | + | * | - |
| 26 | HUF18M3E11003 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 27 | HUF18M3E12005 | Aksaray Toprak | - | - | + | * | - |
| 28 | HUF18M3E21007 | Aksaray Üzüm | - | - | + | * | - |
| 29 | HUF18M3F11001 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 30 | HUF18M3F11003 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 31 | HUF18M3F11005 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 32 | HUF18M3F12007 | Ankara Toprak | - | - | + | * | + |
| 33 | HUF18M3F21010 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 34 | HUF18M3F21012 | Ankara Üzüm | - | - | + | * | - |
| 35 | HUF18M3F22018 | Ankara Toprak | - | - | + | * | - |
| 36 | HUF18M3G11001 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 37 | HUF18M3G11004 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 38 | HUF18M3G12006 | Eskişehir Toprak | - | - | + | * | + |
| 39 | HUF18M3G21009 | Eskişehir Üzüm | - | - | + | * | - |
| 40 | HUF18M3H11001 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | + |
| 41 | HUF18M3H11004 | Çankırı Üzüm | - | - | + | * | - |
| 42 | HUF18M3H22007 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | - |
| 43 | HUF18M3H32012 | Çankırı Toprak | - | - | + | * | - |
| 44 | HUF18M3I11002 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | - |
| 45 | HUF18M3I11003 | Karaman Üzüm | - | - | + | * | + |
| 46 | HUF18M3I22005 | Karaman Toprak | - | - | + | * | - |
| 47 | HUF18M3I22006 | Karaman Toprak | - | - | + | * | - |
| 48 | HUF18M3J11001 | Sivas Üzüm | - | - | + | * | + |
| 49 | HUF18M3J11004 | Sivas Toprak | - | - | + | * | - |
| 50 | HUF18M3J21008 | Sivas Üzüm | - | - | + | * | - |
| 51 | HUF18M3J22010 | Sivas Toprak | - | - | + | * | - |
| 52 | HUF18M3K11002 | Konya Üzüm | - | - | + | * | - |
| 53 | HUF18M3K12004 | Konya Toprak | - | - | + | * | - |
| 54 | HUF18M3K21007 | Konya Üzüm | - | - | + | * | - |
| 55 | HUF18M3L11001 | Yozgat Üzüm | - | - | + | * | - |
| 56 | HUF18M3L11003 | Yozgat Üzüm | - | - | + | * | - |
| 57 | HUF18M3L12005 | Yozgat Toprak | - | - | + | * | - |
| 58 | HUF18M3L12007 | Yozgat Toprak | - | - | + | * | - |
| 59 | HUF18M3L21008 | Yozgat Üzüm | - | - | + | * | - |
| 60 | HUF18M3L21010 | Yozgat Üzüm | - | - | + | * | - |
| 61 | HUF18M3L32011 | Yozgat Toprak | - | - | + | * | - |
| 62 | HUF18M3L32014 | Yozgat Toprak | - | - | + | * | - |

* Test ayırım ağacı (Şekil 3.4.) dikkate alınarak uygulanmamıştır.

Grup 4 (2018 yılında İç Anadolu Bölgesi şehirlerindeki üzüm bağları örneklerinden izole edilen maya suşları) izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde 56 adet izolasyonun biyokimyasal test sonuçları açısından *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Mayalar kemoorganotrof canlılardır, bu nedenle enerji kaynağı olarak organik bileşikler kullanırlar ve büyümeleri için güneş ışığı gereksinim duymazlar. *Saccharomyces* cinsinin mayaları karbon ve enerji kaynağı olarak çok çeşitli şekerler kullanabilir. Şeker kullanımları hem genetik yetenek hem de düzenleyici mekanizmalarla yönetilir. Mayalarda tercihen glikoz ve fruktoz gibi heksozlar kullanılır [142]. Glikoz, glikolitik yoldan ve Krebs döngüsünden ATP şeklinde enerjiye dönüştürülen ana karbon ve enerji kaynağıdır [143]. Bir disakkarit olan sükroz ise hücre dışı enzim olan invertaz tarafından glikoza ve fruktoza hidrolizden sonra hücreye alınıp metabolize edilir. Maltoz, maltoz geçirgenliği ile hücreye aktarılır, mannaz enzimi tarafından iki glikoz molekülüne dönüştürülür ve metabolize edilir [143]. İlginç bir şekilde, sukroz, maltoz veya galaktoz gibi şekerler glikoz varlığında metabolize edilmez [142]. Bazı mayalar, özellikle gıda ve çevresel biyoteknoloji uzmanları için ilgi çekici olan, biyopolimerler, pentozlar, alkoller, polioller, hidrokarbonlar, yağ asitleri ve organik asitler gibi birtakım geleneksel olmayan karbon kaynaklarını da kullanabilirler [143]. *S. cerevisiae* fakültatif bir anaerobdur, yani oksijenle veya oksijen olmadan büyüebilir. Oksijen varlığında, glukoz CO₂, H₂O ve enerjiye dönüştürüldüğü mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyona uğrar. Anaerobik koşullarda, alkolik fermantasyonda olduğu gibi, mayalar verimli bir şekilde büyüemezler, çünkü enerjileri sadece glikolizden türetilir ve şekerler bunun yerine etanol, gliserol ve CO₂ gibi ara yan ürünlere dönüştürülür [140,143]. Daha sonra, etanol Krebs ve glikooksilat döngüleri ve ayrıca mitokondriyal elektron taşıma zinciri kullanılarak tüketilir.

Solunum ve fermantasyon süreçleri, başta glikoz ve oksijen konsantrasyonları olmak üzere çevresel faktörlerce düzenlenir. Solunumda piruvat, mitokondride asetil-CoA'ya dekarboksilize edilir. Son aşamada Krebs döngüsünde tamamen maya büyümesini teşvik etmek için CO₂, enerji ve ara maddelere oksitlenir [143]. Glikoz konsantrasyonları yeterince yüksek olduğunda, solunumda kullanılan enzimler bastırılır ve fermentasyon solunumun yerini alır [143]. Etanol bir kez oluştuğunda, büyüme ortamına ayrıca gliserol, asetik asit, H₂S ve esterler gibi diğer fermantasyon yan ürünleri de salgılanır. Son olarak, N, P, S, Fe, Cu, Zn ve Mn gibi elementler tüm mayalar için zorunludur ve genellikle

büyüme ortamına eklenmeleri gerekmektedir[144]. Mayaların çoğu doğrudan amonyum iyonlarını ve üreyi özümseyebilirken, çok az sayıda tür nitratları azot kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Fosfor ve kükürt genellikle sırasıyla inorganik fosfatlar ve sülfatlar şeklinde emilirler [143].

İzolasyonlara uygulanan biyokimyasal testler değerlendirmesi tek başına dikkate alındığında Grup 1 için 19 adet suş, Grup 2 için 3 adet suş, Grup 3 için 48 adet suş ve Grup 4 için ise birinci aşama (2016 yılı) izolasyonları için 35 adet suş, ikinci aşama izolasyonları (2017 yılı) izolasyonları için 73 adet suş, üçüncü aşama (2018 yılı) izolasyonları için 56 adet suş olmak üzere toplam 234 adet suşun *S. cerevisiae* türü karakteristik biyokimyasal test karakteristiklerine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Bütün izolasyonların makroskobik, mikroskobik koloni morfolojileri ve biyokimyasal test sonuçları *S. cerevisiae* uygunluğu yönünden değerlendirmeye alındığında ise Grup 1 için 19 adet suş, Grup 2 için 3 adet suş, Grup 3 için 41 adet suş ve Grup 4 için ise birinci aşama (2016 yılı) izolasyonlarından 28 adet suş, ikinci aşama izolasyonları (2017 yılı) izolasyonları için 60 adet suş, üçüncü aşama (2018 yılı) izolasyonları için 56 adet suş olmak üzere toplam 207 adet suşun *S. cerevisiae* türü makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal test sonuçları karakteristiklerine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan 287 adet izolasyondan altı tanesi (HUF16MM0T10015, HUF16M2K10014, HUF16M3A1001, HUF16M3A1001, HUF18M2Z10017, HUF18M2Z10019) gelişim sorunu göstererek gelişimlerini kaybetmişlerdir.

Bütün izolasyonlar için makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal testler tamamlanmıştır. Bütün bu klasik tanımlama testlerinin, izolasyonu gerçekleştirilen 287 adet suş üzerinde uygulanması sonucunda üç testtede (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) *S. cerevisiae* türüne uygun sonuç veren izolasyon sayısı 207 olarak tespit edilmiştir ve bu izolatlar aşağıda (Çizelge 4.15.) verilmiştir.

Klasik ön değerlendirme testleri (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) *S. cerevisiae* türüne ait özellik gösterdiği tespit edilmiş olan bu 207 suştan 19 adedi ticari kaynaklardan, 3 adedi farklı kültür koleksiyonlarından, 41 adedi ulusal üniversitelerin araştırmacılarından sağlanan izolasyonlarından, 28 adedi 2016 yılında İç Anadolu Bölgesi'nin farklı şehirlerinden toplanan üzüm bağı izolasyon örneklerinden, 60 adedi ise 2017 yılında İç Anadolu Bölgesi'nin farklı şehirlerinden toplanan üzüm bağı izolasyon örneklerinden, geriye kalan 56 adedi ise 2018 yılında İç Anadolu Bölgesi'nin farklı şehirlerinden toplanan üzüm bağı izolasyon örneklerinden elde edilmiştir. Klasik

tanımlama yöntemleri tek başına elde edilen izolasyonların tür düzeyinde doğru tespit edilmelerinde yeterli bir tanımlama olmadığından izolasyonlar üzerinde MALDI-TOF MS ile tanımlama yöntemi uygulanmıştır.

Çizelge 4.15. Klasik tanımlama yöntemlerine bağlı olarak *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların kodları, kaynakları ve gruplara dağılımları

| İzolasyonların Gruplara Dağılımı | | | | | |
|----------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|---------------|----------------------------------|
| Grup 1 | | | Grup 2 | | |
| No | Kod Numarası | Kaynak | No | Kod Numarası | Kaynak |
| 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | 20 | HUF16M1C0001 | RSK/Instant kuru maya (08022) |
| 2 | HUF16M0T10002 | Dorbi yaş maya | 21 | HUF16M1C0002 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763 |
| 3 | HUF16M0T10003 | Pak yaş maya | 22 | HUF16M1C0003 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 6328™ |
| 4 | HUF16M0T10004 | Germ Mautner markhof yaş maya | | | |
| 5 | HUF16M0T10005 | Pak instant maya 125g | | | |
| 6 | HUF16M0T10006 | Dr.Oetker Instant kuru maya 10g | | | |
| 7 | HUF16M0T10007 | Pak Instant kuru hamur maya 10g | | | |
| 8 | HUF16M0T10008 | Yuva Instant kuru hamur maya 10g | | | |
| 9 | HUF16M0T10009 | Pak kuru hamur mayası 100g | | | |
| 10 | HUF16M0T10010 | Yuva aktif kuru hamur mayası 100g | | | |
| 11 | HUF16M0T10011 | Dr.Oetker ekşi kuru hamur mayası 35g | | | |
| 12 | HUF16M0T10012 | Piyale Instant kuru hamur mayası | | | |
| 13 | HUF16M0T10013 | TIB/Dıbosh winw 10g | | | |
| 14 | HUF16M0T10014 | Angel Instant kuru hamur mayası 100g | | | |
| 15 | HUF16M0T10016 | Dıbosh aktif kuru şarap mayası 12g | | | |
| 16 | HUF16M0T10017 | Danboili/Lesaffre yeeast 13g | | | |
| 17 | HUF16M0T10018 | Dr oetker germ kein dampel netwending | | | |
| 18 | HUF16M0T10019 | Buggeman Instan 500g | | | |
| 19 | HUF16M1C0004 | Şarapçılık (Chr. Hansen) | | | |
| Grup 3 | | | Grup 3-Devamı | | |
| No | Kod Numarası | Kaynak | No | Kod Numarası | Kaynak |
| 23 | HUF16M2K10001 | HÜBB | 44 | HUF18M2Y10012 | AÜGMB |
| 24 | HUF16M2K10002 | HÜBB | 45 | HUF18M2Y10013 | AÜGMB |
| 25 | HUF16M2K10003 | HÜBB | 46 | HUF18M2Y10014 | AÜGMB |
| 26 | HUF16M2K10004 | HÜBB | 47 | HUF18M2Y10015 | AÜGMB |
| 27 | HUF16M2K10005 | HÜBB | 48 | HUF18M2Z10001 | ÇÜGMB |
| 28 | HUF16M2K10006 | HÜBB | 49 | HUF18M2Z10002 | ÇÜGMB |
| 29 | HUF16M2K10007 | HÜBB | 50 | HUF18M2Z10003 | ÇÜGMB |
| 30 | HUF16M2K10008 | HÜBB | 51 | HUF18M2Z10004 | ÇÜGMB |
| 31 | HUF16M2K10009 | HÜBB | 52 | HUF18M2Z10005 | ÇÜGMB |
| 32 | HUF16M2K10010 | HÜBB | 53 | HUF18M2Z10006 | ÇÜGMB |
| 33 | HUF18M2Y10001 | AÜGMB | 54 | HUF18M2Z10007 | ÇÜGMB |

| | | | | | |
|---------------|---------------|--------------------|----------------------|---------------|-------------------|
| 34 | HUF18M2Y10002 | AÜGMB | 55 | HUF18M2Z10008 | ÇÜGMB |
| 35 | HUF18M2Y10003 | AÜGMB | 56 | HUF18M2Z10009 | ÇÜGMB |
| 36 | HUF18M2Y10004 | AÜGMB | 57 | HUF18M2Z10010 | ÇÜGMB |
| 37 | HUF18M2Y10005 | AÜGMB | 58 | HUF18M2Z10012 | ÇÜGMB |
| 38 | HUF18M2Y10006 | AÜGMB | 59 | HUF18M2Z10013 | ÇÜGMB |
| 39 | HUF18M2X10007 | AÜGMB | 60 | HUF18M2Z10014 | ÇÜGMB |
| 40 | HUF18M2X10008 | AÜGMB | 61 | HUF18M2Z10022 | ÇÜGMB |
| 41 | HUF18M2X10009 | AÜGMB | 62 | HUF18M2Z10026 | ÇÜGMB |
| 42 | HUF18M2X10010 | AÜGMB | 63 | HUF18M2Z10029 | ÇÜGMB |
| 43 | HUF18M2X10011 | AÜGMB | | | |
| Grup 4 | | | Grup 4-Devamı | | |
| 64 | HUF16M3A11002 | Kayseri Üzüm | 110 | HUF17M3F21134 | Ankara1 Toprak |
| 65 | HUF16M3A11003 | Kayseri Üzüm | 111 | HUF17M3F31135 | Ankara2 Üzüm |
| 66 | HUF16M3A12012 | Kayseri Toprak | 112 | HUF17M3F31136 | Ankara2 Üzüm |
| 67 | HUF16M3A12013 | Kayseri Toprak | 113 | HUF17M3F31139 | Ankara2 Üzüm |
| 68 | HUF16M3A12014 | Kayseri Toprak | 114 | HUF17M3F32141 | Ankara2 Toparak |
| 69 | HUF16M3B11016 | Kırıkkale Üzüm | 115 | HUF17M3F32146 | Ankara2 Toparak |
| 70 | HUF16M3B11017 | Kırıkkale Üzüm | 116 | HUF17M3G31147 | Eskişehir1 Üzüm |
| 71 | HUF16M3B11020 | Kırıkkale Üzüm | 117 | HUF17M3G31150 | Eskişehir1 Üzüm |
| 72 | HUF16M3B11021 | Kırıkkale Üzüm | 118 | HUF17M3G31151 | Eskişehir1 Üzüm |
| 73 | HUF16M3B11023 | Kırıkkale Üzüm | 119 | HUF17M3G31152 | Eskişehir1 Üzüm |
| 74 | HUF16M3C11031 | Kırşehir Üzüm | 120 | HUF17M3G32153 | Eskişehir1 Toprak |
| 75 | HUF16M3C11032 | Kırşehir Üzüm | 121 | HUF17M3G32157 | Eskişehir1 Toprak |
| 76 | HUF16M3C11033 | Kırşehir Üzüm | 122 | HUF17M3H21173 | Çankırı1 Üzüm |
| 77 | HUF16M3C11034 | Kırşehir Üzüm | 123 | HUF17M3H21174 | Çankırı1 Üzüm |
| 78 | HUF16M3C12041 | Kırşehir Toprak | 124 | HUF17M3H21175 | Çankırı1 Üzüm |
| 79 | HUF16M3D11047 | Nevşehir Üzüm | 125 | HUF17M3H22179 | Çankırı1 Toprak |
| 80 | HUF16M3D11048 | Nevşehir Üzüm | 126 | HUF17M3H22180 | Çankırı1 Toprak |
| 81 | HUF16M3D11049 | Nevşehir Üzüm | 127 | HUF17M3H22182 | Çankırı1 Toprak |
| 82 | HUF16M3D11052 | Nevşehir Üzüm | 128 | HUF17M3H31185 | Çankırı2 Üzüm |
| 83 | HUF16M3E11059 | Aksaray Üzüm | 129 | HUF17M3H32189 | Çankırı2 Toparak |
| 84 | HUF16M3F11076 | Ankara Üzüm | 130 | HUF17M3H21196 | Karaman1 Üzüm |
| 85 | HUF16M3F11078 | Ankara Üzüm | 131 | HUF17M3H21197 | Karaman1 Üzüm |
| 86 | HUF16M3G11085 | Eskişehir Üzüm | 132 | HUF17M3H21199 | Karaman1 Üzüm |
| 87 | HUF16M3G11086 | Eskişehir Üzüm | 133 | HUF17M3H21200 | Karaman1 Üzüm |
| 88 | HUF16M3G11088 | Eskişehir Üzüm | 134 | HUF17M3H21208 | Karaman2 Üzüm |
| 89 | HUF16M3G11089 | Eskişehir Üzüm | 135 | HUF17M3H21209 | Karaman2 Üzüm |
| 90 | HUF16M3H11101 | Çankırı Üzüm | 136 | HUF17M3H21210 | Karaman2 Üzüm |
| 91 | HUF16M3H11104 | Çankırı Üzüm | 137 | HUF17M3H21212 | Karaman2 Üzüm |
| 92 | HUF17M3A21001 | Kayseri1 Üzüm | 138 | HUF17M3H22218 | Karaman2 Toprak |
| 93 | HUF17M3A31013 | Kayseri2 Üzüm | 139 | HUF17M3E21110 | Aksaray2 Üzüm |
| 94 | HUF17M3A32019 | Kayseri2 Toprak | 140 | HUF17M3E21112 | Aksaray2 Üzüm |
| 95 | HUF17M3B32047 | Kırıkkale2 Toparak | 141 | HUF17M3E21113 | Aksaray2 Üzüm |
| 96 | HUF17M3C21050 | Kırşehir1 Üzüm | 142 | HUF17M3E21114 | Aksaray2 Üzüm |
| 97 | HUF17M3C31063 | Kırşehir2 Üzüm | 143 | HUF17M3E21115 | Aksaray2 Üzüm |
| 98 | HUF17M3C31064 | Kırşehir2 Üzüm | 144 | HUF17M3E22117 | Aksaray2 Toprak |
| 99 | HUF17M3C31065 | Kırşehir2 Üzüm | 145 | HUF17M3F21122 | Ankara1 Üzüm |
| 100 | HUF17M3C31066 | Kırşehir2 Üzüm | 146 | HUF17M3F21123 | Ankara1 Üzüm |

| | | | | | |
|-----|---------------|------------------|-----|---------------|----------------|
| 101 | HUF17M3D31086 | Nevşehir2 Üzüm | 147 | HUF17M3F21124 | Ankara1 Üzüm |
| 102 | HUF17M3D31087 | Nevşehir2 Üzüm | 148 | HUF17M3F21125 | Ankara1 Üzüm |
| 103 | HUF17M3D31088 | Nevşehir2 Üzüm | 149 | HUF17M3F21126 | Ankara1 Üzüm |
| 104 | HUF17M3D31089 | Nevşehir2 Üzüm | 150 | HUF17M3F21127 | Ankara1 Üzüm |
| 105 | HUF17M3D31090 | Nevşehir2 Üzüm | 151 | HUF17M3F21128 | Ankara1 Toprak |
| 106 | HUF17M3D32092 | Nevşehir2 Toprak | 152 | HUF18M3A11001 | Kayseri Üzüm |
| 107 | HUF17M3D32093 | Nevşehir2 Toprak | 153 | HUF18M3A11003 | Kayseri Üzüm |
| 108 | HUF17M3D32096 | Nevşehir2 Toprak | 154 | HUF18M3A11005 | Kayseri Toprak |
| 109 | HUF17M3E21109 | Aksaray2 Üzüm | 155 | HUF18M3A21007 | Kayseri Üzüm |
| 156 | HUF18M3A22009 | Kayseri Toprak | 182 | HUF18M3F21010 | Ankara Üzüm |
| 157 | HUF18M3B11002 | Kırıkkale Üzüm | 183 | HUF18M3F21012 | Ankara Üzüm |
| 158 | HUF18M3B12004 | Kırıkkale Toprak | 184 | HUF18M3F22018 | Ankara Toprak |
| 159 | HUF18M3B12005 | Kırıkkale Toprak | 185 | HUF18M3G11001 | Eskişehir Üzüm |
| 160 | HUF18M3B31006 | Kırıkkale Toprak | 186 | HUF18M3G11004 | Eskişehir Üzüm |
| 161 | HUF18M3B21008 | Kırıkkale Üzüm | 187 | HUF18M3G21009 | Eskişehir Üzüm |
| 162 | HUF18M3B22010 | Kırıkkale Toprak | 188 | HUF18M3H11004 | Çankırı Üzüm |
| 163 | HUF18M3B22011 | Kırıkkale Toprak | 189 | HUF18M3H22007 | Çankırı Toprak |
| 164 | HUF18M3C11001 | Kırşehir Üzüm | 190 | HUF18M3H32012 | Çankırı Toprak |
| 165 | HUF18M3C11002 | Kırşehir Üzüm | 191 | HUF18M3I11002 | Karaman Üzüm |
| 166 | HUF18M3C12005 | Kırşehir Toprak | 192 | HUF18M3I22005 | Karaman Toprak |
| 167 | HUF18M3C12006 | Kırşehir Toprak | 193 | HUF18M3I22006 | Karaman Toprak |
| 168 | HUF18M3C21008 | Kırşehir Üzüm | 194 | HUF18M3J11004 | Sivas Toprak |
| 169 | HUF18M3C22010 | Kırşehir Toprak | 195 | HUF18M3J21008 | Sivas Üzüm |
| 170 | HUF18M3D11001 | Nevşehir Üzüm | 196 | HUF18M3J22010 | Sivas Toprak |
| 171 | HUF18M3D11003 | Nevşehir Üzüm | 197 | HUF18M3K11002 | Konya Üzüm |
| 172 | HUF18M3D21006 | Nevşehir Üzüm | 198 | HUF18M3K12004 | Konya Toprak |
| 173 | HUF18M3D21008 | Nevşehir Üzüm | 199 | HUF18M3K21007 | Konya Üzüm |
| 174 | HUF18M3D22011 | Nevşehir Toprak | 200 | HUF18M3L11001 | Yozgat Üzüm |
| 175 | HUF18M3D32013 | Nevşehir Toprak | 201 | HUF18M3L11003 | Yozgat Üzüm |
| 176 | HUF18M3E11003 | Aksaray Üzüm | 202 | HUF18M3L12005 | Yozgat Toprak |
| 177 | HUF18M3E12005 | Aksaray Toprak | 203 | HUF18M3L12007 | Yozgat Toprak |
| 178 | HUF18M3E21007 | Aksaray Üzüm | 204 | HUF18M3L21008 | Yozgat Üzüm |
| 179 | HUF18M3F11001 | Ankara Üzüm | 205 | HUF18M3L21010 | Yozgat Üzüm |
| 180 | HUF18M3F11003 | Ankara Üzüm | 206 | HUF18M3L32011 | Yozgat Toprak |
| 181 | HUF18M3F11005 | Ankara Üzüm | 207 | HUF18M3L32014 | Yozgat Toprak |

4.4. Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu / İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Analiz Sonuçları

Klasik yöntemler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve *S. cerevisiae* türüne ait klasik tanımlama özellikleri gösterdiği tespit edilen izolatların ve farklı türlere ait olduğu düşünülen izolatların tanımlamasında MALDI-TOF MS tanımlama yöntemi kullanılarak ileri tanımlama analizleri yapılmıştır. MALDI-TOF MS tanımlamaları yapılan bu sonuçlar moleküler tanımlama sonuçları ile de karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS

analiz sonuçlarına baktığımızda klasik yöntemle tanımlamaları yapılarak *S. cerevisiae* türüne ait olduğu düşünülen 207 adet izolasyondan 152 tanesi *S. cerevisiae* olarak tespit edilmiştir. Tez çalışmasında hedeflenen *S.cerevisiae* DNA barkodlarının ortaya konulması amacıyla 2016-2017 yıllarında elde edilen ve klasik (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) ön tanımlama ile *S.cerevisiae* olduğu belirlenen 120 izolat üzerinden devam edilmiştir. Klasik tanımlama yöntemleri ile *S. cerevisiae* türüne ait özellikler sergilemiş olan bu 120 izolatın MALDI-TOF MS ile yapılan analizlerinden elde edilen karşılaştırmalı kromatogramlar değerlendirildiğinde ise bunlardan 64 adedinin *S. cerevisiae* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Farklı cinslere ait MALDI-TOF MS kromotogram görselleri Ek A1’de verilmiştir. MALDI-TOF MS tanımlama yöntemi sonucunda elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.19., Çizelge 4.20., Çizelge 4.21., ve Çizelge 4.22.)’de moleküler tanımlama sonuçları ile birlikte verilmiştir. Ayrıca MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama yöntemleri kullanılarak tanımlanan izolatların hangi mikroorganizma grubundan ve hangi kaynaktan kaç adet bulunduğunu veren özet çizelgeler aşağıda (Çizelge 4.23 - 4.26) gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları ile moleküler yöntem sorgulamalarını karşılaştırdığımızda ise moleküler tanımlama ile *Metschnikowia sp.* olarak tanımlanan izolatlardan farklı olarak yalnızca üçünün (HUF17M3F31135, HUF17M3F21123, HUF17M3F21125) MALDI-TOF MS analizi ile *S. cerevisiae* olarak tanımlandığı tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında sonuçların *S. cerevisiae* tespitinde %98.87 benzerlik gösterdiği görülmektedir. Moleküler tanımlama ile *S. cerevisiae* türünden farklı cins ve türde olduğu tespit edilen izolatların MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında ise (Çizelge 4.20. ve Çizelge 4.22.) MALDI-TOF MS tanımlama ile moleküler tanımlama sonuçlarının birbirinden önemli farklılıklar gösterdiği veya moleküler yöntemle yapılan bazı tanımlamaların MALDI-TOF yöntemiyle tanımlanamadığı görülmektedir. Bu noktada MALDI-TOF MS yönteminin diğer tür sınıflamalarına ait türleri tespit etmede yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum temelde örnek hazırlama prosedürleri ve veri kütüphaneleri yeterliliği ile açıklanmaktadır [205]. Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması, ya bilinmeyen organizmanın peptid kütle parmak izinin (PMF), veritabanında bulunan peptid kütle parmak izleri ile karşılaştırılmasıyla ya da bilinmeyen organizmanın biyobelirteçlerinin kütlelerinin proteome veritabanı ile eşleştirilmesiyle gerçekleştirilir. TOF ölçüm

bilgilerine dayanarak ve bir karakteristik spektrumdan yararlanarak PMF'leri üzerinden numune belirlemesini gerçekleştirmektedir [205].

4.5. PCR Temelli DNA Barkodlama Analiz Sonuçları

DNA barkodlama çalışmasında moleküler düzeyde tanımlamaların yapılması ve buradan hareketle incelenecek barkod bölgelerinin ön seçimi ve başarılarının belirlenmesi amacıyla izolatlardan elde edilen DNA izolasyonları üzerinde altı farklı gen bölgesi ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş, başarılı PCR amplifikasyonlar veren gen bölgeleri sekans analizlemeye alınmış ve elde edilen sekans verileri değerlendirmeye alınmıştır.

4.5.1. DNA Barkod Gen Bölgelerinin Seçimi İçin Ön Deneme

Literatür taramaları doğrultusunda birçok farklı gen bölgesinin funguslar üzerinde DNA barkodu olarak kullanılıp kullanılamayacağı ve bu gen bölgelerinin başarı durumları incelenmiştir. Funguslarda DNA barkodlama amacıyla kullanılan gen bölgelerinin yaygın olarak birincil barkod bölgeleri ve ikincil barkod bölgeleri olarak gruplandırıldığı belirtilmektedir [14][15][16][17][18][19][20]. Özellikle ITS gen bölgesinin funguslar üzerinde barkodlama amacıyla çok kullanıldığı, daha geniş bir barkod açıklığı bölgesine hitap ettiği belirtilmektedir. LSU gen bölgesi ve ITS gen bölgesinin birbirlerine yakın başarı sağladıkları vurgulanmaktadır. Hayvanlar için yaygın olarak sitokrom oksidaz ve mitokondriyal gen bölgelerinin daha etkili olduğu vurgulanırken, bitkiler aleminde ise daha çok kloroplast genleri kullanıldığı vurgulanmaktadır. Protein kodlayan gen bölgeleri her ne kadar ayırmda daha başarılı olsa da düşük amplifikasyon başarısı ve düşük sekanslama başarısı verdikleri belirtilmektedir[29][30].

DNA barkotlama tez çalışması kapsamında, *S. cerevisiae* türünde çalışılabilecek gen bölgelerinin tespitinin yapılabilmesi amacıyla literatür taramaları doğrultusunda başlangıçta altı farklı gen bölgesi için spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu altı farklı primer gen bölgesi literatür taramaları da göz önünde bulundurularak *ITS*, *LSU*, *SSU*, *RPB1*, *RPB2* ve *TOP1* gen bölgeleri olarak seçilmiştir. Funguslar ve birçok mikroorganizma grubu üzerinde yapılan çalışmalarda ise barkodlama çalışmalarının çekirdek ribosomal genleri, 16s rRNA, *cpn60*, *rpoB*, *COI*, *rbcL*, *tutA*, *RPB1*, *RPB2*, 5.8s, 18s RNA *SSU*, 28s RNA *LSU*, *ITS*'ler *LSU*, *TOP1*, D1/D2 ve çoklu bölge sekans analizleri kullanılarak yapıldığı belirtilmektedir [14][29][30][31][32].

Barkodlama perfomansının en iyi olduğu DNA bölgelerini belirlemek amacıyla

gerçekleştirilen PCR ön denemeleri, ön tanımlamaları yapılmış olan 4 farklı izolat (HUF16M0T10001, HUF16M1C0001, HUF16M2K10004, HUF16M3A11003) üzerinden gerçekleştirilmiştir. Seçilen bu dört farklı izolatin bütün örnekleri temsil edebilmesi için farklı gruplardan (Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4) seçilmesine özen gösterilmiştir. Seçilen izolatların kodları, kaynakları, DNA miktar ve kalite değerleri aşağıda (Çizelge 4.16) verilmiştir.

4.5.2. Ön Denemeler İçin DNA Ekstraksiyonu ve PCR

Ön denemeler amacıyla kullanılan ve aşağıda (Çizelge 4.16) verilen dört farklı gruptan seçilmiş olan dört farklı izolattan DNA ekstraksiyonları ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu dört farklı izolat üzerinde *ITS*, *LSU*, *SSU*, *TOP1*, *RPB1* ve *RPB2* gen bölgeleri için PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Uygun gen bölgelerinin belirlenmesi için dört farklı suş üzerine gerçekleştirilen bu ön denemeden DNA ekstraksiyonu ve PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen DNA miktar ve kalite değerleri sonuçları aşağıda (Çizelge 4.16) verilmiştir. Kullanılan her bir gen bölgesi PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen PCR ürününün jel elektroforez görüntüleme sistemi yardımıyla gerçekleşen amplifikasyon bant ayrımları görüntülenmiştir. Bantların dağılımları aşağıda (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4)'de şematik olarak verilmiştir.

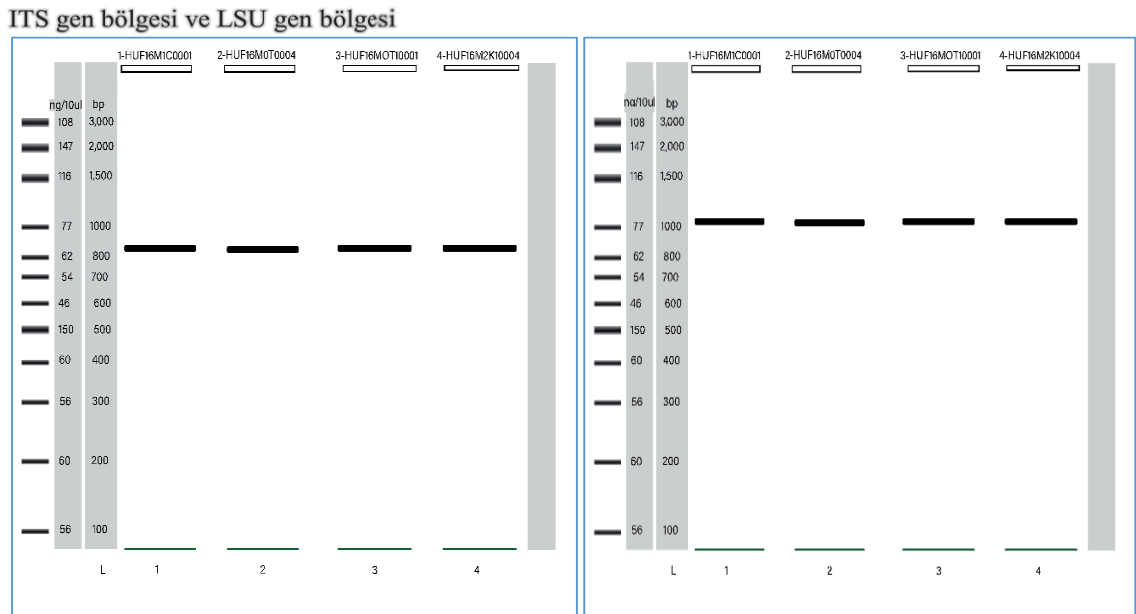
Çizelge 4.16. Farklı gen bölgeleri için PCR ön denemelerin gerçekleştirildiği suşların sonuç değerleri

| Grup No | İzolasyon Kodu | İzolasyon Kaynağı | DNA Konsantrasyonu (ng/µl) | Absorb. A260 | Absorb. A280 | Absorb. A260/280 |
|---------|----------------|-------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|------------------|
| Grup 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | 64,6 | 1,292 | 0,581 | 2,02 |
| Grup 2 | HUF16M1C0001 | RSK/Instant kuru maya (08022) | 80,2 | 1,604 | 0,816 | 1,96 |
| Grup 3 | HUF16M2K10004 | HÜBB | 47,7 | 0,954 | 0,463 | 2,06 |
| Grup 4 | HUF16M3A11003 | Kayseri Üzüm | 48,5 | 0,57 | 0,283 | 2,02 |

4.5.3. Ön Denemeler İçin PCR Reaksiyonlarının Uygulanması ve Jel Elektroforez Sonuçları

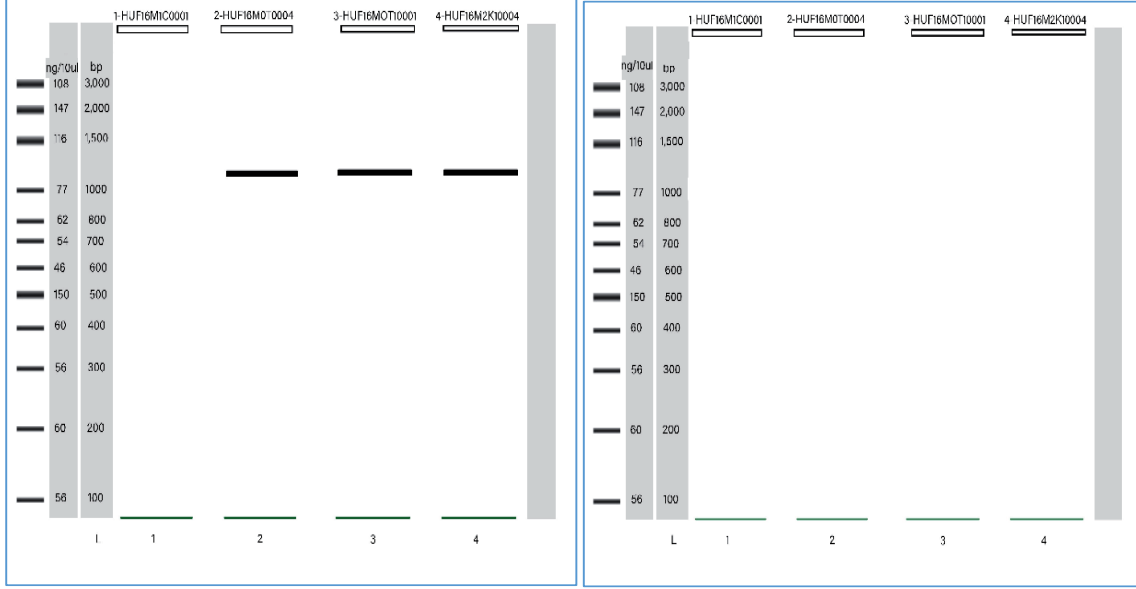
Kullanılacak olan gen bölgelerinin belirlenmesinde, seçilmiş olan dört farklı suş üzerinde

gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda, elde edilen PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleme sistemi yardımıyla gerçekleşen amplifikasyon bant ayrımları görüntülenmiştir. Kullanılmış olan altı farklı gen bölgesi ve dört farklı suştan elde edilen jel görüntüleme sonuçları aşağıda (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4)'de şematik olarak verilmiştir. Gerçekleştirilen ön deneme sonucunda ITS ve LSU gen bölgesi için dört farklı suşun tamamının (HUF16M0T10001, HUF16M1C0001, HUF16M2K10004, HUF16M3A11003), RPB2 gen bölgesi için üç farklı suşun (HUF16M2K10004, HUF16M1C0001, HUF16M3A11003), SSU ve RPB1 gen bölgesi için bir suşun (HUF16M2K10004) başarılı amplifikasyon verdiği gözlemlenmiş, TOP1 gen bölgesi için ise çalışılan farklı koşullarda PCR amplifikasyonlarının başarılı sonuç vermediği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlara göre, ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerinin başarılı bir şekilde amplifikasyon gösterdikleri gözlemlenmiş ve çalışmada ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerinin DNA barkodlama amacıyla kullanılmasına karar verilmiştir. Seçilen dört farklı suşun *S. cerevisiae* türüne ait olduğu moleküler tanımlama yöntemleri ile de tespit edilmiş ve ITS gen bölgesi için yaklaşık 820 bp değerinde, LSU gen bölgesi için yaklaşık 1100 bp değerinde, RPB2 gen bölgesi için ise yaklaşık 1200 bp büyüklüğünde amplifikasyonların gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



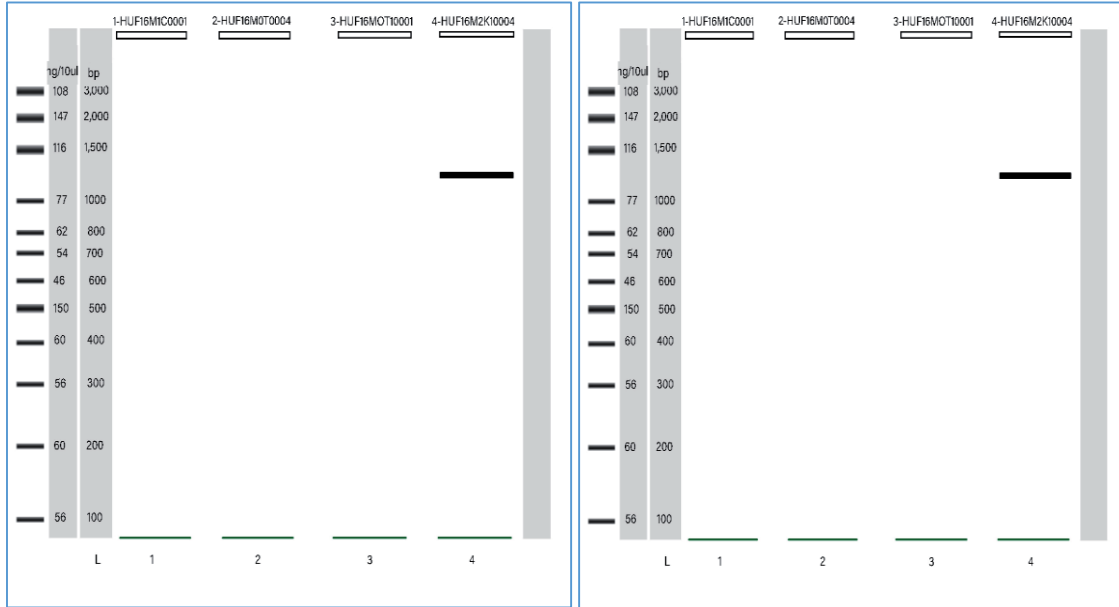
Şekil 4.2. Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004), üzerinde denenen gen bölgelerinin (ITS, LSU,) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi

RPB2 gen bölgesi ve TOP1 gen bölgesi



Şekil 4.3. Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004) üzerinde denenen gen bölgelerinin (RPB2, TOP1,) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi

SSU ve RPB1 gen bölgeleri



Şekil 4.4. Dört farklı suş (1-HUF16M1C0001, 2- HUF16M3A11003, 3- HUF16M0T10001, 4- HUF16M2K10004) üzerinde denenen gen bölgelerinin (SSU, RPB1) spesifik primer dizileri kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüleme sonuçlarının şematik gösterimi

4.5.4. Klasik Yöntemlerle Ön Tanımlamaları Yapılan İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Klasik yöntemler ile *S. cerevisia* olduğu ön tanımlamaları gerçekleştirilen 120 adet suş üzerinden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ön tanımlamaları yapılan 120 adet suşun DNA izolasyonları sonucunda elde edilen değerleri spektrofotometrede (Nonodrop 2000c, Thermoscientific, Almanya) ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda tüm izolatlara ait elde edilen ölçüm değerleri EKA-3.1’de verilmiştir, gruplara göre ortalama ölçüm değerleri ise aşağıda (Çizelge 4.17)’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. 120 izolat üzerinde gerçekleştirilen DNA izolasyon değerlerinin gruplara göre ortalamaları

| İzolasyonun Grubu | DNA Konsantrasyonu (ng/μl) | Absorb. A260/280 |
|-------------------|----------------------------|------------------|
| Grup 1 İzolatlar | 63.73±18.19 | 2.12±0.07 |
| Grup 2 İzolatlar | 47.68±9.65 | 2.13±0.10 |
| Grup 3 İzolatlar | 30.03±12.69 | 2.14±0.31 |
| Grup 4 İzolatlar | 45.41±18.51 | 1.76±3.00 |

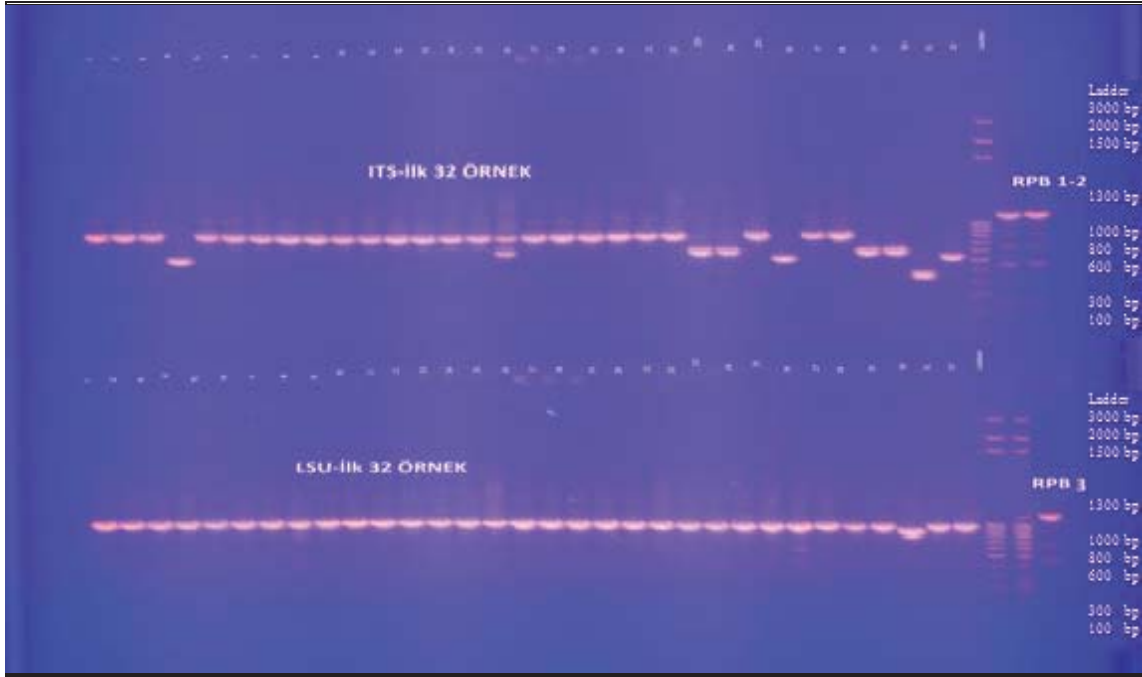
4.5.5. Klasik Ön Tanımlamalar ile *S. cerevisiae* Olarak Tanımlanan 120 İzolata ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerine spesifik primerler ile PCR Reaksiyonlarının Uygulanması

Gerçekleştirilmiş olan ön deneme değerlendirme sonuçları dikkate alınarak klasik tanımlamalarla *S. cerevisiae* olarak tanımlanan 2016-2017 izolatlarından (120 adet) ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerinin çoğaltılması amacıyla Çizelge 3.5’de verilen gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir ve elde edilen PCR ürünleri elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir.

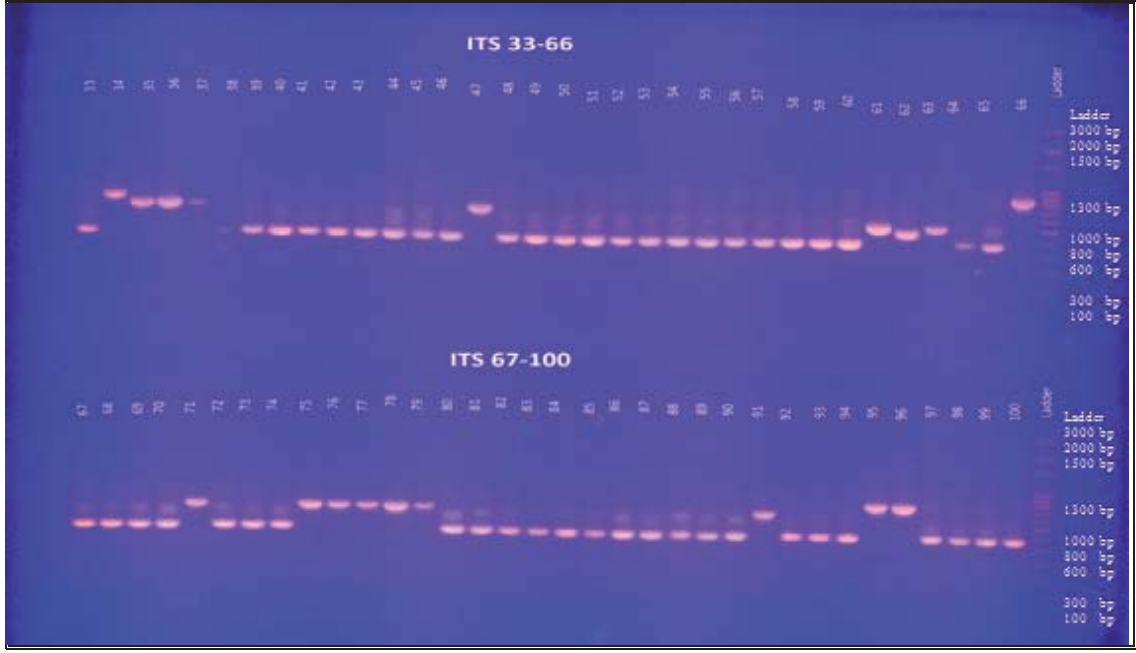
Görüntüleme sonucunda ITS ve LSU gen bölgeleri PCR reaksiyonlarında tekli bant oluşumları gözlemlenirken, RPB2 gen bölgesinde ise ikili ve çoklu bant oluşumları gözlemlenmiştir. RPB2 gen bölgesinde oluşan çoklu bant sorununa çözüm yolu olarak jel saflaştırma yoluna gidilmiştir.

Üç farklı gen bölgesinde 120 örnek üzerinden gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda

elde edilen PCR ürünlerinin jel elektroforezinde (110 volt 55 dakika) yürütülmesi sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda (Şekil 4.5 – Şekil 4.11)'de verilmiştir.

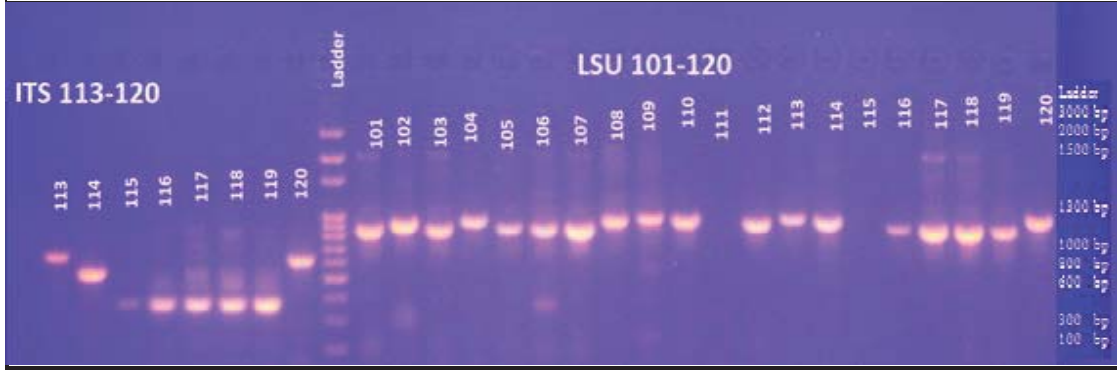


Şekil 4.5. ITS, LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), Hat 1- HUF16M100001, Hat 2- HUF16M100002, Hat 3- HUF16M100003, Hat 4- HUF16M0T10004, Hat 5- HUF16M0T10005, Hat 6- HUF16M0T10006, Hat 7- HUF16M0T10007, Hat 8- HUF16M0T10008, Hat 9- HUF16M0T10009, Hat 10- HUF16M0T10010, Hat 11- HUF16M0T10011, Hat 12- HUF16M0T10012, Hat 13- HUF16M0T10013, Hat 14- HUF16M0T10014, Hat 15- HUF16M0T10016, Hat 16- HUF16M0T10017, Hat 17- HUF16M0T10018, Hat 18- HUF16M0T10019, Hat 19- HUF16M1C0001, Hat 20- HUF16M1C0002, Hat 21- HUF16M1C0003, Hat 22- HUF16M1C0004, Hat 23- HUF16M2K10001, Hat 24- HUF16M2K10003, Hat 25- HUF16M2K10004, Hat 26- HUF16M2K10005, Hat 27- HUF16M2K10006, Hat 28- HUF16M2K10007, Hat 29- HUF16M2K10009, Hat 30- HUF16M2K10010, Hat 31- HUF16M2K10011, Hat 32- HUF16M2K10015



Şekil 4.6. ITS gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), Hat 33-HUF16M3A11002, Hat 34-HUF16M3A11003,Hat 35-HUF16M3A12012,,Hat 36-HUF16M3A12013,Hat 37,HUF16M3A12014,Hat 38-HUF16M3B11016,Hat 39-HUF16M3B11017,Hat 40-HUF16M3B11020,Hat 41-HUF16M3B11021,Hat 42-HUF16M3B11023,Hat 43-HUF16M3C11031,Hat 44-HUF16M3C11032,Hat 45-HUF16M3C11033,Hat 46-HUF16M3C11034,Hat 47-HUF16M3C12041,Hat 48-HUF16M3D11047,Hat 49-HUF16M3D11048,Hat 50-HUF16M3D11049,Hat 51-HUF16M3D11052,Hat 52-HUF16M3E11059,Hat 53-HUF16M3F11076,Hat 54-HUF16M3F11078,Hat 55-HUF16M3G11085,Hat 56-HUF16M3G11086,Hat 57-HUF16M3G11088,Hat 58-HUF16M3G11089,Hat 59-HUF16M3H11101,Hat 60-HUF16M3H11104,Hat 61-HUF17M3A21001,Hat 62-HUF17M3A31013,Hat 63-HUF17M3A32019, Hat 64-HUF17M3B32047,Hat 65-HUF17M3C21050,Hat 66-HUF17M3C31063,Hat 67-HUF17M3C31064,Hat 68-HUF17M3C31065,Hat 69-HUF17M3C31066,Hat 70-HUF17M3D31086, Hat 71-HUF17M3D31087,Hat 72-HUF17M3D31088,Hat 73-HUF17M3D31089,Hat 74-HUF17M3D31090,Hat 75-HUF17M3D32092,Hat 76-HUF17M3D32093,Hat 77-HUF17M3D32096, Hat 78-HUF17M3E21109,Hat 79-HUF17M3E21110,Hat 80-HUF17M3E21112,Hat 81-HUF17M3E21113,Hat 82-HUF17M3E21114,Hat 83-HUF17M3E21115,Hat 84-HUF17M3E22117,Hat 85-HUF17M3F21122,Hat 86-HUF17M3F21123,Hat 87-HUF17M3F21124,Hat 88-HUF17M3F21125,Hat 89-HUF17M3F21126,Hat 90-HUF17M3F21127,Hat 91-HUF17M3F21128,Hat 92-HUF17M3F21134,Hat 93-HUF17M3F31135,Hat 94-HUF17M3F31136,Hat 95-

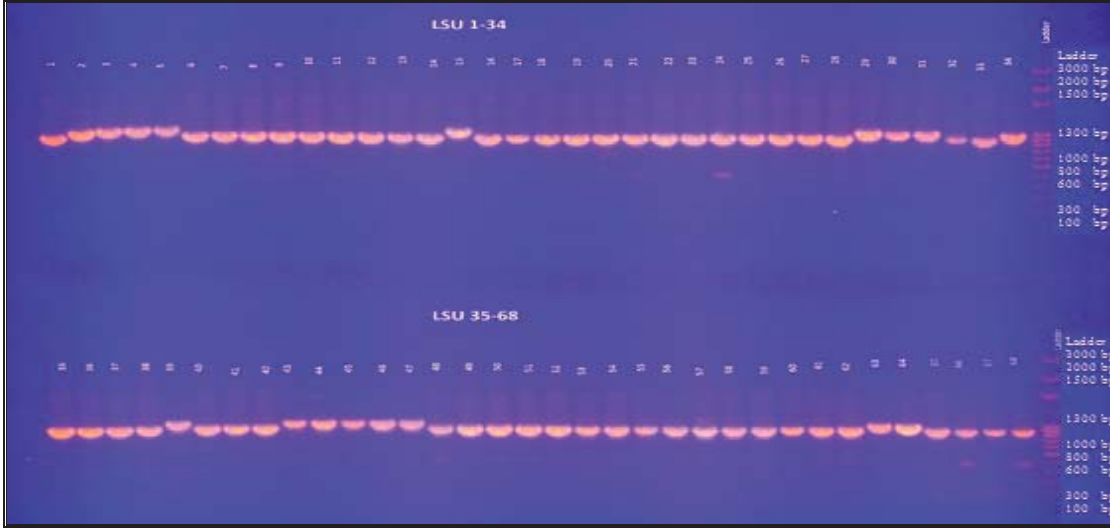
HUF17M3F31139,Hat 96-HUF17M3F32141,Hat 97-HUF17M3F32146,Hat 98
HUF17M3G31147,Hat 99-HUF17M3G31150,Hat 100-HUF17M3G31151



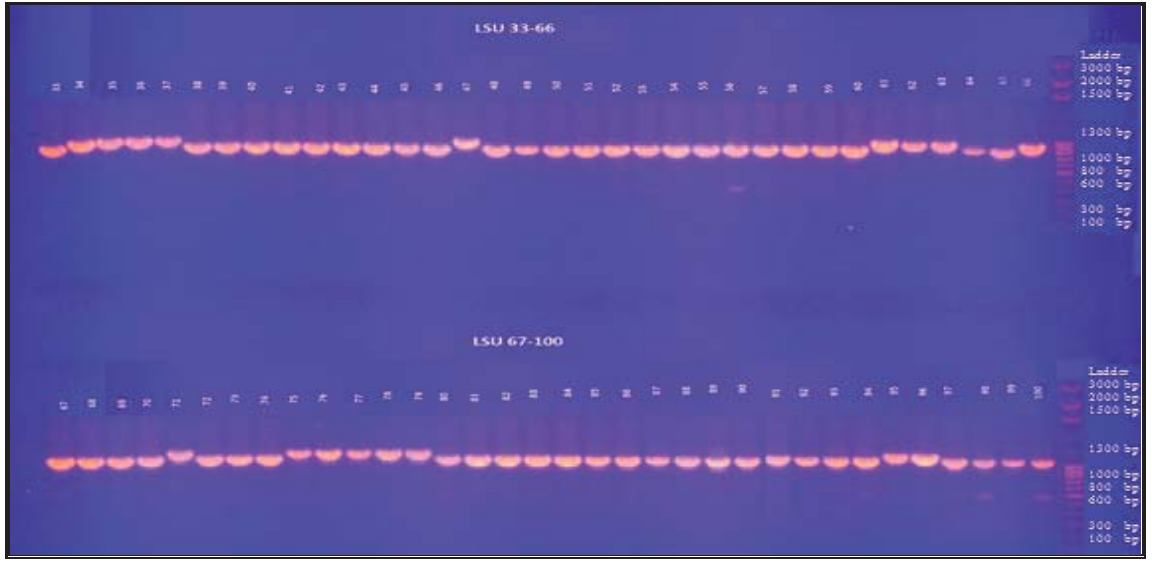
Şekil 4.7. ITS ve LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), Hat 101-HUF17M3G31152,Hat 102-HUF17M3G32153,Hat 103-HUF17M3G32157,Hat 104-HUF17M3H21173,Hat 105-HUF17M3H21174,Hat 106-HUF17M3H21175,Hat 107-HUF17M3H22179,Hat 108-HUF17M3H22180,Hat 109-HUF17M3H22182,Hat 110-HUF17M3H31185,Hat 111-HUF17M3H32189,Hat 112-HUF17M3H21196,Hat 113-HUF17M3H21197,Hat 114-HUF17M3H21199,Hat 115-HUF17M3H21200,Hat 116-HUF17M3H21208,Hat 117-HUF17M3H21209,Hat 118-HUF17M3H21210,Hat 119-HUF17M3H21212,Hat 120-HUF17M3H22218

Ön tanımlama yöntemleri ve MALDI-TOF MS ile tanımlamaları yapılan 120 izolat üzerinde gerçekleştirilen PCR uygulaması sonucunda ITS gen bölgesi için farklı bant aralıklarında jel görüntüleri oluştuğu gözlemlenmiştir. ITS gen bölgesi jel görüntülemeleri dikkatle incelendiğinde bant görüntülerinin farklı baz büyüklüklerine göre gruplara ayrıldığı gözlemlenmektedir. Bu gruplandırmalar daha sonra yapılan moleküler değerlendirme ve daha önce yapılan MALDI-TOF MS tanımlamaları da dikkate alınarak değerlendirildiğinde *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların jel görüntüsü baz büyüklükleri yaklaşık 500 bp ve 800 bp değerinde çıktığı gözlemlenmektedir. ITS gen bölgesi PCR jel görüntülerindeki bantların yaygın olarak beş farklı baz çifti büyüklük grubuna dağılım gösterdiği gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar moleküler değerlendirme ve MALDI-TOF MS değerlendirmeleri dikkate alınarak yapıldığında bu beş farklı grubun ve izolatların dağılımı yorumlanmıştır. Grupların

dağılımı yaklaşık olarak 500-bp, 650-bp, 700-bp, 760-bp 780-bp büyüklüklerinde olduğu görülmektedir. Bunlarda 500-bp büyüklüğü dağılımındaki suşların (Hat 33-HUF16M3A11002, 38-HUF16M3B11016, Hat 39-HUF16M3B11017, Hat 40-HUF16M3B11020, Hat 41-HUF16M3B11021, Hat 42-HUF16M3B11023, Hat 43-HUF16M3C11031, Hat 44-HUF16M3C11032, Hat 45-HUF16M3C11033, Hat 46-HUF16M3C11034) *Metschnikowia sp.* ve *Saccharomycete sp.* sınıfına ait oldukları, 650-bp büyüklüğü dağılımındaki suşların (Hat 31- HUF16M2K10011) *Yarrowia* sınıfına ait oldukları, 700-bp büyüklüğü dağılımındaki suşların (Hat 4- HUF16M0T10004, Hat 23-HUF16M2K10001, Hat 24- HUF16M2K10003, Hat 26- HUF16M2K10005, Hat 29-HUF16M2K10009, Hat 30- HUF16M2K10010, Hat 32- HUF16M2K10015, 114-HUF17M3H21199) *Candida* sınıfına ait oldukları, 760-bp büyüklüğü dağılımındaki suşların (Hat71-HUF17M3D31087, Hat75-HUF17M3D32092, Hat76-HUF17M3D32093, Hat77-HUF17M3D32096, Hat78-HUF17M3E21109, Hat79-HUF17M3E21110, Hat91-HUF17M3F21128, Hat113-HUF17M3H21197, Hat120-HUF17M3H22218) *Cryptococcus* ve *Naganishia* sınıfına ait oldukları tespit edilmiştir. 780-bp büyüklüğü dağılımındaki suşların ise (95-HUF17M3F31139, Hat 96-HUF17M3F32141) *Hanseniaspora* sınıfına ait oldukları görülmektedir. Bu izolasyonların MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalarına göre dağılımlarına baktığımız zaman *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia*, *Metschnikowia* ve diğer mikroorganizma cinslerine ait olduğu aşağıda (Bölüm 4.6.) MALDI-TOF MS ve moleküler değerlendirme çizelgelerinde (Çizelge 4.19- 4.22 ve Çizelge 4.23-4.26)'de özetlenmiş olarak görülmektedir.



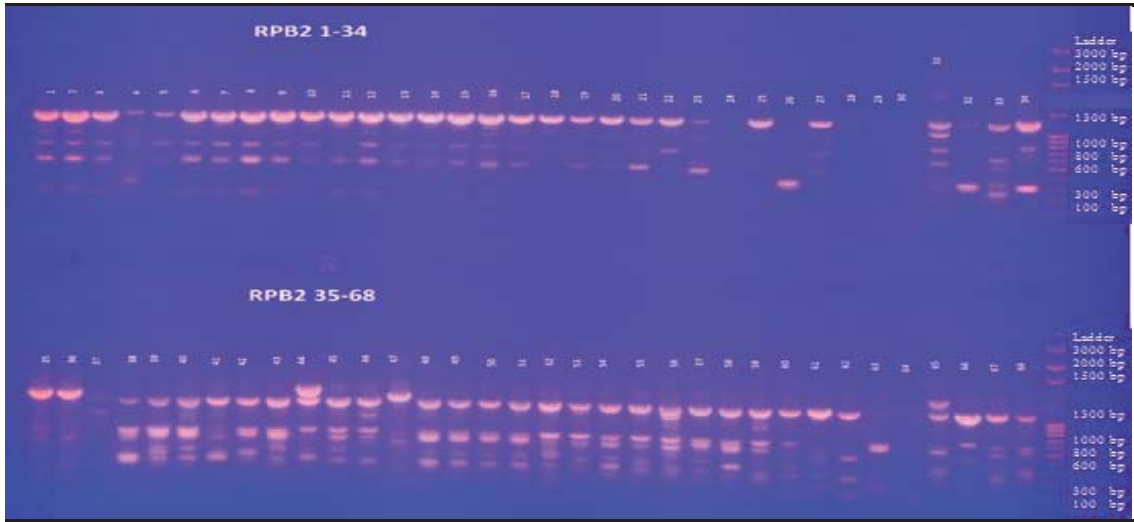
Şekil 4.8. LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), Hat 1- HUF16M100001, Hat 2- HUF16M100002, Hat 3- HUF16M100003, Hat 4- HUF16M0T10004, Hat 5- HUF16M0T10005, Hat 6- HUF16M0T10006, Hat 7- HUF16M0T10007, Hat 8- HUF16M0T10008, Hat 9- HUF16M0T10009, Hat 10- HUF16M0T10010, Hat 11- HUF16M0T10011, Hat 12- HUF16M0T10012, Hat 13- HUF16M0T10013, Hat 14- HUF16M0T10014, Hat 15- HUF16M0T10016, Hat 16- HUF16M0T10017, Hat 17- HUF16M0T10018, Hat 18- HUF16M0T10019, Hat 19- HUF16M1C0001, Hat 20- HUF16M1C0002, Hat 21- HUF16M1C0003, Hat 22- HUF16M1C0004, Hat 23- HUF16M2K10001, Hat 24- HUF16M2K10003, Hat 25- HUF16M2K10004, Hat 26- HUF16M2K10005, Hat 27- HUF16M2K10006, Hat 28- HUF16M2K10007, Hat 29- HUF16M2K10009, Hat 30- HUF16M2K10010, Hat 31- HUF16M2K10011, Hat 32- HUF16M2K10015, Hat 33- HUF16M3A11002, Hat 34- HUF16M3A11003, Hat 35- HUF16M3A12012, Hat 36- HUF16M3A12013, Hat 37- HUF16M3A12014, Hat 38- HUF16M3B11016, Hat 39- HUF16M3B11017, Hat 40- HUF16M3B11020, Hat 41- HUF16M3B11021, Hat 42- HUF16M3B11023, Hat 43- HUF16M3C11031, Hat 44- HUF16M3C11032, Hat 45- HUF16M3C11033, Hat 46- HUF16M3C11034, Hat 47- HUF16M3C12041, Hat 48- HUF16M3D11047, Hat 49- HUF16M3D11048, Hat 50- HUF16M3D11049, Hat 51- HUF16M3D11052, Hat 52- HUF16M3E11059, Hat 53- HUF16M3F11076, Hat 54- HUF16M3F11078, Hat 55- HUF16M3G11085, Hat 56- HUF16M3G11086, Hat 57- HUF16M3G11088, Hat 58- HUF16M3G11089, Hat 59- HUF16M3H11101, Hat 60- HUF16M3H11104, Hat 61- HUF17M3A21001, Hat 62- HUF17M3A31013, Hat 63- HUF17M3A32019, Hat 64- HUF17M3B32047, Hat 65- HUF17M3C21050, Hat 66- HUF17M3C31063, Hat 67- HUF17M3C31064, Hat 68- HUF17M3C31065



Şekil 4.9. LSU gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb),33-HUF16M3A11002, Hat 34-HUF16M3A11003,Hat 35-HUF16M3A12012,,Hat 36-HUF16M3A12013,Hat 37,HUF16M3A12014,Hat 38-HUF16M3B11016,Hat 39-HUF16M3B11017,Hat 40-HUF16M3B11020,Hat 41-HUF16M3B11021,Hat 42-HUF16M3B11023,Hat 43-HUF16M3C11031,Hat 44-HUF16M3C11032,Hat 45-HUF16M3C11033,Hat 46-HUF16M3C11034,Hat 47-HUF16M3C12041,Hat 48-HUF16M3D11047,Hat 49-HUF16M3D11048,Hat 50-HUF16M3D11049,Hat 51-HUF16M3D11052,Hat 52-HUF16M3E11059,Hat 53-HUF16M3F11076,Hat 54-HUF16M3F11078,Hat 55-HUF16M3G11085,Hat 56-HUF16M3G11086,Hat 57-HUF16M3G11088,Hat 58-HUF16M3G11089,Hat 59-HUF16M3H11101,Hat 60-HUF16M3H11104,Hat 61-HUF17M3A21001,Hat 62-HUF17M3A31013,Hat 63-HUF17M3A32019, Hat 64-HUF17M3B32047,Hat 65-HUF17M3C21050,Hat 66-HUF17M3C31063,Hat 67-HUF17M3C31064,Hat 68-HUF17M3C31065,Hat 69-HUF17M3C31066,Hat 70-HUF17M3D31086, Hat 71-HUF17M3D31087,Hat 72-HUF17M3D31088,Hat 73-HUF17M3D31089,Hat 74-HUF17M3D31090,Hat 75,HUF17M3D32092,Hat 76-HUF17M3D32093,Hat 77-HUF17M3D32096, Hat 78-HUF17M3E21109,Hat 79-HUF17M3E21110,Hat 80-HUF17M3E21112,Hat 81-HUF17M3E21113,Hat 82-HUF17M3E21114,Hat 83-HUF17M3E21115,Hat 84-HUF17M3E22117,Hat 85-HUF17M3F21122,Hat 86-HUF17M3F21123,Hat 87-HUF17M3F21124,Hat 88-HUF17M3F21125,Hat 89-HUF17M3F21126,Hat 90-HUF17M3F21127,Hat 91-HUF17M3F21128,Hat 92-HUF17M3F21134,Hat 93-HUF17M3F31135,Hat 94-HUF17M3F31136,Hat 95-

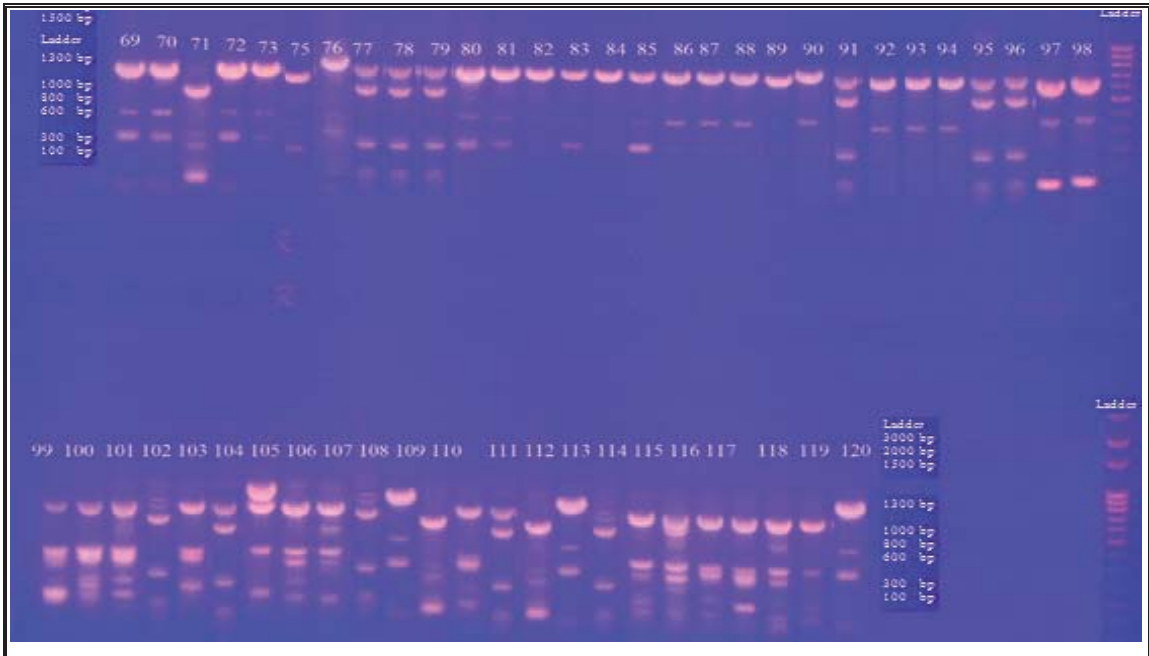
HUF17M3F31139,Hat 96-HUF17M3F32141,Hat 97-HUF17M3F32146,Hat 98-HUF17M3G31147,Hat 99-HUF17M3G31150,Hat 100-HUF17M3G31151

Bütün izolatlar için LSU gen bölgesi için PCR reaksiyonlarının düzgün bir şekilde gerçekleştiği ve yaklaşık 1100 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edildiği saptanmıştır. LSU gen bölgesi PCR jel görüntülerine bakıldığında farklı cins ve türdeki mikroorganizmaların jel görüntüsü üzerindeki bant ayrımlarının yok denecek kadar az olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.10. RPB2 gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi. Ladder(100-3000kb), Hat 1- HUF16M100001, Hat 2- HUF16M100002, Hat 3- HUF16M100003, Hat 4- HUF16M0T10004, Hat 5- HUF16M0T10005, Hat 6- HUF16M0T10006, Hat 7- HUF16M0T10007, Hat 8- HUF16M0T10008, Hat 9- HUF16M0T10009, Hat 10- HUF16M0T10010, Hat 11- HUF16M0T10011, Hat 12- HUF16M0T10012, Hat 13- HUF16M0T10013, Hat 14- HUF16M0T10014, Hat 15- HUF16M0T10016, Hat 16- HUF16M0T10017, Hat 17- HUF16M0T10018, Hat 18- HUF16M0T10019, Hat 19- HUF16M1C0001, Hat 20- HUF16M1C0002, Hat 21- HUF16M1C0003, Hat 22- HUF16M1C0004, Hat 23- HUF16M2K10001, Hat 24- HUF16M2K10003, Hat 25- HUF16M2K10004, Hat 26- HUF16M2K10005, Hat 27- HUF16M2K10006, Hat 28- HUF16M2K10007, Hat 29- HUF16M2K10009, Hat 30- HUF16M2K10010, Hat 31- HUF16M2K10011, Hat 32- HUF16M2K10015, Hat 33- HUF16M3A11002, Hat 34-HUF16M3A11003,Hat 35-HUF16M3A12012,,Hat 36- HUF16M3A12013,Hat 37,HUF16M3A12014,Hat 38-HUF16M3B11016,Hat 39- HUF16M3B11017,Hat 40-HUF16M3B11020,Hat 41-HUF16M3B11021,Hat 42-

HUF16M3B11023,Hat 43-HUF16M3C11031,Hat 44-HUF16M3C11032,Hat 45-
HUF16M3C11033,Hat 46-HUF16M3C11034,Hat 47-HUF16M3C12041,Hat 48-
HUF16M3D11047,Hat 49-HUF16M3D11048,Hat 50-HUF16M3D11049,Hat 51-
HUF16M3D11052,Hat 52-HUF16M3E11059,Hat 53-HUF16M3F11076,Hat 54-
HUF16M3F11078,Hat 55-HUF16M3G11085,Hat 56-HUF16M3G11086,Hat 57-
HUF16M3G11088,Hat 58-HUF16M3G11089,Hat 59-HUF16M3H11101,Hat 60-
HUF16M3H11104,Hat 61-HUF17M3A21001,Hat 62-HUF17M3A31013,Hat 63-
HUF17M3A32019, Hat 64-HUF17M3B32047,Hat 65-HUF17M3C21050,Hat 66-
HUF17M3C31063,Hat 67-HUF17M3C31064,Hat 68-HUF17M3C31065



Şekil 4.11. RPB2 gen bölgesi varlığını ve sayısını gösteren agaroz jel elektroforezi.
Ladder(100-3000kb),Hat 69-HUF17M3C31066,Hat 70-HUF17M3D31086, Hat 71-
HUF17M3D31087,Hat 72-HUF17M3D31088,Hat 73-HUF17M3D31089,Hat 74-
HUF17M3D31090,Hat 75,HUF17M3D32092,Hat 76-HUF17M3D32093,Hat 77-
HUF17M3D32096, Hat 78-HUF17M3E21109,Hat 79-HUF17M3E21110,Hat 80-
HUF17M3E21112,Hat 81-HUF17M3E21113,Hat 82-HUF17M3E21114,Hat 83-
HUF17M3E21115,Hat 84-HUF17M3E22117,Hat 85-HUF17M3F21122,Hat 86-
HUF17M3F21123,Hat 87-HUF17M3F21124,Hat 88-HUF17M3F21125,Hat 89-
HUF17M3F21126,Hat 90-HUF17M3F21127,Hat 91-HUF17M3F21128,Hat 92-
HUF17M3F21134,Hat 93-HUF17M3F31135,Hat 94-HUF17M3F31136,Hat 95-

HUF17M3F31139,Hat 96-HUF17M3F32141,Hat 97-HUF17M3F32146,Hat 98-
HUF17M3G31147,Hat 99-HUF17M3G31150,Hat 100-HUF17M3G31151,Hat 101-
HUF17M3G31152,Hat 102-HUF17M3G32153,Hat 103-HUF17M3G32157,Hat 104-
HUF17M3H21173,Hat 105-HUF17M3H21174,Hat 106-HUF17M3H21175,Hat 107-
HUF17M3H22179,Hat 108-HUF17M3H22180,Hat 109-HUF17M3H22182,Hat 110-
HUF17M3H31185,Hat 111-HUF17M3H32189,Hat 112-HUF17M3H21196,Hat 113-
HUF17M3H21197,Hat 114-HUF17M3H21199,Hat 115-HUF17M3H21200,Hat 116-
HUF17M3H21208,Hat 117-HUF17M3H21209,Hat 118-HUF17M3H21210,Hat 119-
HUF17M3H21212,Hat 120-HUF17M3H22218

RPB2 gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında jel görüntüleri bant büyüklükleri yaklaşık olarak 1200 bp değerinde olduğu gözlemlenmiştir. RPB2 gen bölgesi için jel yürütme sonucunda çoklu bant oluşumu olduğu görülmektedir. Çoklu bant örneklerinin sekanslama işlemi yapılabilmesi için jelden ekstraksiyon yapılması yoluna gidilerek çözüm oluşturulmuştur. RPB2 gen bölgesi ITS gen bölgesine benzer bir şekilde mikroorganizma cinsine bağlı olarak farklı bant büyüklüklerinde sonuçlar vermiştir fakat çoklu bant oluşumu nedeniyle bant büyüklükleri üzerinden gruplandırma ITS gen bölgesi kadar açık değildir. Bu durum yukarıda (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) bakıldığında önemli hatlar (Hat 26- HUF16M2K10005, Hat 32- HUF16M2K10015, Hat 71- HUF17M3D31087, 76-HUF17M3D32093 izolatları vb.) üzerinde görülmektedir. Moleküler tanımlama yapılırken RPB2 gen bölgesinin ITS ve LSU gen bölgesine kıyasla benzer sonuçlar vermesine rağmen çoklu bant oluşum sorunu ve jelden ekstraksiyon işlemleri önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. RPB2 gen bölgesi moleküler değerlendirme çizelgeleri, MALDI-TOF MS değerlendirmeleri ile beraber aşağıda (Kısım 4.6.)’da (Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20)’de verilmiştir.

4.6. DNA Barkodlamada Gen Bölgeleri Sekans Verilerinin İşlenmesi, NCBI Taramaları

Klasik yöntemlerle ön tanımlamaları yapılarak *S. cerevisiae* türüne ait olduğu düşünülen izolasyonların tamamı (120 adet) üzerinde üç farklı gen bölgesi (*ITS*, *LSU*, *RPB2*) için PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezi sisteminde görüntülenmiştir. Çoklu bant oluşumu gözlemlenen *RPB2* gen bölgesi için 1200 bp büyüklüğündeki bantlardan ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm

PCR ürünleri sekans analizlerine tabi tutulmuş, elde edilen sekans verileri ile moleküler tanımlama işlemleri ve DNA barkodlama analizleri yürütülmüştür. MALDI-TOF MS tanımlamaları ve moleküler tanımlamalar doğruluk açısından birbirleriyle kıyaslanmıştır. Moleküler tanımlama ile *Metschnikowia sp.* olarak tanımlanan izolatlardan üçünün (HUF17M3F31135, HUF17M3F21123, HUF17M3F21125) MALDI-TOF MS analizi ile moleküler tanımlamadan farklı *S. cerevisiae* türü olarak tanımlandığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.19).

4.6.1. Gen Bölgeleri Sekans Verilerinin İşlenmesi, NCBI Taramaları ve MALDI-TOF Değerlendirmeleri

Elde edilen izolatların tamamı üzerinde uygulanan klasik tanımlama testleri, MALDI-TOF tanımlama testleri ve moleküler tanımlama testleri doğrultusunda yıllara bağlı *S.cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler sergileyen izolat sayıları aşağıda (Çizelge 4.18) özetlenmiş şekilde detaylı olarak verilmiştir. Moleküler ve MALDI_TOF tanımlama sonuçları tek başına Çizelge 4.19, Çizelge 4.20’de verilmiştir. DNA barkodlama analizlerine dahil edilmemiş olan 2018 yılı izolatlarına ait moleküler ve MALDI-TOF tanımlama sonuçları ise Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Tüm tanımlama testleri dikkate alındığında yıllara göre *S.cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyon sayıları

| TEST | | 2016 yılı | 2017 yılı | 2018 yılı | Toplam |
|--------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| Makroskobik | | 109 | 79 | 62 | 250 |
| Mikroskobik | | 68 | 69 | 104 | 241 |
| Biyokimyasal | | 68 | 73 | 93 | 234 |
| Makroskobik-Mikroskobik-Biyokimyasal | | 62 | 64 | 93 | 207 |
| Maldı-Tof Tanımlaması | | 39 | 25 | 88 | 152 |
| Moleküler-Tanımlama | ITS Gen Bölgesi | 24 | 2 | Yapılmadı | 26 |
| | LSU Gen Bölgesi | 25 | 2 | Yapılmadı | 27 |

| | | | | | |
|--|--------------------------|----|----|-----------|----|
| | RPBII Gen Bölgesi | 39 | 19 | Yapılmadı | 58 |
| | Ortak Tanımlama | 39 | 23 | Yapılmadı | 62 |

Sekans analizleri ITS gen bölgesi için ileri ve geri yönlü olarak çift yönlü olarak yapılmış ve elde edilen ileri geri yönlü sekanslardan konsensus sekans birleştirmeleri BioEdit programı ile gerçekleştirilmiştir. LSU, RPB2 gen bölgeleri için ise sadece ileri yönlü olarak tek yönlü sekanslama yapılmıştır. Elde edilen sekans verilerinden FinchTV programı ile hatalı okuma bölgeleri uzaklaştırılmıştır. Ardından BioEdit programı ile ileri sekanslar sıralanmış çoklu eşleştirmeler yapılmış, ve NCBI veri tabanında BLAST analiz sorgulaması yapılarak suşların hangi türlere ait oldukları moleküler düzeyde sorgulanmıştır. Elde edilen sonuçlar gen bölgelerine bağlı olarak *S. cerevisiae* olanlar ve olmayanlar diye iki çizelgede (Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20) toparlanmıştır. DNA barkodlama analizlerine alınmayan 2018 yılı izolasyonlarının klasik tanımlama ve MALDI-TOF tanımlama sonuçlarına bağlı değerlendirmeleri ayrıca aşağıda (Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22)'de verilmiştir. İzolasyonların tamamının özetlenmiş dağılım değerlendirmeleri aşağıda (Çizelge 4.23-Çizelge 4.26)'da verilmiştir.

Çizelge 4.17. Gen bölgeleri sekans verileri NCBI sorgulama sonuçlarına ve MALDI-TOF MS sonuçlarına göre *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolatlar

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | ITS, LSU, RPB2, MALDI-TOF Karşılaştırma | | | |
|----|----------------|--------------------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | | MALDI-TOF | Tür ITS | Tür LSU | Tür RPB2 |
| 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 2 | HUF16M0T10002 | Dorbi yaş maya | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 3 | HUF16M0T10003 | Pak yaş maya | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 4 | HUF16M0T10005 | Pak instant maya 125g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 5 | HUF16M0T10006 | Dr.Oetker Instant kuru maya 10g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 6 | HUF16M0T10007 | Pak Instant kuru hamur maya 10g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 7 | HUF16M0T10008 | Yuva Instant kuru hamur maya 10g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 8 | HUF16M0T10009 | Pak kuru hamur mayası 100g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 9 | HUF16M0T10010 | Yuva aktif kuru hamur mayası 100g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 10 | HUF16M0T10011 | Dr.Oetker ekşi kuru hamur mayası 35g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 11 | HUF16M0T10012 | Piyale Instant kuru hamur | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |

| | | | | | | |
|----|---------------|--|----------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| | | mayası | | | | |
| 12 | HUF16M0T10013 | TIB/Dibosh winw 10g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 13 | HUF16M0T10014 | Angel Instant kuru hamur mayası 100g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 14 | HUF16M0T10016 | Dibosh aktif kuru şarap mayası 12g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 15 | HUF16M0T10017 | Danboili/Lesaffre yeeast 13g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 16 | HUF16M0T10018 | Dr oetker germ keim dampel netwending | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 17 | HUF16M0T10019 | Buggeman Instan 500g | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 18 | HUF16M1C0001 | RSK/Instant kuru maya (08022) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 19 | HUF16M1C0002 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763 | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 20 | HUF16M1C0003 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 6328™ | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 21 | HUF16M1C0004 | Şarapçılık (Chr. Hansen) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 22 | HUF16M2K10004 | Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 23 | HUF16M2K10006 | Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 24 | HUF16M2K10007 | Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 25 | HUF16M3B11017 | Kırkkale Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 26 | HUF16M3B11021 | Kırkkale Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 27 | HUF16M3C11031 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 28 | HUF16M3C11032 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 29 | HUF16M3C11033 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 30 | HUF16M3D11047 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 31 | HUF16M3D11048 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 32 | HUF16M3E11059 | Aksaray Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 33 | HUF16M3F11076 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 34 | HUF16M3F11078 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 35 | HUF16M3G11085 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 36 | HUF16M3G11086 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 37 | HUF16M3G11088 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 38 | HUF16M3H11101 | Çankırı Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 39 | HUF16M3H11104 | Çankırı Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 40 | HUF17M3B32047 | Kırkkale2 Toparak | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Sekans yok |
| 41 | HUF17M3C31063 | Kırşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 42 | HUF17M3C31065 | Kırşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 43 | HUF17M3C31066 | Kırşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 44 | HUF17M3D31086 | Nevşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 45 | HUF17M3D31088 | Nevşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |

| | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 46 | HUF17M3D31089 | Nevşehir2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 47 | HUF17M3E21112 | Aksaray2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 48 | HUF17M3E21113 | Aksaray2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 49 | HUF17M3E21114 | Aksaray2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 50 | HUF17M3F21122 | Ankara1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 51 | HUF17M3F21123 | Ankara1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 52 | HUF17M3F21124 | Ankara1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 53 | HUF17M3F21125 | Ankara1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | Sekans yok |
| 54 | HUF17M3F21126 | Ankara1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 55 | HUF17M3F21134 | Ankara1 Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 56 | HUF17M3F31135 | Ankara2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 57 | HUF17M3F31136 | Ankara2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 58 | HUF17M3F32146 | Ankara2 Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> |
| 59 | HUF17M3G31151 | Eskişehir1 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 60 | HUF17M3G32157 | Eskişehir1 Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 61 | HUF17M3H22179 | Çankırı1 Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 62 | HUF17M3H21208 | Karaman2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 63 | HUF17M3H21209 | Karaman2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| 64 | HUF17M3H21210 | Karaman2 Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>S. cerevisiae</i> |

*ND: Tanımlanamadı

Çizelge 4.18. Gen bölgeleri sekans verileri NCBI sorgulama sonuçları ve MALDI-TOF MS sonuçlarına göre *S. cerevisiae* olarak tespit edilmeyen izolatlar

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | ITS, LSU, RPB2, Malditof Karşılaştırma | | | |
|----|----------------|-------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | | | MALDI-TOF | Tür ITS | Tür LSU | Tür RPB2 |
| 1 | HUF16M0T10004 | Germ Mautner markhof yaş maya | <i>Candida tropicalis</i> | <i>Candida tropicalis</i> | <i>Candida tropicalis</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
| 2 | HUF16M2K10001 | HÜBB | ND | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> |
| 3 | HUF16M2K10003 | HÜBB | ND | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | Sekans yok |
| 4 | HUF16M2K10005 | HÜBB | ND | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 5 | HUF16M2K10009 | HÜBB | <i>Candida pelliculosa</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> |
| 6 | HUF16M2K10010 | HÜBB | ND | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | <i>Wickehamomyces anomalus</i> | Sekans yok |
| 7 | HUF16M2K10011 | HÜBB | <i>Candida lipolytica</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> |
| 8 | HUF16M2K10015 | HÜBB | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 9 | HUF16M3A11002 | Kayseri Üzüm | <i>Candida pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 10 | HUF16M3A11003 | Kayseri Üzüm | ND | <i>Hanseniaspora opuntiae</i> | <i>Hanseniaspora opuntiae</i> | <i>Hanseniaspora valbyensis</i> |

| | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 11 | HUF16M3A12012 | Kayseri Toprak | ND | <i>Cryptococcus aerius</i> | <i>Cryptococcus aerius</i> | <i>Cryptococcus aerius</i> |
| 12 | HUF16M3A12013 | Kayseri Toprak | ND | <i>Cryptococcus aerius</i> | <i>Cryptococcus aerius</i> | <i>Cryptococcus aerius</i> |
| 13 | HUF16M3A12014 | Kayseri Toprak | ND | Sekans yok | <i>Nagenishia vishniacii</i> | Sekans yok |
| 14 | HUF16M3B11016 | Kırıkkale Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | Sekans yok | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 15 | HUF16M3B11020 | Kırıkkale Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 16 | HUF16M3B11023 | Kırıkkale Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 17 | HUF16M3C11034 | Kırşehir Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 18 | HUF16M3C12041 | Kırşehir Toprak | ND | <i>Solicocozyma aeria</i> | <i>Solicocozyma aeria</i> | <i>Cryptococcus aerius</i> |
| 19 | HUF16M3D11049 | Nevşehir Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 20 | HUF16M3D11052 | Nevşehir Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metchnikowia sp.</i> | <i>Metchnikowia pulmeria</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 21 | HUF16M3G11089 | Eskişehir Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 22 | HUF17M3A21001 | Kayseri1 Üzüm | ND | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> |
| 23 | HUF17M3A31013 | Kayseri2 Üzüm | ND | <i>Pichia manshurica</i> | <i>Pichia manshurica</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> |
| 24 | HUF17M3A32019 | Kayseri2 Toprak | <i>Candida crusei</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> |
| 25 | HUF17M3C21050 | Kırşehir1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 26 | HUF17M3C31064 | Kırşehir2 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> | <i>Methnickowia sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 27 | HUF17M3D31087 | Nevşehir2 Üzüm | ND | <i>Cryptococcus albidus</i> | <i>Cryptococcus adeliensis</i> | <i>Cryptococcus adeliensis</i> |
| 28 | HUF17M3D31090 | Nevşehir2 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 29 | HUF17M3D32092 | Nevşehir2 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> | Sekans yok |
| 30 | HUF17M3D32093 | Nevşehir2 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> |
| 31 | HUF17M3D32096 | Nevşehir2 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> | Sekans yok |
| 32 | HUF17M3E21109 | Aksaray2 Üzüm | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> |
| 33 | HUF17M3E21110 | Aksaray2 Üzüm | ND | <i>Naganishia uzbekistanensis</i> | <i>Naganishia vishniacii</i> | <i>Naganishia albida</i> |
| 34 | HUF17M3E21115 | Aksaray2 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 35 | HUF17M3E22117 | Aksaray2 Toprak | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 36 | HUF17M3F21127 | Ankara1 Üzüm | <i>Priceomyces carsonii</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 37 | HUF17M3F21128 | Ankara1 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Cryptococcus adeliensis</i> | Sekans yok |
| 38 | HUF17M3F31139 | Ankara2 Üzüm | ND | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>Hanseniaspora valbyensis</i> |
| 39 | HUF17M3F32141 | Ankara2 Toprak | <i>Kloeckera apiculata</i> | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>Hanseniaspora valbyensis</i> |
| 40 | HUF17M3G31147 | Eskişehir1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 41 | HUF17M3G31150 | Eskişehir1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 42 | HUF17M3G31152 | Eskişehir1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia sp.</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 43 | HUF17M3G32153 | Eskişehir1 Toprak | ND | <i>Candida membranifaciens</i> | <i>Candida friedrichii</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 44 | HUF17M3H21173 | Çankırı1 Üzüm | ND | <i>Hanseniaspora aputiae</i> | <i>Hanseniaspora aputiae</i> | <i>Hanseniaspora aputiae</i> |
| 45 | HUF17M3H21174 | Çankırı1 Üzüm | ND | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 46 | HUF17M3H21175 | Çankırı1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulcherrima</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 47 | HUF17M3H22180 | Çankırı1 Toprak | <i>Peanibacillus durus</i> | <i>Candida raillenensis</i> | <i>Aurobasidium pullulans</i> | Sekans yok |

| | | | | | | |
|----|---------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|
| 48 | HUF17M3H22182 | Çankırı1 Toprak | <i>Burkholderi a diffusa</i> | <i>Cryptococcus laurentii</i> | <i>Cryptococcus laurentii</i> | <i>Cryptococcus adeliensis</i> |
| 49 | HUF17M3H31185 | Çankırı2 Üzüm | ND | <i>Pichia kudrivzevi</i> | <i>Pichia kudrivzevi</i> | <i>Pichia kudrivzevii</i> |
| 50 | HUF17M3H32189 | Çankırı2 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | Sekans yok | Sekans yok |
| 51 | HUF17M3H21196 | Karaman1 Üzüm | <i>Candida kefyr</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Sekans yok |
| 52 | HUF17M3H21197 | Karaman1 Üzüm | ND | <i>Cyriptococcus aerius</i> | <i>Cyriptococcus aerius</i> | <i>Cyriptococcus aerius</i> |
| 53 | HUF17M3H21199 | Karaman1 Üzüm | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| 54 | HUF17M3H21200 | Karaman1 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulmeria</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 55 | HUF17M3H21212 | Karaman2 Üzüm | <i>Candida pucherrima</i> | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | <i>Metchnikowia pulmeria</i> | <i>Methnickowia rubicola</i> |
| 56 | HUF17M3H22218 | Karaman2 Toprak | ND | <i>Naganishia albida</i> | <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> | Sekans yok |

*ND: Tanımlanamadı

Gerçekleştirilen MALDI-TOF MS analizleri tanımlama sonuçları ile moleküler yöntem sorgulamalarını karşılaştırdığımızda moleküler tanımlama ile *Metschnikowia sp.* olarak tanımlanan izolatlardan üçünün (HUF17M3F31135, HUF17M3F21123, HUF17M3F21125) MALDI-TOF MS analizi ile *S. cerevisiae* olarak tanımlandığı tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.19) sonuçların *S. cerevisiae* tespitinde % 98.87 benzerlik gösterdiği görülmektedir. Moleküler tanımlama ile *S. cerevisiae* türünden farklı cins ve türde olduğu tespit edilen izolatların MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında ise (Çizelge 4.20) MALDI-TOF MS tanımlama ile moleküler tanımlama sonuçlarının birbirinden yüksek derecede farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Bu durum temelde örnek hazırlama prosedürleri ve veri kütüphaneleri yeterliliği ile açıklanmaktadır [205]. Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması, ya bilinmeyen organizmanın peptid kütle parmak izinin (PMF), veritabanında bulunan peptid kütle parmak izleri ile karşılaştırılmasıyla ya da bilinmeyen organizmanın biyobelirteçlerinin kütlelerinin proteome veritabanı ile eşleştirilmesiyle gerçekleştirilir. TOF ölçüm bilgilerine dayanarak ve bir karakteristik spektrumdan yararlanarak PMF'leri üzerinden numune belirlemesini gerçekleştirir [205].

Çizelge 4.19. 2018 yılı ulusal üniversite araştırmacıları ve İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan örneklerden izole edilen ve MALDI-TOF MS analizlerine göre *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolatlar

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | MALDI-TOF Sonucu | No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | MALDI-TOF Sonucu |
|----|----------------|---------|------------------|----|----------------|---------|------------------|
|----|----------------|---------|------------------|----|----------------|---------|------------------|

| | | | | | | | |
|----|---------------|-------|----------------------|----|---------------|------------------|----------------------|
| 1 | HUF18M2Y10001 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 46 | HUF18M3B31006 | Kırıkkale Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 2 | HUF18M2Y10002 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 47 | HUF18M3B21008 | Kırıkkale Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 3 | HUF18M2Y10003 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 48 | HUF18M3B22010 | Kırıkkale Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 4 | HUF18M2Y10004 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 49 | HUF18M3C11001 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 5 | HUF18M2Y10005 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 50 | HUF18M3C11002 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 6 | HUF18M2Y10006 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 51 | HUF18M3C12005 | Kırşehir Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 7 | HUF18M2Y10007 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 52 | HUF18M3C21008 | Kırşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 8 | HUF18M2Y10008 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 53 | HUF18M3C22010 | Kırşehir Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 9 | HUF18M2Y10009 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 54 | HUF18M3D11001 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 10 | HUF18M2Y10010 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 55 | HUF18M3D11003 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 11 | HUF18M2Y10011 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 56 | HUF18M3D21006 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 12 | HUF18M2Y10012 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 57 | HUF18M3D21008 | Nevşehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 13 | HUF18M2Y10013 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 58 | HUF18M3E11003 | Aksaray Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 14 | HUF18M2Y10014 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 59 | HUF18M3E12005 | Aksaray Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 15 | HUF18M2Y10015 | AÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 60 | HUF18M3E21007 | Aksaray Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 16 | HUF18M2Z10001 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 61 | HUF18M3F11001 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 17 | HUF18M2Z10002 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 62 | HUF18M3F11003 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 18 | HUF18M2Z10003 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 63 | HUF18M3F11005 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 19 | HUF18M2Z10004 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 64 | HUF18M3F21010 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 20 | HUF18M2Z10005 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 65 | HUF18M3F21012 | Ankara Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 21 | HUF18M2Z10006 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 66 | HUF18M3F22018 | Ankara Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 22 | HUF18M2Z10007 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 67 | HUF18M3G11001 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 23 | HUF18M2Z10008 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 68 | HUF18M3G11004 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 24 | HUF18M2Z10009 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 69 | HUF18M3G21009 | Eskişehir Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 25 | HUF18M2Z10010 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 70 | HUF18M3H11004 | Çankırı Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 26 | HUF18M2Z10012 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 71 | HUF18M3H22007 | Çankırı Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 27 | HUF18M2Z10013 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 72 | HUF18M3H32012 | Çankırı Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 28 | HUF18M2Z10014 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 73 | HUF18M3I11002 | Karaman Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 29 | HUF18M2Z10015 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 74 | HUF18M3I22005 | Karaman Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 30 | HUF18M2Z10018 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 75 | HUF18M3I22006 | Karaman Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 31 | HUF18M2Z10020 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 76 | HUF18M3J11004 | Sivas Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 32 | HUF18M2Z10021 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 77 | HUF18M3J21008 | Sivas Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 33 | HUF18M2Z10022 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 78 | HUF18M3J22010 | Sivas Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 34 | HUF18M2Z10023 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 79 | HUF18M3K11002 | Konya Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 35 | HUF18M2Z10026 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 80 | HUF18M3K12004 | Konya Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 36 | HUF18M2Z10029 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 81 | HUF18M3K21007 | Konya Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 37 | HUF18M2Z10030 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 82 | HUF18M3L11001 | Yozgat Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |

| | | | | | | | |
|----|---------------|------------------|----------------------|----|---------------|---------------|----------------------|
| 38 | HUF18M2Z10031 | ÇÜGMB | <i>S. cerevisiae</i> | 83 | HUF18M3L12005 | Yozgat Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 39 | HUF18M3A11001 | Kayseri Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | 84 | HUF18M3L12007 | Yozgat Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 40 | HUF18M3A11003 | Kayseri Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | 85 | HUF18M3L21008 | Yozgat Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 41 | HUF18M3A11005 | Kayseri Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | 86 | HUF18M3L21010 | Yozgat Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> |
| 42 | HUF18M3A21007 | Kayseri Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | 87 | HUF18M3L32011 | Yozgat Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 43 | HUF18M3A22009 | Kayseri Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | 88 | HUF18M3L32014 | Yozgat Toprak | <i>S. cerevisiae</i> |
| 44 | HUF18M3B11002 | Kırıkkale Üzüm | <i>S. cerevisiae</i> | 89 | | | |
| 45 | HUF18M3B12004 | Kırıkkale Toprak | <i>S. cerevisiae</i> | 90 | | | |

*ND: Tanımlanamadı

Çizelge 4.20. 2018 yılı ulusal üniversite araştırmacıları ve İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan örneklerden izole edilen MALDI-TOF MS analizlerine göre *S. cerevisiae* olarak tespit edilmeyen izolatlar

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | MALDI-TOF Sonucu | No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | MALDI-TOF Sonucu |
|----|----------------|------------------|-----------------------------|----|----------------|------------------|----------------------------------|
| 1 | HUF18M2Z10011 | ÇÜGMB | <i>Priceomyces carsonii</i> | 10 | HUF18M3B22011 | Kırıkkale Toprak | <i>Candida pelliculosa</i> |
| 2 | HUF18M2Z10016 | ÇÜGMB | Gelişim yok | 11 | HUF18M3C12006 | Kırşehir Toprak | <i>Candida pelliculosa</i> |
| 3 | HUF18M2Z10017 | ÇÜGMB | Gelişim yok | 12 | HUF18M3C32012 | Kırşehir Toprak | <i>Aspergillus flavus/oryzae</i> |
| 4 | HUF18M2Z10024 | ÇÜGMB | ND | 13 | HUF18M3D22011 | Nevşehir Toprak | <i>Candida pucherrima</i> |
| 5 | HUF18M2Z10025 | ÇÜGMB | ND | 14 | HUF18M3D32013 | Nevşehir Toprak | <i>Priceomyces carsonii</i> |
| 6 | HUF18M2Z10019 | ÇÜGMB | Gelişim yok | 15 | HUF18M3F12007 | Ankara Toprak | ND |
| 7 | HUF18M2Z10027 | ÇÜGMB | ND | 16 | HUF18M3G12006 | Eskişehir Toprak | ND |
| 8 | HUF18M2Z10028 | ÇÜGMB | ND | 17 | HUF18M3H11001 | Çankırı Üzüm | ND |
| 9 | HUF18M3B12005 | Kırıkkale Toprak | <i>Candida tropicalis</i> | 18 | HUF18M3I11003 | Karaman Üzüm | ND |

*ND: Tanımlanamadı

Üç farklı gen bölgesi kullanılarak elde edilen sekans verilerinin NCBI BLAST sorgulaması sonucunda şu sonuçlar elde edilmiştir. ITS gen bölgesi ile yapılan NCBI BLAST sorgulamasında sorgulanan 120 izolattan 25 tanesinin *S. cerevisiae* türüne ait olduğu, 38 tanesinin *Saccharomycete sp.* sınıfına ait olduğu, 5 tanesinin *Cryptococcus*, 6 tanesinin *Candida*, 8 tanesinin *Naganishia*, 4 tanesinin *Pichia*, 4 tanesinin *Wickerhamomyces*, 21 tanesinin *Metchnikowia*, 4 tanesinin *Hanseniaspora*, 1 tanesinin *Kluyveromyces*, 1 tanesinin *Yarrowia*, 1 tanesinin *Solicoccozyma* cinsinin farklı türlerine ait olduğu, 2 adet izolasyona ait sekans verisi elde edilemediğinden sorgulama sonucu elde edilemediği tespit edilmiştir.

LSU gen bölgesi ile yapılan NCBI BLAST sorgulamasında 120 izolattan 27 tanesi *S. cerevisiae* türüne ait olduğu, 41 tanesinin *Saccharomycete sp.* sınıfına ait olduğu, 7 tanesinin *Cryptococcus*, 5 tanesinin *Candida*, 6 tanesinin *Naganishia*, 4 tanesinin *Pichia*, 4 tanesinin *Wickerhamomyces*, 17 tanesinin *Metchnikowia*, 4 tanesinin *Hanseniaspora*, 1 tanesinin *Aurobasidium*, 1 tanesinin *Kluyveromyces*, 1 tanesinin *Yarrowia*, 1 tanesinin *Solicoccozyma* cinsinin farklı türlerine ait olduğu, 1 adet izolasyona ait sekans verisi elde edilemediğinden sorgulama sonucu elde edilemediği tespit edilmiştir.

RPB2 gen bölgesi ile yapılan NCBI BLAST sorgulamasında sorgulanan 120 izolattan 58 tanesi *S. cerevisiae* türüne ait olduğu, 1 tanesinin *Saccharomycete sp.* sınıfına ait olduğu, 6 tanesinin *Cryptococcus*, 5 tanesinin *Candida*, 3 tanesinin *Naganishia*, 4 tanesinin *Pichia*, 2 tanesinin *Wickerhamomyces*, 24 tanesinin *Metchnikowia*, 4 tanesinin *Hanseniaspora*, 1 tanesinin *Yarrowia*, cinsinin farklı türlerine ait olduğu, 12 adet izolasyona ait sekans verisi elde edilemediğinden sorgulama sonucu elde edilemediği tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS tanımlamalarında ise 120 izolattan 63 tanesi *S. cerevisiae* türüne ait olduğu, 27 tanesinin *Candida*, 1 tanesinin *Penibacillus*, 1 tanesinin *Burkholderia*, 1 tanesinin *Kloeckera*, 1 tanesinin *Priceomyces*, gruplarına ait türler olduğu, 26 tanesinin ise tespit edilemediği belirlenmiştir. Klasik tanımlama, moleküler tanımlama ve MALDI-TOF tanımlamaları aynı anda değerlendirildiğinde ise 2016-2017 yıllarına ait 120 adet 64 adet izolasyonun *S. cerevisiae* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen tüm izolatlar ait ITS, LSU, RPB2 gen bölgeleri NCBI tarama sonuçları ve MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları dağılımını ifade eden özetlenmiş çizelgeler aşağıda (Çizelge 4.23., Çizelge 4.24, Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26,)’da verilmiştir. Tüm bu değerlendirmeler göz önünde tutularak elde edilen izolatlar 9 taksonomik grup (Takson-1=*Saccharomycete sp.*, Takson-2=*S. cerevisiae*, Takson-3=*Cryptococcus sp.*, Takson-4=*Naganishia sp.*, Takson-5=*Pichia sp.*, Takson-6=*Candida sp.*, Takson-7=*Wickehamomyces sp.*, Takson-8=*Metchnikowia sp.*, Takson-9=*Hanseniaspora sp.*) ve diğer taksonomik grup oluşturmayan türler olarak ayrılmıştır.

Çizelge 4.21. Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın ITS gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı

| 2016 Yılı | | | | 2017 Yılı | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler | | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Grup 1 | 19 | - | 1 | Grup 1 | - | - | - |
| Grup 2 | 3 | - | 7 | Grup 2 | - | - | - |
| Grup 3 | 2 | - | - | Grup 3 | - | - | - |
| Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | | Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Kayseri | - | - | 5 | Kayseri | - | - | 3 |
| Kırıkkale | - | 3 | 2 | Kırıkkale | - | 1 | - |
| Kırşehir | - | 2 | 2 | Kırşehir | 1 | 2 | 2 |
| Nevşehir | - | 2 | 2 | Nevşehir | - | 3 | 5 |
| Aksaray | - | 1 | - | Aksaray | - | 3 | 4 |
| Ankara | - | 3 | - | Ankara | - | 5 | 7 |
| Eskişehir | - | 3 | 1 | Eskişehir | - | 3 | 3 |
| Çankırı | - | 2 | - | Çankırı | - | 2 | 5 |
| Karaman | | | | Karaman | - | 3 | 6 |
| Sivas | | | | Sivas | | | |
| Konya | | | | Konya | | | |
| Yozgat | | | | Yozgat | | | |
| Toplam | 24 | 16 | 20 | Toplam | 1 | 22 | 35 |

Çizelge 4.22. Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın LSU gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı

| 2016 Yılı | | | | 2017 Yılı | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler | | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Grup 1 | 19 | - | 1 | Grup 1 | - | - | - |
| Grup 2 | 3 | - | 7 | Grup 2 | - | - | - |
| Grup 3 | 2 | - | - | Grup 3 | - | - | - |
| Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | | Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Kayseri | - | - | 5 | Kayseri | - | - | 3 |
| Kırıkkale | - | 3 | 2 | Kırıkkale | - | 1 | - |
| Kırşehir | - | 3 | 3 | Kırşehir | 2 | 2 | - |
| Nevşehir | - | 2 | 2 | Nevşehir | - | 3 | 4 |
| Aksaray | - | 1 | 1 | Aksaray | - | 4 | 4 |
| Ankara | - | 2 | 2 | Ankara | 1 | 9 | 3 |
| Eskişehir | - | 4 | 3 | Eskişehir | - | 3 | 3 |
| Çankırı | - | 2 | 2 | Çankırı | - | 2 | 6 |
| Sivas | | | | Sivas | | | |
| Konya | | | | Konya | | | |
| Yozgat | | | | Yozgat | | | |
| Toplam | 24 | 17 | 28 | Toplam | 3 | 24 | 23 |

Çizelge 4.23. Ön tanımlamaları yapılan 120 izolatın RPB2 gen bölgesi sekans sonuçlarının BLAST sorgulamasına göre gruplara dağılımı

| 2016 Yılı | | | | 2017 Yılı | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler | | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Grup 1 | 19 | - | 1 | Grup 1 | - | - | - |
| Grup 2 | 3 | - | 7 | Grup 2 | - | - | - |
| Grup 3 | 2 | - | - | Grup 3 | - | - | - |
| Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | | Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Kayseri | - | - | 4 | Kayseri | 0 | - | 3 |
| Kırıkkale | 2 | - | 3 | Kırıkkale | 0 | 1 | - |
| Kırşehir | 3 | - | 2 | Kırşehir | 3 | - | 1 |
| Nevşehir | 2 | - | 2 | Nevşehir | 3 | - | 2 |
| Aksaray | 2 | - | - | Aksaray | 3 | - | 2 |
| Ankara | 2 | - | - | Ankara | 4 | - | 5 |
| Eskişehir | 3 | - | 1 | Eskişehir | 2 | - | 4 |
| Çankırı | 2 | - | - | Çankırı | 3 | - | 7 |
| Karaman | | | | Karaman | 0 | - | 5 |
| Sivas | | | | Sivas | | | |
| Konya | | | | Konya | | | |
| Yozgat | | | | Yozgat | | | |
| Toplam | 40 | 0 | 20 | Toplam | 18 | 1 | 29 |

Çizelge 4.24. İzolatların tamamının MALDI-TOF MS analiz sonuçları doğrultusunda gruplara dağılımı

| 2016 Yılı | | | | 2017 Yılı | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler | | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Grup 1 | 19 | | 1 | Grup 1 | - | - | - |
| Grup 2 | 3 | | 7 | Grup 2 | - | - | - |
| Grup 3 | 3 | | 0 | Grup 3 | - | - | - |
| Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | | Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Kayseri | - | - | 1 | Kayseri | - | - | 1 |
| Kırıkkale | 2 | - | 3 | Kırıkkale | 2 | - | - |
| Kırşehir | 3 | - | 2 | Kırşehir | 3 | - | 2 |
| Nevşehir | 2 | - | - | Nevşehir | 3 | - | - |
| Aksaray | 1 | - | - | Aksaray | 3 | - | 2 |
| Ankara | 1 | - | - | Ankara | 7 | - | 3 |
| Eskişehir | 3 | - | 2 | Eskişehir | 3 | - | 2 |
| Çankırı | 2 | - | - | Çankırı | 4 | - | 3 |
| Karaman | | | | Karaman | 0 | - | 2 |
| Sivas | | | | Sivas | | | |
| Konya | | | | Konya | | | |
| Yozgat | | | | Yozgat | | | |
| Toplam | 39 | 0 | 16 | Toplam | 25 | 0 | 15 |

| 2018 Yılı | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------|--------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | Diğer Türler |
| Grup 1 | | | |
| Grup 2 | 31 | | 15 |
| Grup 3 | | | |
| Grup 4 (Şehirler) | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomycete sp.</i> | |
| Kayseri | 5 | - | 0 |

| | | | |
|---------------|-----------|----------|-----------|
| Kırıkkale | 6 | - | 1 |
| Kırşehir | 5 | - | 2 |
| Nevşehir | 4 | - | 2 |
| Aksaray | 3 | - | 0 |
| Ankara | 6 | - | 1 |
| Eskişehir | 3 | - | 1 |
| Çankırı | 3 | - | 1 |
| Karaman | 3 | - | 1 |
| Sivas | 3 | - | 1 |
| Konya | 3 | - | 0 |
| Yozgat | 7 | - | 1 |
| Toplam | 82 | 0 | 26 |

Ticari kaynaklardan (Grup 1), kültür koleksiyonlarından (Grup 2), üniversite araştırmacılarından (Grup 3 2016-2017-2018 yılları), İç Anadolu Bölgesi şehirlerinden (2016-2017-2018 yılları hasat döneminde) toplanan üzüm ve toprak örneklerinden (Grup 4) izole edilen suşların ön tanımlamaları (makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal) yollarla yapılmıştır. Yapılan kalsik ön tanımlamalar ve MALDI-TOF tanımlamaları ile *S. cerevisiae* türüne ait özellikler sergileyen 152 adet izolasyon belirlenmiştir. Belirlenen bu 152 izolasyondan 2016-2017 yıllarında elde edilen ve ön tanımlamalar ile *S. cerevisiae* olarak tanımlanan 120 izolasyon üzerinde moleküler tanımlama analizleri uygulanmıştır. Uygulanan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamaları sonucunda 120 adet izolasyonun 54 adedi *S. cerevisiae* türünden farklı türde mikroorganizma olarak belirlenmiş, 2 adedi tanımlanamamış, 64 adedi ise *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. Bütün bu tanımlama sonuçları ve 120 izolasyon üzerinde DNA barkodlarının belirleneceği üç farklı gen bölgesi (ITS, LSU, RPB2) sekans verilerinin NCBI (BLAST) sorgulama sonuçları da dikkate alınarak oluşturulacak filogenetik ilişki ve barkod değerlendirmeleri bu sonuçlar üzerinde yapılmıştır. Moleküler tanımlama amacıyla yapılan sorgulama sonuçları neticesinde ITS gen bölgesi sorgulamalarına göre 25 adet izolasyon *S. cerevisiae* türüne ait, 38 adet izolasyon *Saccharomyces sp.* ailesine ait, 2 adet izolasyonun sekans sorgulama sonucu elde edilememiş, geri kalanlar ise farklı cins mikro organizma gruplarına ait olarak tespit edilmiştir. LSU gen bölgesi sorgulamalarına göre 27 adet izolasyon *S. cerevisiae* türüne ait, 41 adet izolasyon *Saccharomyces sp.* ailesine ait, 1 adet izolasyonun sekans datası elde edilememiş, geri kalanlar ise farklı cins mikro organizma gruplarına ait olarak tespit edilmiştir. RPB2 gen bölgesi sorgulamalarına göre 58 adet izolasyon *S. cerevisiae* türüne ait, 1 adet izolasyon *Saccharomyces sp.* ailesine ait, 12 adet izolasyonun sekans datası elde edilememiş, geri kalanlar ise farklı cins mikro organizma gruplarına ait olarak tespit edilmiştir. Bütün bu moleküler ve MALDI-TOF MS analizlerinin sonuçları detaylı olarak yukarıda (Çizelge 4.23-4.26)'da verilmiştir. Yapılan

tanımlama yöntemleri karşılaştırıldığında bazı izolasyonlarda (örnek: izolasyon HUF17M3F21125 ITS gen bölgesi için *Metschnikowia pulcherrima*, LSU gen bölgesi için *Saccharomycete sp.* ve RPB2 gen bölgesinde sekans verisi yok veya *S. cerevisiae*) farklı gen bölgeleri için farklı sonuçlar vermiş olduğu gözlemlenmiştir. Bazı izolasyonlarda ITS veya LSU gen bölgesi sorgulamalarında *Metschnikowia* olarak sonuç elde edilirken aynı izolasyonlar RPB2 gen bölgesi sorgulamalarında *S. cerevisiae* olarak sonuç vermiştir. Bu tür durumlarda filogenetik karşılaştırma ve barkod analizine geçerken MALDI-TOF MS değerlendirmeleri de göz önüne alınarak devam edilmiştir. Tüm değerlendirmelerin ortak sonucu olarak 120 izolattan 64 tanesinin *S. cerevisiae* türüne ait olduğu sonucuna varılmıştır ve oluşturulan barkodlama değerlendirmeleri bu ortak değerlendirme sonucu dikkate alınarak yapılmıştır. Herbir gen bölgesinin filogenetik ilişkileri çıkarılırken kendi BLAST sorgulama sonucuna göre isimlendirilmiştir.

İzolasyonların sekans verileri ve barkod sekans verileri üzerinden oluşturulan filogenetik ağaçlar ayırım başarılarının değerlendirilmesi için temel oluşturmaktadır. Gen bölgelerine bağlı olarak izolasyon sekans verileri ve barkod sekans verilerinin ayırım başarıları değerlendirilirken türlerin hangi taksonlarda yer aldığı ve tür içi dağılımın kaynaklara göre ve yıllara göre hangi oranda ayrışım gösterdiği göz önünde bulundurulmuştur. Bu noktada DNA barkod yapılarının ortaya konmasında kullanılan 120 adet izolasyon üzerinde yapılan MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları da dikkate alınarak hangi taksonlarda yer aldıkları (Takson-1=*Saccharomycete sp.*, Takson-2=*S. cerevisiae*, Takson-3=*Cryptococcus sp.* vb.), sayıları, taksonomik grup kodları (A1, A2, B1,C1, D,E,F,G,H,J,K,L,M,O,P,R,S,T,U,V) ve gen bölgesine göre sayı bilgileri aşağıda (Çizelge 4.27) verilmiştir.

Çizelge 4.25. Elde edilen 120 izolasyonun moleküler ve MALDI-TOF MS tanımlamaları sonucunda yer aldıkları taksonomik sınıflar

| Taksonomik Grup | Taksonomik Grup Kodu | ITS (Adet) | LSU (Adet) | RPB2 (Adet) | MALDI-TOF (Adet) | Ortak Değerlendirme (Adet) |
|---------------------------------------|----------------------|------------|------------|-------------|------------------|----------------------------|
| Takson-1 <i>Saccharomycete sp.</i> | (A1) | 38 | 41 | 1 | 0 | 1 |
| Takson-2 <i>S. cerevisiae</i> | (A2) | 25 | 27 | 58 | 63 | 64 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|------|----|----|----|----|----|
| Takson-3 <i>Cryptococcus sp.</i> | (B1) | 5 | 7 | 6 | 0 | 4 |
| Takson-4 <i>Nagenishia sp.</i> | (C1) | 8 | 6 | 3 | 0 | 7 |
| Takson-5 <i>Pichia sp.</i> | D | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 |
| Takson-6 <i>Candida sp.</i> | (E) | 6 | 5 | 5 | 27 | 8 |
| Takson-7 <i>Wickehamomyces sp.</i> | (F) | 4 | 4 | 2 | 0 | 4 |
| Takson-8 <i>Metchnikowia sp.</i> | (G) | 21 | 17 | 24 | 0 | 17 |
| Takson-9 <i>Hanseniaspora sp.</i> | (H) | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 |
| <i>Yarrowia sp.</i> | (J) | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Solicoccozyma sp.</i> | (K) | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Kluyveromyces sp.</i> | (L) | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Burkholderia sp.</i> | (M) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Kloeckera sp.</i> | (O) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Priceomyces sp.</i> | (P) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Peanibacillus sp.</i> | (R) | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Burkholderia sp.</i> | (S) | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Aurobasidium sp.</i> | (T) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Tanulanamayan</i> | (U) | 0 | 0 | 0 | 26 | 2 |
| <i>Sekans yok</i> | (V) | 2 | 1 | 12 | - | - |

DNA barkod yapılarının ortaya konmasında kullanılan 120 adet izolasyonun hangi kaynaklardan (T=ticari, CC=kültür koleksiyonu, UÜA=Ulusal üniversite araştırmacıları, İ-KAY-16=Kayseri ili 2016 yılı izolasyonu, İ-KAY-17=Kayseri ili 2017 izolasyonu, İ-ANK-16=Ankara ili 2016 izolasyonu, İ-ANK-17=Ankara ili 2017 izolasyonu vb.) geldiği, kaynak grubu kodları, hangi taksonlarda yer aldıkları, taksonomik grup kodları (Takson-1(A2)=*Saccharomycete sp.*, Takson-2(A2)=*S. cerevisiae*, Takson-3(B1)=*Cryptococcus sp.*, Takson-4(C1)=*Nagenishia sp.*, Takson-5(D)=*Pichia sp.*, Takson-6(E)=*Candida sp.*, Takson-7(F)=*Wickehamomyces sp.*, Takson-8(G)=*Metchnikowia sp.*, Takson-9(H)=*Hanseniaspora sp.*, vb.), izolasyonun ID bilgisi, örnek numarası aşağıda (Çizelge 4.28) verilmiştir.

Çizelge 4.26. Elde edilen 120 izolasyonun dağılım grafiklerinde kullanılan kodlamaları

| Sıra No | Örnek Numarası | İzolasyon ID | Taksonomik Grup Kodu | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu |
|---------|----------------|---------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | HUF16M0T10001 | A2 | T |
| 2 | 2 | HUF16M0T10002 | A2 | T |
| 3 | 3 | HUF16M0T10003 | A2 | T |
| 4 | 4 | HUF16M0T10004 | E | T |
| 5 | 5 | HUF16M0T10005 | A2 | T |
| 6 | 6 | HUF16M0T10006 | A2 | T |
| 7 | 7 | HUF16M0T10007 | A2 | T |
| 8 | 8 | HUF16M0T10008 | A2 | T |
| 9 | 9 | HUF16M0T10009 | A2 | T |
| 10 | 10 | HUF16M0T10010 | A2 | T |
| 11 | 11 | HUF16M0T10011 | A2 | T |
| 12 | 12 | HUF16M0T10012 | A2 | T |
| 13 | 13 | HUF16M0T10013 | A2 | T |
| 14 | 14 | HUF16M0T10014 | A2 | T |
| 15 | 15 | HUF16M0T10016 | A2 | T |
| 16 | 16 | HUF16M0T10017 | A2 | T |
| 17 | 17 | HUF16M0T10018 | A2 | T |
| 18 | 18 | HUF16M0T10019 | A2 | T |
| 19 | 19 | HUF16M1C0001 | A2 | CC |
| 20 | 20 | HUF16M1C0002 | A2 | CC |
| 21 | 21 | HUF16M1C0003 | A2 | CC |
| 22 | 22 | HUF16M1C0004 | A2 | T |
| 23 | 23 | HUF16M2K10001 | F | UÜA |
| 24 | 24 | HUF16M2K10003 | F | UÜA |
| 25 | 25 | HUF16M2K10004 | A2 | UÜA |
| 26 | 26 | HUF16M2K10005 | E | UÜA |
| 27 | 27 | HUF16M2K10006 | A2 | UÜA |
| 28 | 28 | HUF16M2K10007 | A2 | UÜA |
| 29 | 29 | HUF16M2K10009 | F | UÜA |
| 30 | 30 | HUF16M2K10010 | F | UÜA |
| 31 | 31 | HUF16M2K10011 | J | UÜA |
| 32 | 32 | HUF16M2K10015 | E | UÜA |
| 33 | 33 | HUF16M3A11002 | E | İ-KAY-16 |
| 34 | 34 | HUF16M3A11003 | H | İ-KAY-16 |
| 35 | 35 | HUF16M3A12012 | B1 | İ-KAY-16 |
| 36 | 36 | HUF16M3A12013 | B1 | İ-KAY-16 |
| 37 | 37 | HUF16M3A12014 | C1 | İ-KAY-16 |
| 38 | 38 | HUF16M3B11016 | E | İ-KIRK-16 |
| 39 | 39 | HUF16M3B11017 | A2 | İ-KIRK-16 |

| | | | | |
|----|----|---------------|-----------|-----------|
| 40 | 40 | HUF16M3B11020 | <i>G</i> | İ-KIRK-16 |
| 41 | 41 | HUF16M3B11021 | <i>A2</i> | İ-KIRK-16 |
| 42 | 42 | HUF16M3B11023 | <i>G</i> | İ-KIRK-16 |
| 43 | 43 | HUF16M3C11031 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-16 |
| 44 | 44 | HUF16M3C11032 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-16 |
| 45 | 45 | HUF16M3C11033 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-16 |
| 46 | 46 | HUF16M3C11034 | <i>G</i> | İ-KIRŞ-16 |
| 47 | 47 | HUF16M3C12041 | <i>K</i> | İ-KIRŞ-16 |
| 48 | 48 | HUF16M3D11047 | <i>A2</i> | İ-NEVŞ-16 |
| 49 | 49 | HUF16M3D11048 | <i>A2</i> | İ-NEVŞ-16 |
| 50 | 50 | HUF16M3D11049 | <i>G</i> | İ-NEVŞ-16 |
| 51 | 51 | HUF16M3D11052 | <i>G</i> | İ-NEVŞ-16 |
| 52 | 52 | HUF16M3E11059 | <i>A2</i> | İ-AKS-16 |
| 53 | 53 | HUF16M3F11076 | <i>A2</i> | İ-ANK-16 |
| 54 | 54 | HUF16M3F11078 | <i>A2</i> | İ-ANK-16 |
| 55 | 55 | HUF16M3G11085 | <i>A2</i> | İ-ESK-16 |
| 56 | 56 | HUF16M3G11086 | <i>A2</i> | İ-ESK-17 |
| 57 | 57 | HUF16M3G11088 | <i>A2</i> | İ-ESK-17 |
| 58 | 58 | HUF16M3G11089 | <i>G</i> | İ-ESK-17 |
| 59 | 59 | HUF16M3H11101 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-16 |
| 60 | 60 | HUF16M3H11104 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-16 |
| 61 | 61 | HUF17M3A21001 | <i>D</i> | İ-KAY-17 |
| 62 | 62 | HUF17M3A31013 | <i>D</i> | İ-KAY-17 |
| 63 | 63 | HUF17M3A32019 | <i>D</i> | İ-KAY-17 |
| 64 | 64 | HUF17M3B32047 | <i>A2</i> | İ-KIRK-17 |
| 65 | 65 | HUF17M3C21050 | <i>G</i> | İ-KIRŞ-17 |
| 66 | 66 | HUF17M3C31063 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-17 |
| 67 | 67 | HUF17M3C31064 | <i>G</i> | İ-KIRŞ-17 |
| 68 | 68 | HUF17M3C31065 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-17 |
| 69 | 69 | HUF17M3C31066 | <i>A2</i> | İ-KIRŞ-17 |
| 70 | 70 | HUF17M3D31086 | <i>A2</i> | İ-NEV-17 |
| 71 | 71 | HUF17M3D31087 | <i>B1</i> | İ-NEV-17 |
| 72 | 72 | HUF17M3D31088 | <i>A2</i> | İ-NEV-17 |
| 73 | 73 | HUF17M3D31089 | <i>A2</i> | İ-NEV-17 |
| 74 | 74 | HUF17M3D31090 | <i>G</i> | İ-NEV-17 |
| 75 | 75 | HUF17M3D32092 | <i>C1</i> | İ-NEV-17 |
| 76 | 76 | HUF17M3D32093 | <i>C1</i> | İ-NEV-17 |
| 77 | 77 | HUF17M3D32096 | <i>C1</i> | İ-NEV-17 |
| 78 | 78 | HUF17M3E21109 | <i>C1</i> | İ-AKS-17 |
| 79 | 79 | HUF17M3E21110 | <i>C1</i> | İ-AKS-17 |
| 80 | 80 | HUF17M3E21112 | <i>A2</i> | İ-AKS-17 |
| 81 | 81 | HUF17M3E21113 | <i>A2</i> | İ-AKS-17 |
| 82 | 82 | HUF17M3E21114 | <i>A2</i> | İ-AKS-17 |

| | | | | |
|-----|-----|---------------|-----------|-----------|
| 83 | 83 | HUF17M3E21115 | <i>G</i> | İ-AKS-17 |
| 84 | 84 | HUF17M3E22117 | <i>G</i> | İ-AKS-17 |
| 85 | 85 | HUF17M3F21122 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 86 | 86 | HUF17M3F21123 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 87 | 87 | HUF17M3F21124 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 88 | 88 | HUF17M3F21125 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 89 | 89 | HUF17M3F21126 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 90 | 90 | HUF17M3F21127 | <i>G</i> | İ-ANK-17 |
| 91 | 91 | HUF17M3F21128 | <i>U</i> | İ-ANK-17 |
| 92 | 92 | HUF17M3F21134 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 93 | 93 | HUF17M3F31135 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 94 | 94 | HUF17M3F31136 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 95 | 95 | HUF17M3F31139 | <i>H</i> | İ-ANK-17 |
| 96 | 96 | HUF17M3F32141 | <i>H</i> | İ-ANK-17 |
| 97 | 97 | HUF17M3F32146 | <i>A2</i> | İ-ANK-17 |
| 98 | 98 | HUF17M3G31147 | <i>AI</i> | İ-ESK-17 |
| 99 | 99 | HUF17M3G31150 | <i>AI</i> | İ-ESK-17 |
| 100 | 100 | HUF17M3G31151 | <i>AI</i> | İ-ESK-17 |
| 101 | 101 | HUF17M3G31152 | <i>G</i> | İ-ESK-17 |
| 102 | 102 | HUF17M3G32153 | <i>E</i> | İ-ESK-17 |
| 103 | 103 | HUF17M3G32157 | <i>A2</i> | İ-ESK-17 |
| 104 | 104 | HUF17M3H21173 | <i>H</i> | İ-ÇANK-17 |
| 105 | 105 | HUF17M3H21174 | <i>AI</i> | İ-ÇANK-17 |
| 106 | 106 | HUF17M3H21175 | <i>G</i> | İ-ÇANK-17 |
| 107 | 107 | HUF17M3H22179 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-17 |
| 108 | 108 | HUF17M3H22180 | <i>R</i> | İ-ÇANK-17 |
| 109 | 109 | HUF17M3H22182 | <i>S</i> | İ-KARM-17 |
| 110 | 110 | HUF17M3H31185 | <i>D</i> | İ-KARM-17 |
| 111 | 111 | HUF17M3H32189 | <i>CI</i> | İ-KARM-17 |
| 112 | 112 | HUF17M3H21196 | <i>L</i> | İ-ÇANK-17 |
| 113 | 113 | HUF17M3H21197 | <i>BI</i> | İ-ÇANK-17 |
| 114 | 114 | HUF17M3H21199 | <i>E</i> | İ-ÇANK-17 |
| 115 | 115 | HUF17M3H21200 | <i>E</i> | İ-ÇANK-17 |
| 116 | 116 | HUF17M3H21208 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-17 |
| 117 | 117 | HUF17M3H21209 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-17 |
| 118 | 118 | HUF17M3H21210 | <i>A2</i> | İ-ÇANK-17 |
| 119 | 119 | HUF17M3H21212 | <i>E</i> | İ-ÇANK-17 |
| 120 | 120 | HUF17M3H22218 | <i>U</i> | İ-KARM-17 |

DNA barkodlarının ortaya konulmasında kullanılmış olan 120 izolatın tamamının yıllara ve kaynaklarına göre dağılımını veren özet tablo aşağıda (Çizelge 4.29'da) verilmiştir.

Çizelge 4.27. DNA barkodlamada kullanılan izolasyonların izolasyon kaynakları ve yıllarına göre dağılımları

| İzolasyon Kaynağı | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu | Tüm Şuşlar Sayı (adet) (2016) | Tüm Şuşlar Sayı (adet) (2017) | Toplam (2016+2017) | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Ticari Maya Üreticileri | T | 19 | 0 | 19 | |
| Kültür Koleksiyonları | CC | 3 | 0 | 3 | |
| Ulusal Üniversite Araştırmacıları | UÜA | 10 | 0 | 10 | |
| İzolasyon kaynağı | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu (2016) | Sayı (adet) (2016) | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu (2017) | Sayı (adet) (2017) | Toplam (2016+2017) |
| Kayseri | İ-KAY-16 | 5 | İ-KAY-17 | 3 | 8 |
| Kırıkkale | İ-KIRK-16 | 5 | İ-KIRK-17 | 1 | 6 |
| Kırşehir | İ-KIRŞ-16 | 5 | İ-KIRŞ-17 | 5 | 10 |
| Nevşehir | İ-NEVŞ-16 | 4 | İ-NEVŞ-17 | 8 | 12 |
| Aksaray | İ-AKS-16 | 1 | İ-AKS-17 | 7 | 8 |
| Ankara | İ-ANK-16 | 2 | İ-ANK-17 | 13 | 15 |
| Eskişehir | İ-ESK-16 | 4 | İ-ESK-17 | 6 | 10 |
| Çankırı | İ-ÇANK-16 | 2 | İ-ÇANK-17 | 13 | 15 |
| Karaman | İ-KARM-16 | 0 | İ-KARM-17 | 4 | 4 |
| Sivas | İ-SİV-16 | 0 | İ-SİV-17 | 0 | 0 |
| Konya | İ-KON-16 | 0 | İ-KON-17 | 0 | 0 |
| Yozgat | İ-YOZ-16 | 0 | İ-YOZ-17 | 0 | 0 |

DNA barkodlarının ortaya konulmasında kullanılmış olan 120 izolattan *S.cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların yıllara ve kaynaklarına göre dağılımını veren özet tablo aşağıda (Çizelge 4.30 ‘da) verilmiştir.

Çizelge 4.28. DNA barkodlamada kullanılan *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların izolasyon kaynakları ve yıllarına göre dağılımları

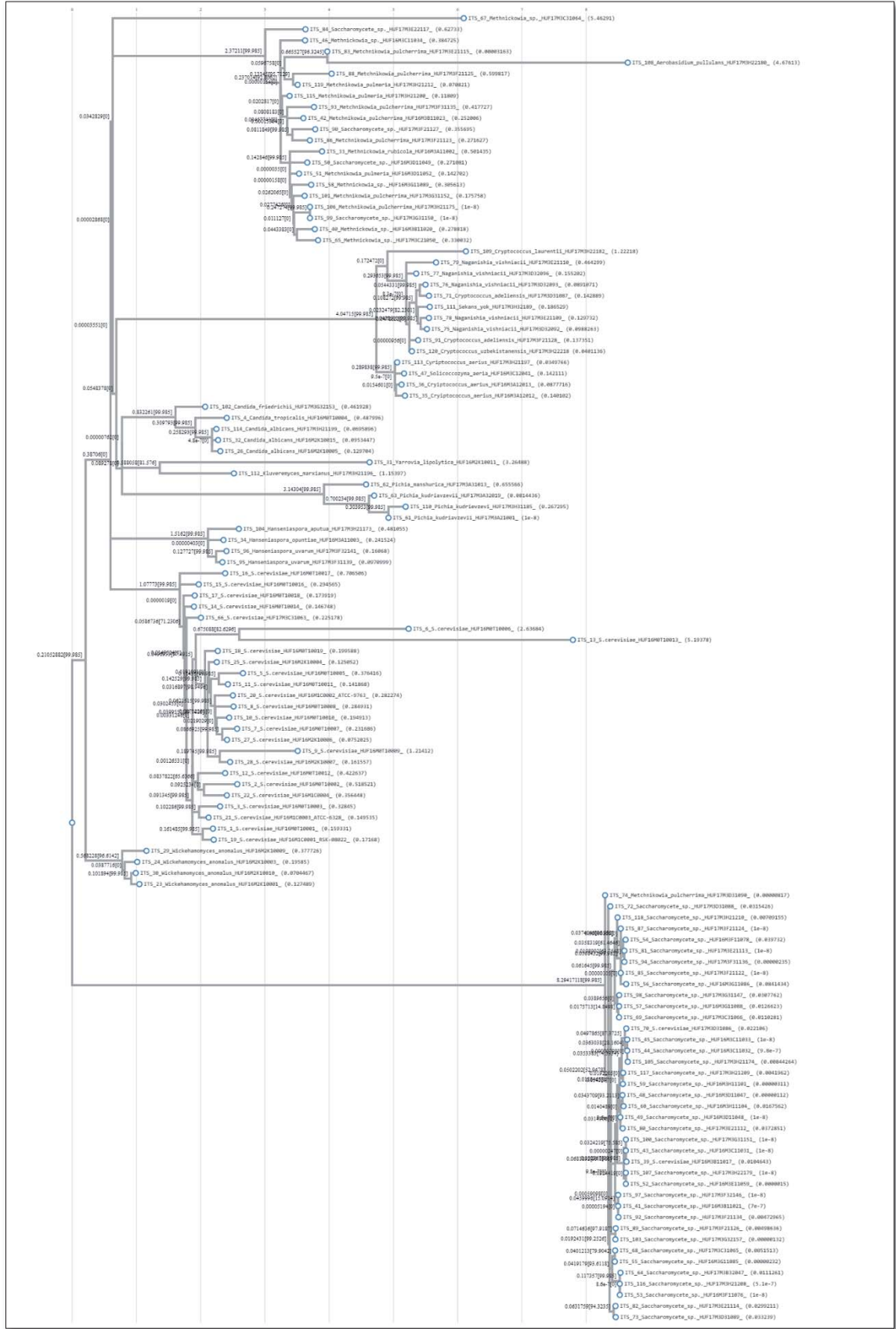
| İzolasyon Kaynağı | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu | <i>S. cerevisiae</i> Sayı Adet (2016) | <i>S. cerevisiae</i> Sayı Adet (2017) | Toplam (2016+2017) |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Ticari Maya Üreticileri | T | 19 | 0 | 19 |
| Kültür Koleksiyonları | CC | 3 | 0 | 3 |

| Üniversite Araştırmacıları | UÜA | | 3 | 0 | 3 |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| İzolasyon Kaynağı | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu (2016) | <i>S. cerevisiae</i> Sayı Adet (2016) | İzolasyon Kaynağı Grup Kodu (2017) | <i>S. cerevisiae</i> Sayı Adet (2017) | Toplam (2016+2017) |
| Kayseri | İ-KAY-16 | 0 | İ-KAY-17 | 0 | 0 |
| Kırıkkale | İ-KIRK-16 | 2 | İ-KIRK-17 | 1 | 3 |
| Kırşehir | İ-KIRŞ-16 | 3 | İ-KIRŞ-17 | 3 | 6 |
| Nevşehir | İ-NEVŞ-16 | 2 | İ-NEVŞ-17 | 3 | 5 |
| Aksaray | İ-AKS-16 | 1 | İ-AKS-17 | 3 | 4 |
| Ankara | İ-ANK-16 | 2 | İ-ANK-17 | 8 | 10 |
| Eskişehir | İ-ESK-16 | 3 | İ-ESK-17 | 2 | 5 |
| Çankırı | İ-ÇANK-16 | 2 | İ-ÇANK-17 | 4 | 6 |
| Karaman | İ-KARM-16 | 0 | İ-KARM-17 | 0 | 0 |
| Sivas | İ-SİV-16 | 0 | İ-SİV-17 | 0 | 0 |
| Konya | İ-KON-16 | 0 | İ-KON-17 | 0 | 0 |
| Yozgat | İ-YOZ-16 | 0 | İ-YOZ-17 | 0 | 0 |

NCBI veri tabanı üzerinde yapılan gen bölgeleri sekans sorgulamaları sonrasında MALDI-TOF MS tanımlamaları ve moleküler tanımlamaları yapılmış olan suşların türler arası yakınlık uzaklık ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla elde edilen sekans verileri üzerinden CLUSTALW programından filogenetik ilişki ağaçları ortaya konmuştur. Herbir gen bölgesi için barkod yapısı olarak kullanılacak sekans bölgelerinin belirlenmesi ve karşılaştırmaların yapılması için MEME yazılımı kullanılarak elde edilen motifler üzerinden filogenetik ağaç oluşturma işlemleride CLUSTALW programı kullanılarak ortaya konmuştur. Ayrıca elde edilen filogenetik ağaçlardan türlerin birbirlerine olan uzaklık verileri XLSAT programı kullanılarak çok boyutlu ölçeklendirmeye tabi tutularak x-y düzleminde uzaklık dağılımını veren grafiklerle de özetlenmiştir. Elde edilen dağılım grafikleri filogenetik ilişki ağaçlarına ek olarak aşağıda (Şekil 4.13., Şekil 4.15., Şekil 4.17., Şekil 4.19., Şekil 4.21., Şekil 4.23., Şekil 4.27., Şekil 4.29., Şekil 4.31., Şekil 4.33., Şekil 4.35., Şekil 4.37., Şekil 4.39., Şekil 4.41., Şekil 4.43.)’de verilmiştir. Her bir gen bölgesi izolasyon sekansları ve barkod sekanslarına ait ayırım başarı sonuçlar özetlemiş olarak aşağıda (Çizelge 4.32. - Çizelge 4.33.)’de verilmiştir. İzolasyonların tamamı için ve *S. cerevisiae* olarak belirlenen izolasyonlar için her bir gen bölgesi ve barkod bölgeleri için elde edilen filogenetik ağaçlar aşağıda (Şekil 4.12., Şekil 4.14., Şekil 4.16., Şekil 4.18., Şekil 4.20., Şekil 4.22., Şekil 4.24., Şekil 4.26., Şekil 4.28., Şekil 4.30., Şekil 4.32., Şekil 4.34., Şekil 4.36., Şekil 4.38., Şekil 4.40., Şekil 4.42.)’de verilmiştir. Elde edilen filogenetik ağaçlarda örneklerin tamamının birbiriyle karşılaştırılması, taksonların

birbirleriyle karşılaştırılması, izolasyon kaynaklarına göre (Grup 1- Grup 2- Grup 3- Grup 4), izolasyon yıllarına göre (2016-2017) ve coğrafik konumlarına göre karşılaştırılmaları yapıp değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca moleküler ve MALDI-TOF MS tanımlamalarına göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların tür içinde karşılaştırılmaları yapılmıştır. Elde edilen filogenetik ağaçlar ortaya konulan barkod sekanslarının değerlendirilmesi için yol gösterici olduğundan oldukça önemlidir.

İzolatlara ait gen bölgelerinin filogenetik ağaçları oluşturulurken her bir gen bölgesi için (ITS, LSU, RPB2) izolatların tamamı ve *S. cerevisiae* olarak tanımlananlar için ayrı ayrı değerlendirmeler (Örnek: Şekil 4.12 izolasyonların tamamının (120 izolat) ITS gen bölgesi filogenetik ağacı, Şekil 4.16 *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların ITS gen bölgesi filogenetik ağacı, ve Şekil 4.14 izolasyonların tamamının (120 izolat) ITS gen barkod sekanslarının filogenetik ağacı, Şekil 4.18 *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların ITS gen bölgesi barkod sekanslarının filogenetik ağacı) yapılmıştır. Elde edilen 120 izolata ait sekans verileri ve MEME programı kullanılarak elde edilen barkod sekans verileri üzerinden ClustalW programı ile elde edilen filogenetik ağaçların başarılı ayırım yapma konusundaki değerlendirmeleri aşağıda özetlendiği şekilde bulgulanmıştır.



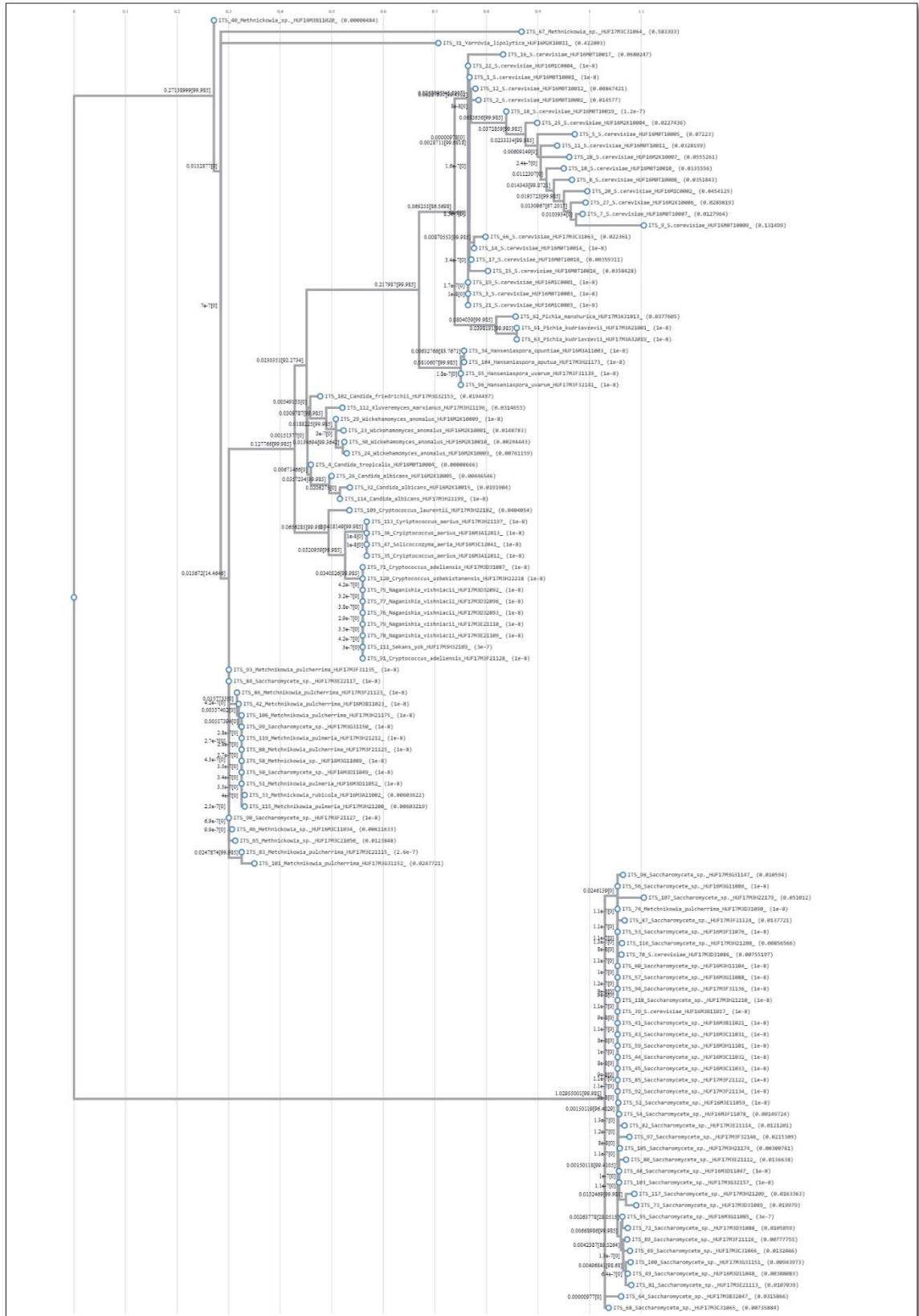
Şekil 4.12. Kullanılan 120 izolatin ITS gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



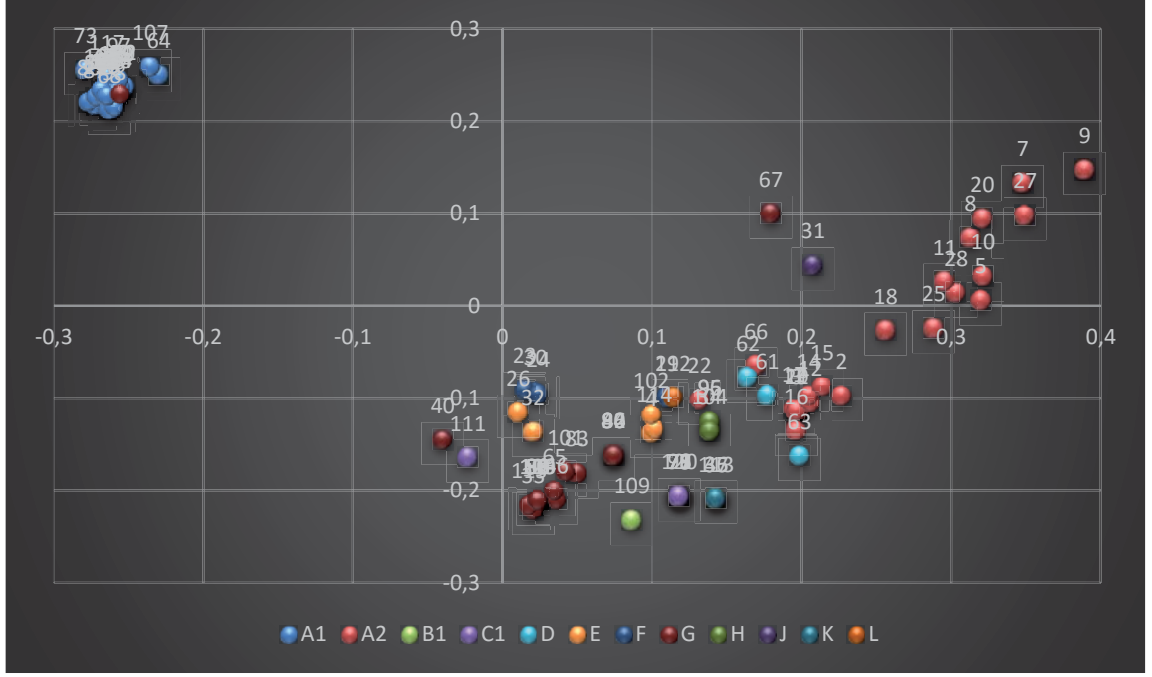
Şekil 4.13. Kullanılan 120 izolatın ITS gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

ITS gen bölgesi için izolatların tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.12) değerlendirmesinde, 118 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alınmış görülmektedir. İki adet ((HUF16M3A12014 (*Nagenishia visniacii*), HUF16M3B11016 (*Candida pucherrima*)) izolasyona ait ITS gen bölgesi sekans verisi olmadığından değerlendirmeye alınmamıştır. İzolasyonların tamamının ITS gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 11 adet ana dal 83 adet uç dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise HUF17M3D31090 kodlu *Metschnikowia* izolasyonunun *Saccharomycete sp.* grubu içerisinde yer aldığı, bazı *Cyriptococcus* türlerinin *Naganishia* türlerine ait grupların içerisinde yer aldığı, HUF17M3H22180 kodlu *Candida raillenensis* HUF16M2K10011 kodlu *Yarrowia lipolytica* ve HUF17M3H21196 kodlu *Kluyveromyces marxianus* türlerinin aynı alt dallanmada yer aldığı gözlemlenmiştir. İzolatların tamamının ITS gen bölgesi türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise filogenetik gruplandırmanın PCR jel görüntülerinden elde edilen sonuçlara benzer bir şekilde gruplara dağılımın gösterdiği gözlemlenmektedir. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 3 adet ana

grup dallanma ve 13 adet alt uç grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. ITS gen bölgesi için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filegenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar (Takson-1, Takson-2, Takson-3, Takson-4, Takson-5, Takson-6, Takson-7, Takson-8, Takson-9) açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım başarısı açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-6'da (0.295 ± 0.008) en küçük Takson-1'de (0.0010 ± 0.001) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-1 ile Takson-5 arasında (0.641 ± 0.019) en küçük farklılık ise Takson-7 ile Takson-6 arasında (0.393 ± 0.015) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.214 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.459 ± 0.008 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.245 ± 0.008 olarak bulunmuştur. ITS gen bölgesi için ayırışma katsayısı ise 0.533 ± 0.011 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.13) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.



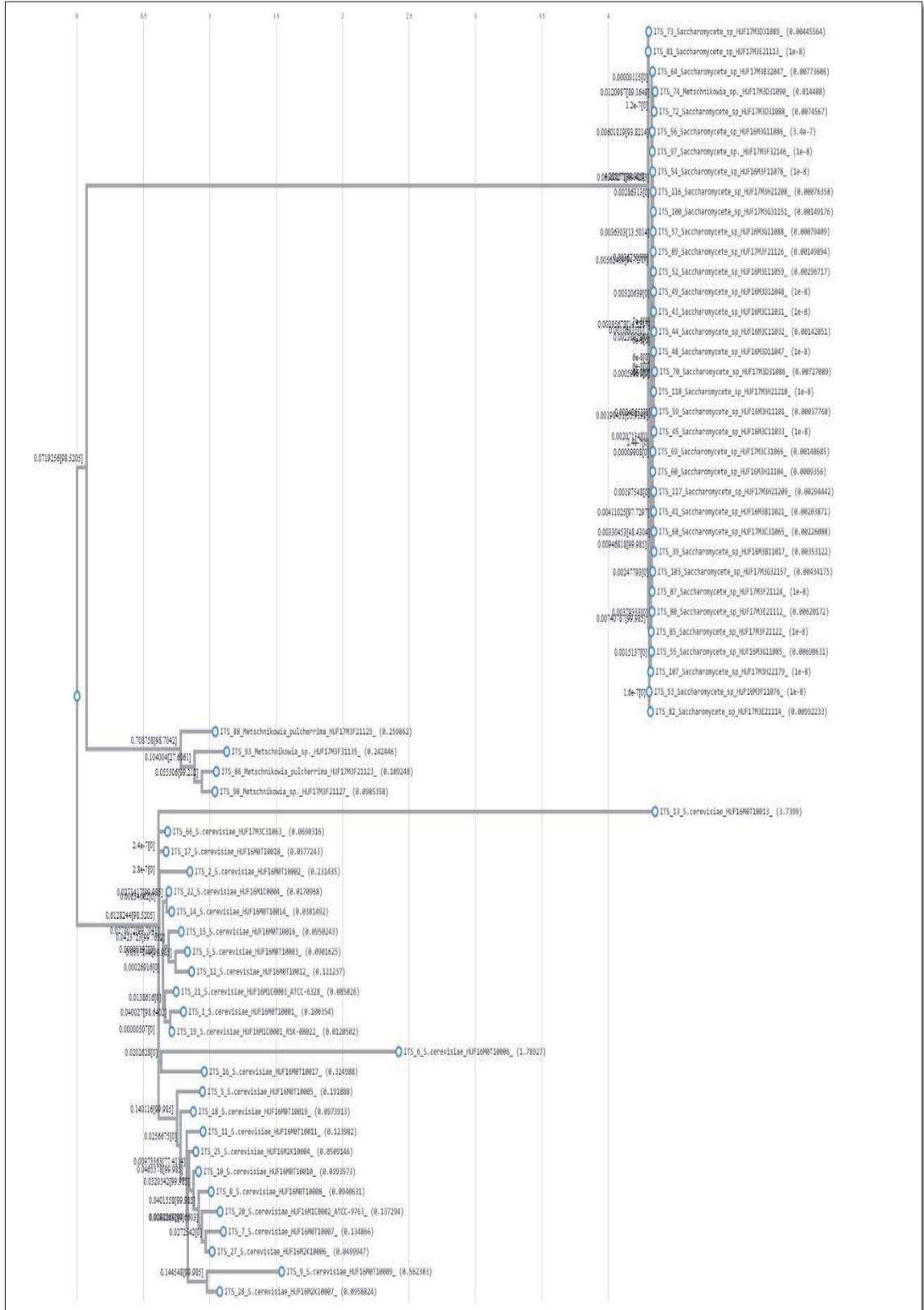
Şekil 4.14. Kullanılan 120 izolatin MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu



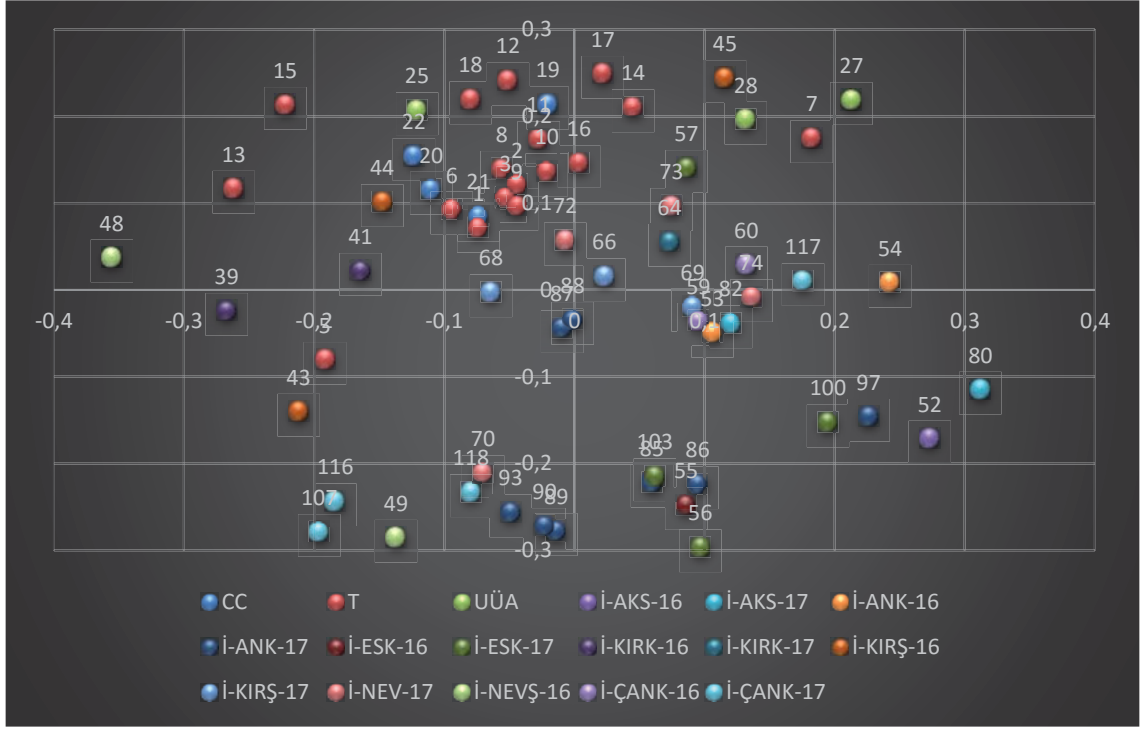
Şekil 4.15. Kullanılan 120 izolatin MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MEME suit yazılımı kullanılarak borkod yapısı olarak kullanılacak ayırım sağlayıcı motif bölgeleri elde edilmiştir. ITS gen bölgesi MEME barkodları için izolatların tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.14) değerlendirmesinde, 114 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alınmıştır. İki ITS bölgesi için sekans verisi bulunmayan geriye kalan dördü ise motif yapısı elde edilemeyen ((HUF16M3A12014 (*Nagenishia visniacii*), HUF16M3B11016 (*Candida pucherrima*), HUF16M0T10013-(*S. cerevisiae*), HUF17M3F32141-(*Hanseniaspora uvarum*), HUF17M3H22180-(*Candida raillenensis*), HUF17M3H31185-(*Pichia kudrievzevi*))) altı adet izolat değerlendirmeye alınamamıştır. İki adet izolasyona (HUF16M3A12014 (*Nagenishia visniacii*), HUF16M3B11016 (*Candida pucherrima*), ait ITS gen bölgesi sekans verisi olmadığından değerlendirmeye alınmamıştır. İzolasyonların tamamının ITS gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 21 adet ana dal 83 adet uç dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise HUF17M3G32153 kodlu *Candida* türü ile HUF17M3H21196 *Kluyveromyces* türünün *Wickehamomyces* türleri içerisinde yer aldığı, bazı *Cyriptococcus* türlerinin *Naganishia* türlerine ait grupların içerisinde yer aldığı, HUF16M3C12041 kodlu *Solicoccozyma* türünün HUF16M3A12012 kodlu *Cryptococcus*

türü ile aynı dallanmada yer aldığı gözlemlenmiştir. MEME suit ile elde edilen izolatların tamamının ITS gen bölgesi barkod yapıları ile elde edilen türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise filogenetik gruplandırmanın PCR jel görüntülerinden elde edilen sonuçlara benzer bir şekilde gruplara dağılımın gösterdiği gözlemlenmektedir. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 14 adet ana grup dallanma ve 21 adet uç grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. Barkod yapıları kullanılarak elde edilen genel ağaçta (Şekil 4.14) *S. cerevisiae* türlerine ait izolatların ayrımı, sadece *S.cerevisia* türleri DNA barkodları için oluşturulan ayırım ağacı (Şekil 4.18) ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. ITS gen bölgesi barkod yapıları ile izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filegenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım başarısı açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-6'da (0.295 ± 0.008) en küçük Takson-1'de (0.0010 ± 0.001) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-1 ile Takson-5 arasında (0.641 ± 0.019) en küçük farklılık ise Takson-7 ile Takson-6 arasında (0.393 ± 0.015) bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.214 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.459 ± 0.008 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.245 ± 0.008 olarak bulunmuştur. ITS barkod gen bölgesi için ayrışma katsayısı ise 0.533 ± 0.011 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.15) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.

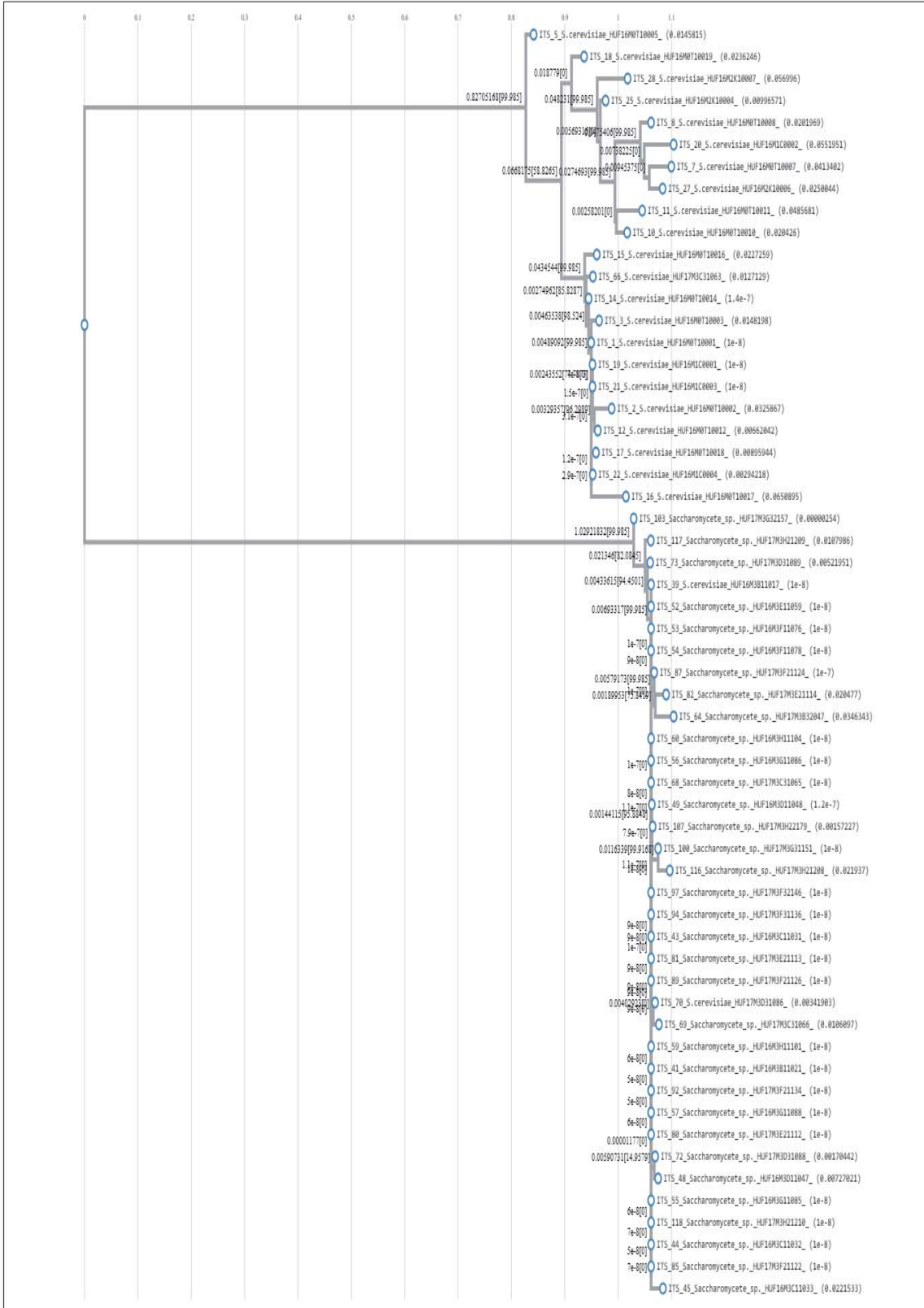


Şekil 4.16. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların ITS gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu

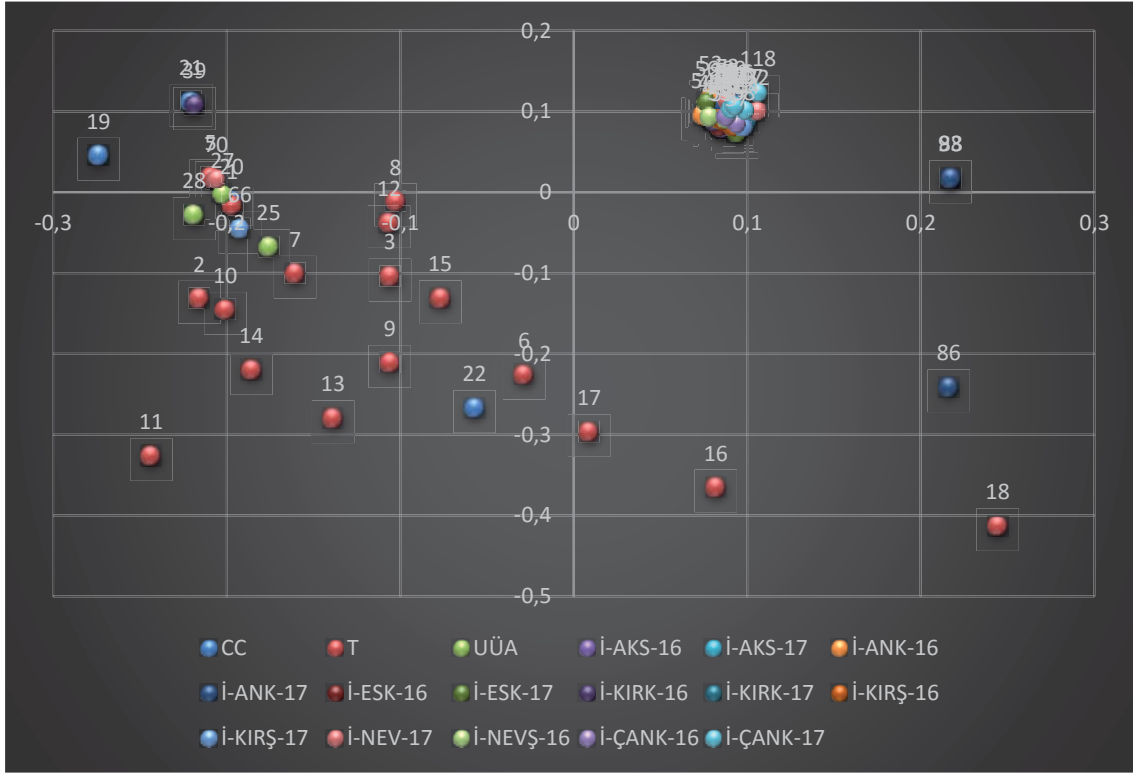


Şekil 4.17. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların ITS gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) tek başına değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.16) filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların tamamının (64 adet) değerlendirilmeye alındığı görülmektedir. *S. cerevisiae* izolatlarının sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların ITS gen bölgesine göre 3 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 3 ana grubun 43 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. ITS gen bölgesi moleküler taramasında *Saccharomycete sp.* ve *Metshnickowia sp.* olarak tanımlanan türlerin ayrışım gösterdiği gözlemlenmiştir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.17) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımda anlamlı bir homojenlik gözlemlenmemiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.



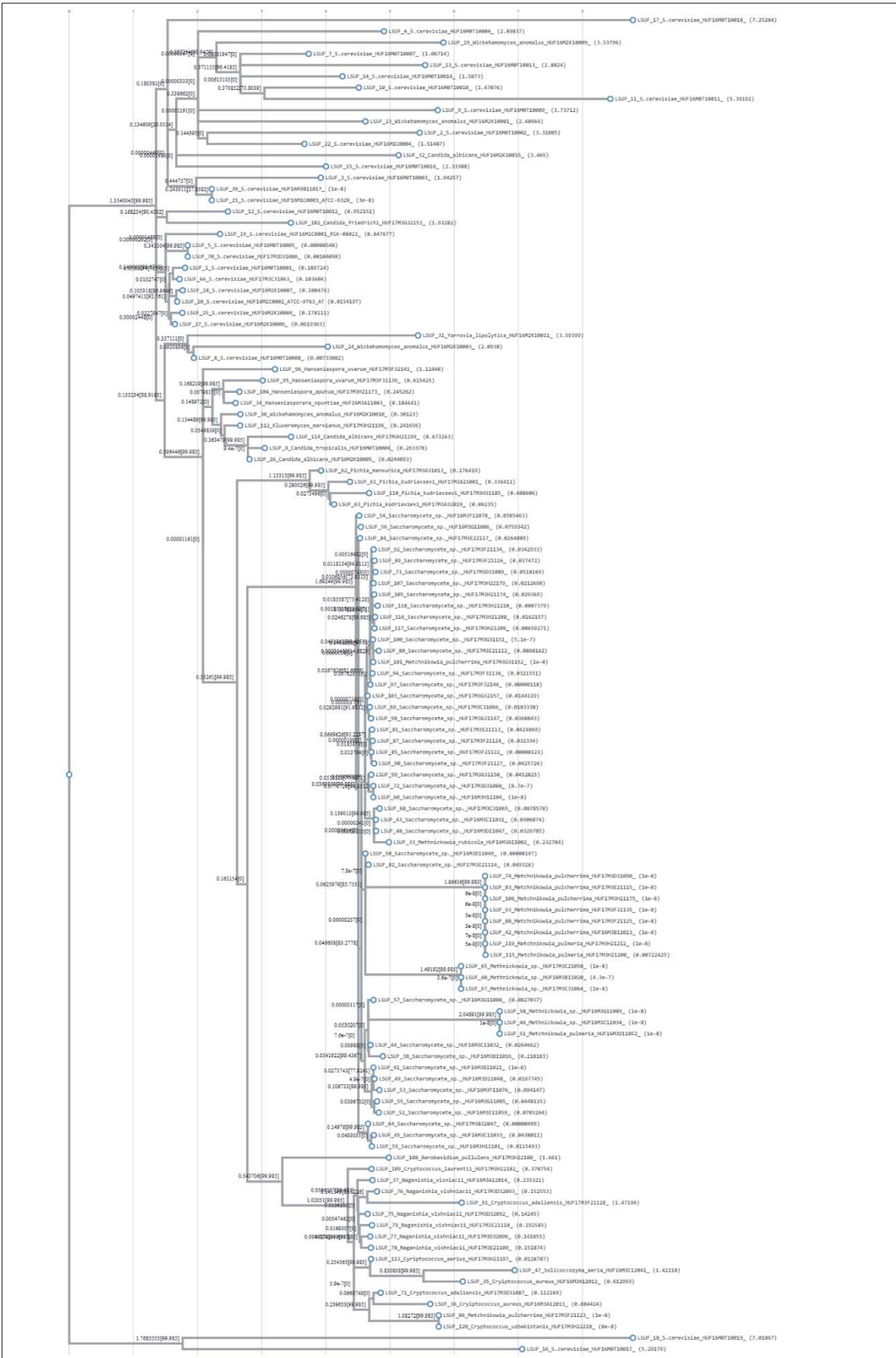
Şekil 4.18. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu



Şekil 4.19. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak ITS gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) barkod yapılarının tek başına değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.18) filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların 60 tanesinin değerlendirilmeye alındığı görülmektedir. Değerlendirmeye alınmayan dört adet (HUF16M0T10006-(*S. cerevisiae*), HUF16M0T10013-(*S. cerevisiae*), HUF17M3F21123-(*Metchnikowia pulcherrima*), HUF17M3F31135-(*Metchnikowia sp.*)) izolasyonun motif yapıları elde edilememiştir. *S. cerevisiae* izolatlarının barkod sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların ITS gen bölgesi tanımlamalarına göre *S. cerevisiae* ve *Saccharomycete sp.* olmak üzere 2 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 2 ana grubun 49 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. *Saccharomycete sp.* grubu ile *S. cerevisiae* grubunun iki ana grubu oluşturduğu gözlemlenmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.19) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı

kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ve bunlara ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenmemiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.



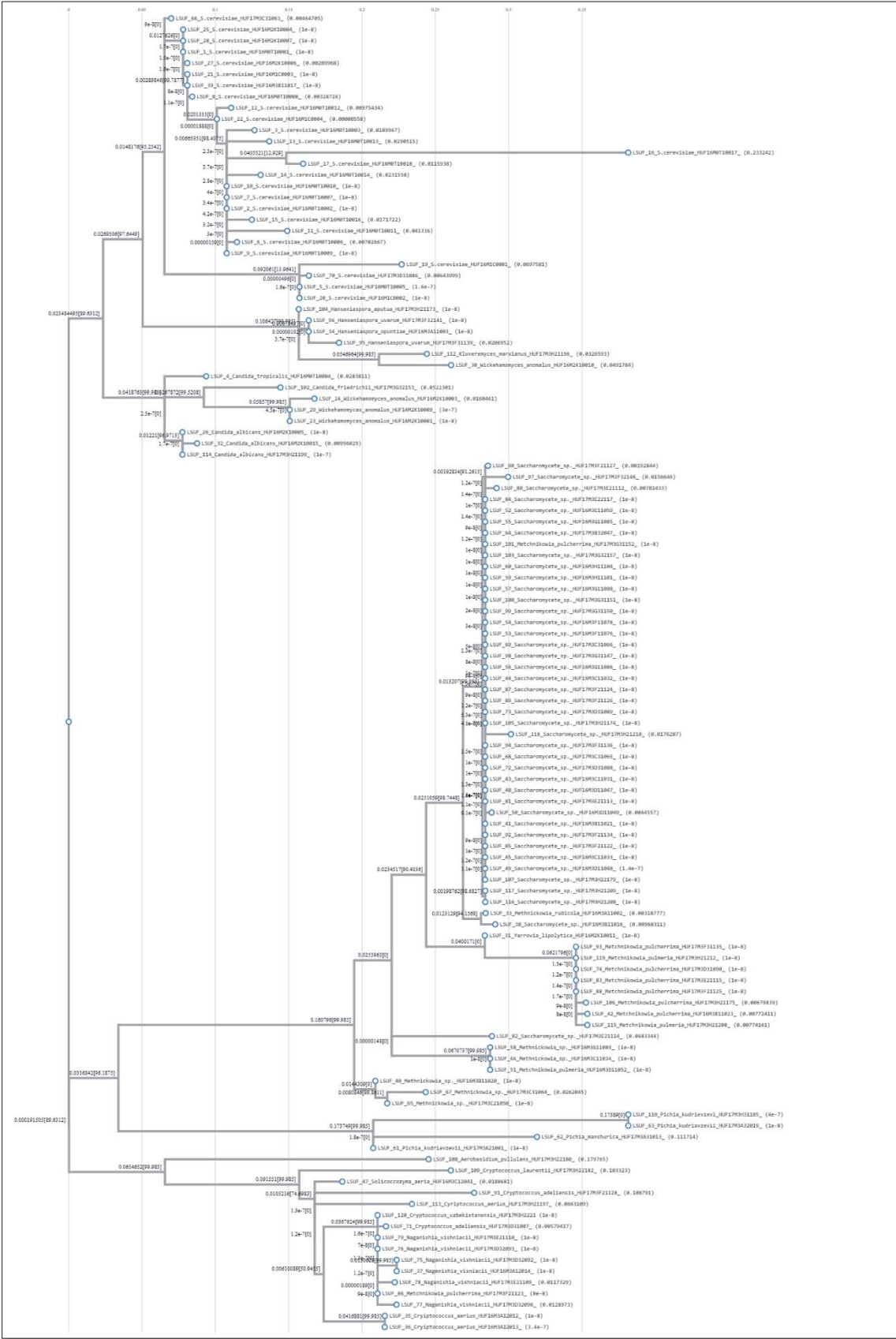
Şekil 4.20. Kullanılan 120 izolatın LSU gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



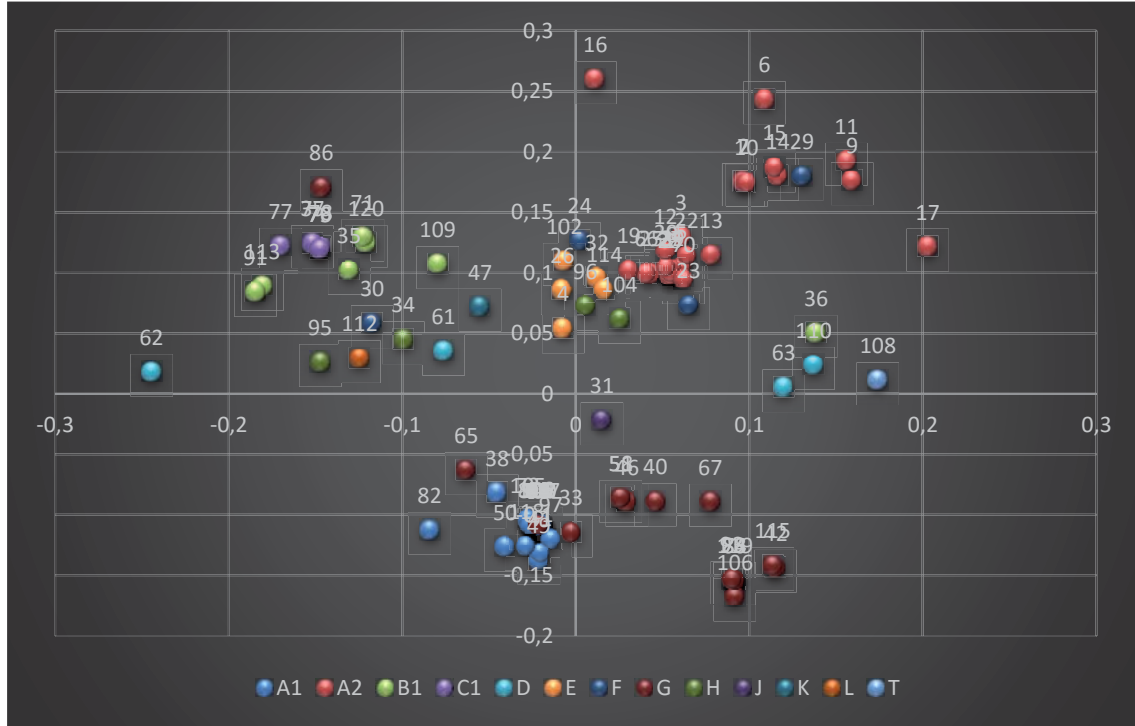
Şekil 4.21. Kullanılan 120 izolatin LSU gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

LSU gen bölgesi için izolatlardan tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.20) değerlendirmesinde, 119 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alındığı görülmektedir. Bir adet (HUF17M3H32189-(*Naganishia albida*)) izolasyona ait LSU gen bölgesi sekans verisi olmadığından değerlendirmeye alınamamıştır. İzolasyonların tamamının LSU gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 23 adet ana dal 79 adet uç dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise HUF16M2K10015 kodlu *Candida cinsine ait* izolasyon *S. cerevisiae* grubu içerisinde yer aldığı, HUF16M0T10012 kodlu *S. cerevisiae* cinsine ait izolasyon *Wickenomyces* grubu içerisinde yer aldığı, HUF17M3H21196 kodlu *Kluyveromyces marxianus* türünün *Hanseniaspora* grubu içerisinde yer aldığı, HUF16M2K10010 kodlu *Wickehamomyces anomalus* ve HUF16M2K10011 kodlu *Yarrowia lipolytica* türlerine ait iki izolasyonun aynı dallanma üzerinde yer aldığı, HUF17M3G31152 kodlu *Metschnikowia* cinsine ait izolasyonun *Saccharomycete sp.* grubu içerisinde yer aldığı, HUF16M3C12041 kodlu *Solicoccozyma* cinsine ait izolasyon *Cyriptococcus* türlerine ait grup içerisinde yer aldığı, HUF17M3F21123 kodlu *Metschnikowia* cinsine ait izolasyon ile HUF17M3H22218

Cyriococcus türüne ait izolasyonun aynı grup dallanmada yer almakta olduğu gözlemlenmektedir. İzolatların tamamının LSU gen bölgesi türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise net bir ilişki bulunmamaktadır. Bunun sebebi LSU gen bölgesi jel elektroforez görüntülerinde bant ayrımlarının tek bant oluşumu şeklinde gerçekleşmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 11 adet ana grup dallanma ve 17 adet uç grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. Genel ağaçta *S. cerevisiae* türüne ait izolasyonların filogenetik ağaçta tam ayrımı sağlanabilmiştir fakat içlerine *Candida* ve *Wickehamomyces* cinslerine ait (HUF16M2K10015, HUF16M2K10009, HUF16M2K10003, HUF16M2K10001) türlerin yer aldığı gözlemlenmektedir. LSU gen bölgesi için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filogenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-7'da (0.4363 ± 0.0092) en küçük Takson-1'de (0.0232 ± 0.0034) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-4 ile Takson-7 arasında (0.5300 ± 0.0009) en küçük farklılık ise Takson-1 ile Takson-8 arasında (0.1530 ± 0.009) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.241 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.459 ± 0.008 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.045 ± 0.007 olarak bulunmuştur. LSU gen bölgesi için ayrışma katsayısı ise 0.157 ± 0.020 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.22) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.



Şekil 4.22. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu

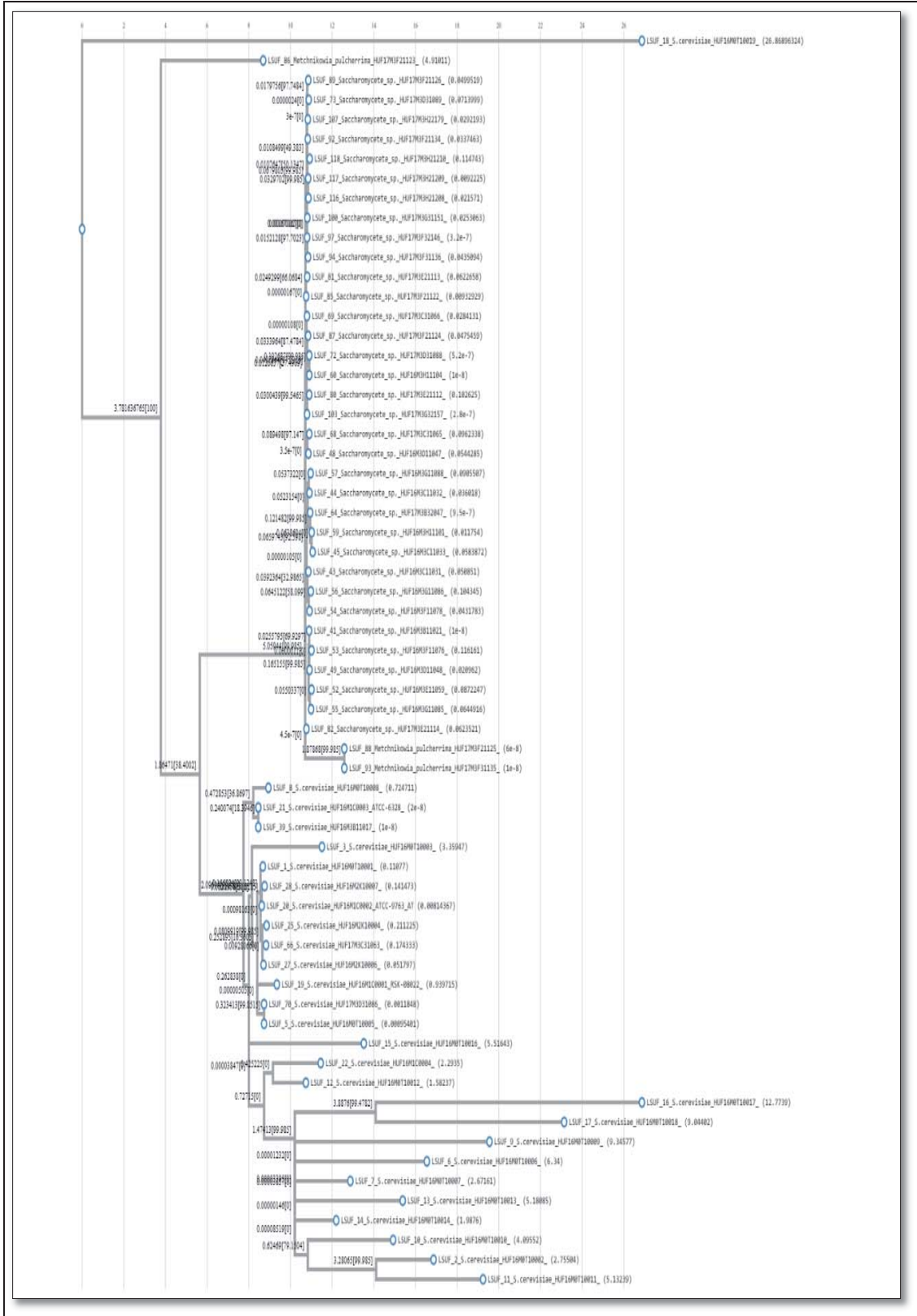


Şekil 4.23. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

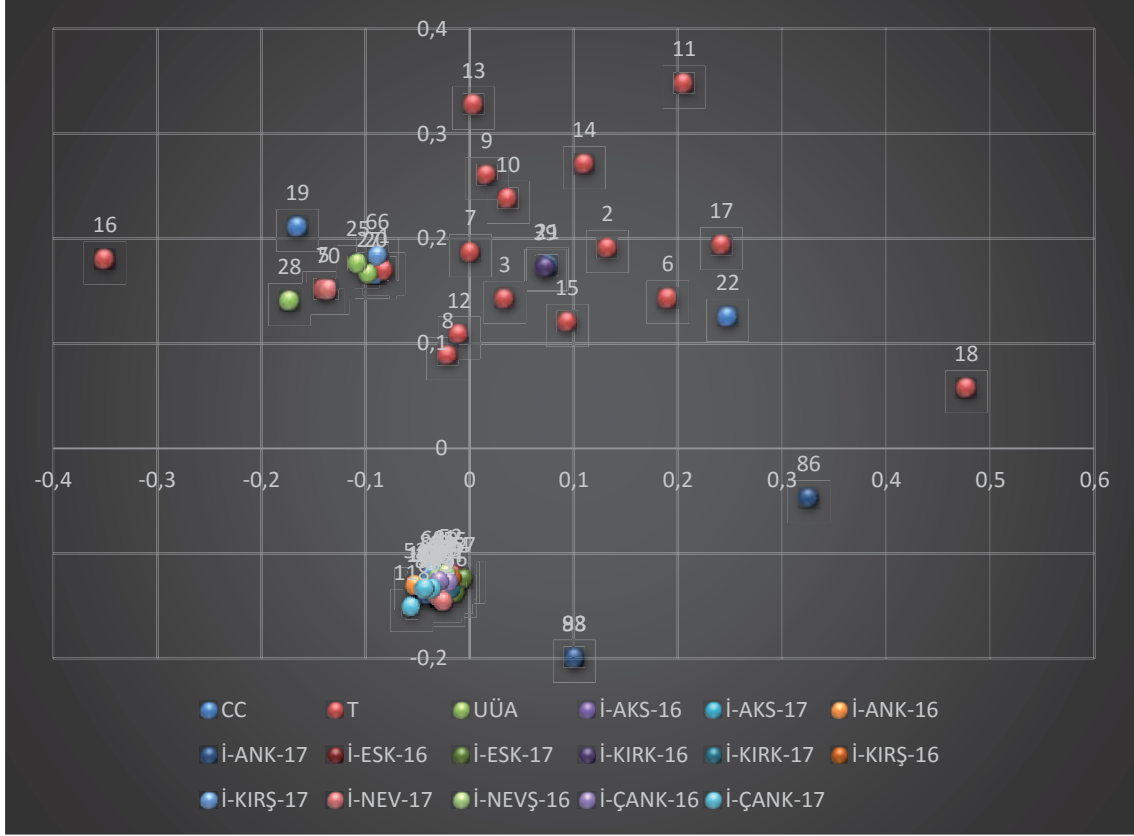
MEME suit yazılımı kullanılarak borkod yapısı olarak kullanılacak ayırım yapmada kullanılacak motif bölgeleri elde edilmiştir. LSU gen bölgesi barkodları için izolatların tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.22) değerlendirmesinde, 116 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alınmıştır. Bunlardan biri LSU bölgesi için sekans verisi bulunmayan (HUF17M3H32189-(*Naganishia albida*)) geriye kalan üçü ise motif yapısı elde edilemeyen (HUF16M0T10019-(*S. cerevisiae*), HUF17M3H21212-(*Metschnikowia pulcherrima*), HUF17M3H22218-(*Cryptococcus uzbekistanensis*)) izolatlardır. İzolasyonların tamamının LSU gen bölgesi barkod sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 20 adet ana dal 80 adet uç dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise *Kluyveromyces marxianus* ve *Wickehamomyces anomalus* türlerine ait iki izolasyonun (HUF17M3H21196, HUF16M2K10010) aynı dallanma üzerinde yer aldığı, HUF16M3C1204 kodlu *Solicoccozyma* türü ile HUF17M3F21128 kodlu *Cryptococcus* türünün aynı dallanmada yer aldığı, HUF17M3F21123 kodlu *Metchnikowia pulcherrima* türünün *Naganishia* grubu içerisinde yer aldığı ve bazı *Cyriptococcus* türleri *Naganishia* türlerine ait grupların içerisinde yer aldığı, gözlemlenmiştir. LSU gen bölgesi için barkod

sekansları kullanmanın ayırım başarısını arttırdığı gözlemlenmektedir. MEME suit ile elde edilen izolatların tamamının LSU gen bölgesi barkod yapıları ile elde edilen türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise filogenetik gruplandırmanın PCR jel görüntülerinden elde edilen sonuçlar LSU gen bölgesi için tekli jel bant ayırımı söz konusu olduğundan yorumlanamamaktadır. Bu nedenle LSU gen bölgesi barkod yapıları ile elde edilen türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise net bir ilişki bulunamamıştır. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 2 adet ana grup dallanma ve 23 adet uç grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. Barkod yapıları kullanılarak elde edilen genel filogenetik ağaçta (Şekil 4.22) *S. cerevisiae* türlerine ait izolatların ayırımı başarıyla sağlanabilmiştir ve *S.cerevisiae* türüne ait dallanma içerisinde herhangi başka bir cins izolasyon yer almadığı görülmektedir.

LSU gen bölgesi barkod yapıları için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filogenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-7'de (0.0899 ± 0.0126) en küçük Takson-9'da (0.0055 ± 0.0019) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-4 ile Takson-8 arasında (0.2880 ± 0.0240) en küçük farklılık ise Takson-6 ile Takson-7 arasında (0.102 ± 0.013) bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.049 ± 0.003 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.179 ± 0.011 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.130 ± 0.010 olarak bulunmuştur. LSU gen bölgesi için ayrışma katsayısı ise 0.725 ± 0.017 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.23) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.

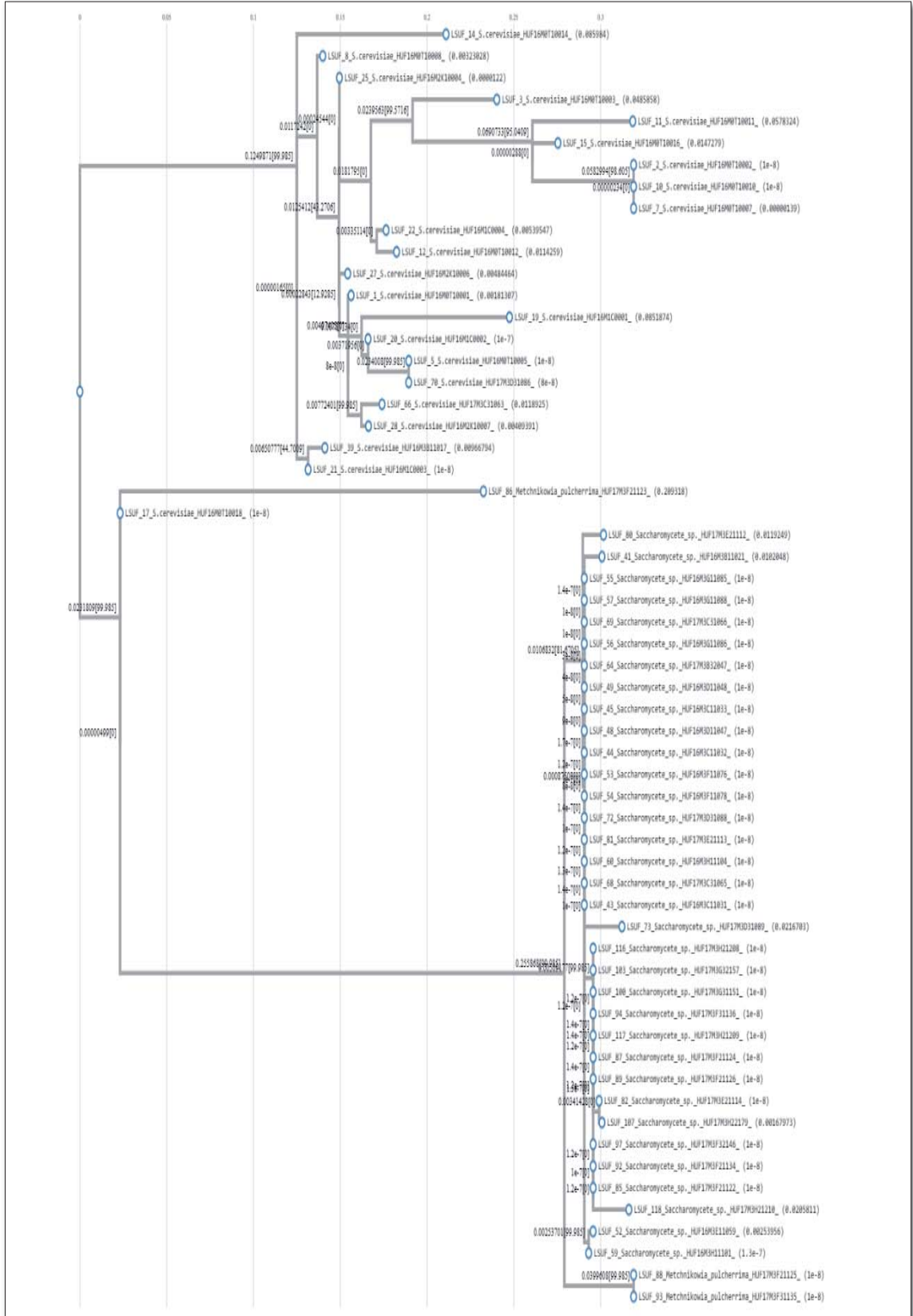


Şekil 4.24. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların LSU gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu

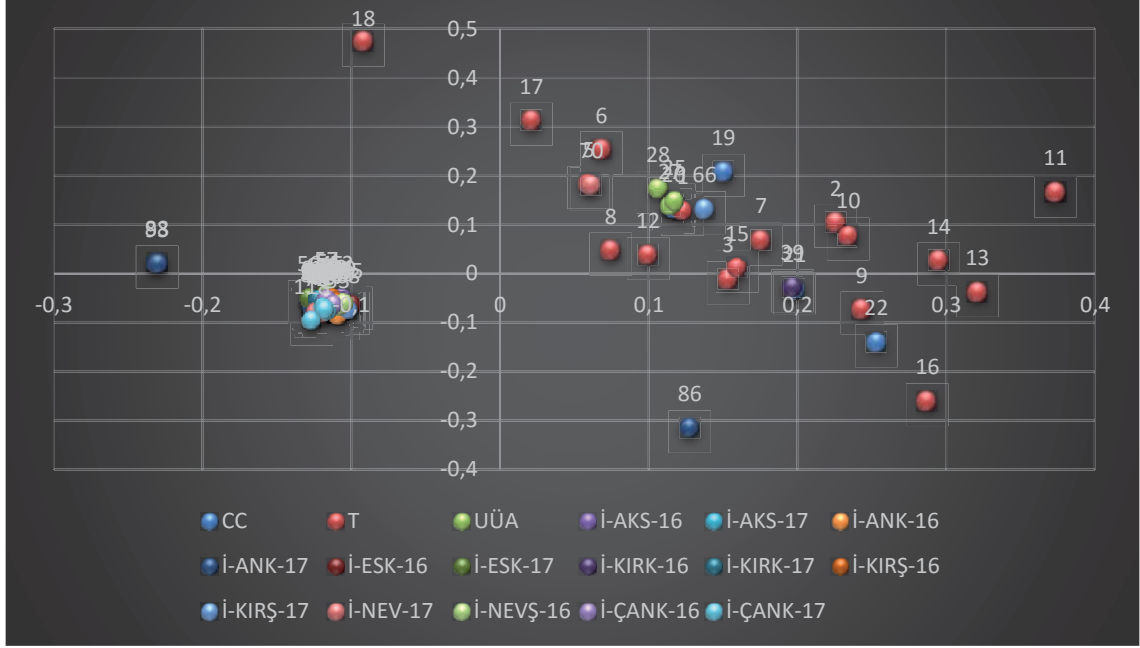


Şekil 4.25. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların LSU gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) tek başına değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.24) filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların tamamının (64 adet) değerlendirilmeye alındığı görülmektedir. *S. cerevisiae* izolatlarının sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların LSU gen bölgesine beş ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu dört ana grubun 43 adet tür içi uç gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.25) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.

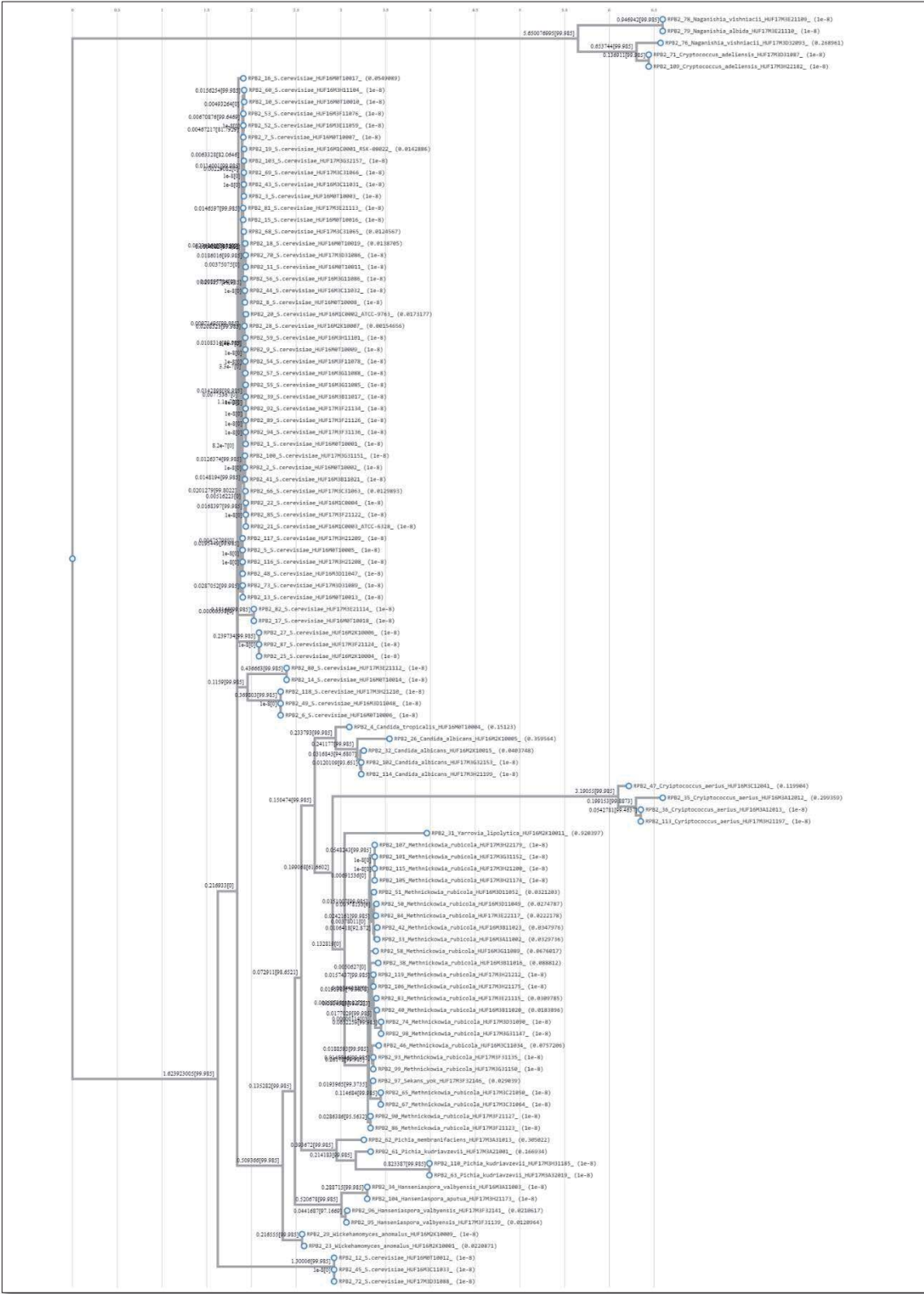


Şekil 4.26. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşum

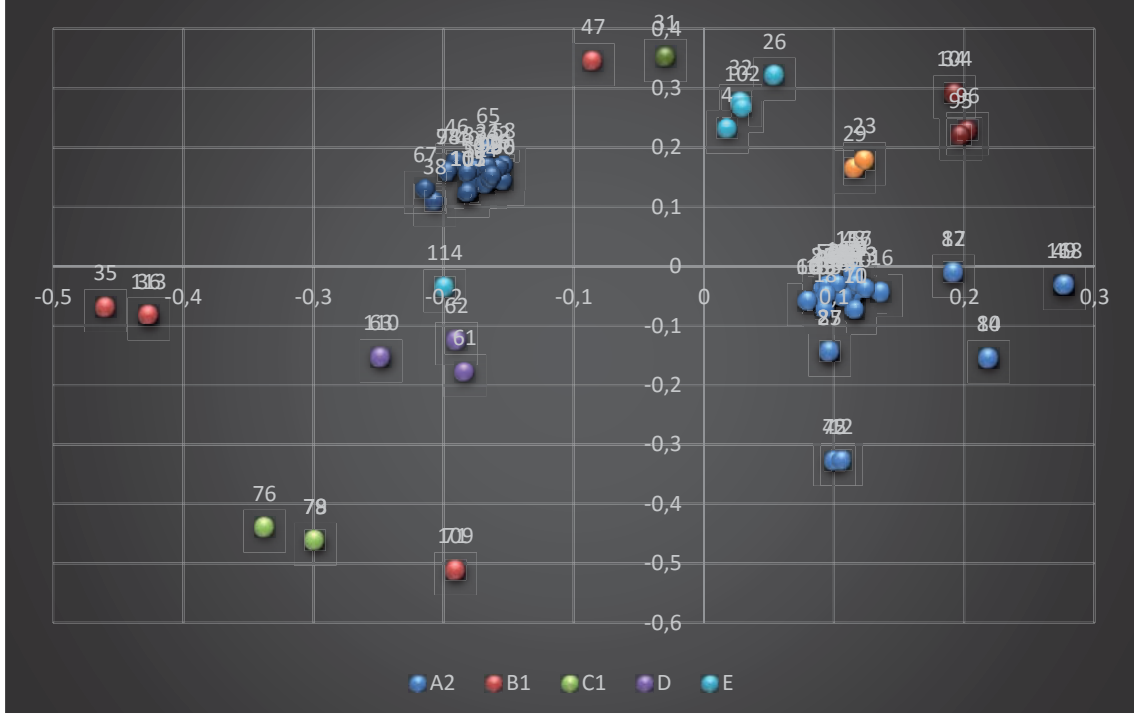


Şekil 4.27. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak LSU gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) LSU gen bölgesi barkod yapılarının (62 adet) değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.26) görülmektedir. Filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların iki tanesinin barkod yapısı ortaya konulamadığından değerlendirilmeye alınmadığı görülmektedir. Değerlendirmeye alınmayan iki adet (HUF16M0T10017 - *S. cerevisiae*, HUF16M0T10019 - *S. cerevisiae*) izolasyonun motif yapıları elde edilememiştir. *S. cerevisiae* izolatlarının barkod sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların LSU gen bölgesine göre yedi ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu yedi ana grubun 49 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.27) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir



Şekil 4.28. Kullanılan 120 izolattın RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



Şekil 4.29. Kullanılan 120 izolatin RPB2 gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

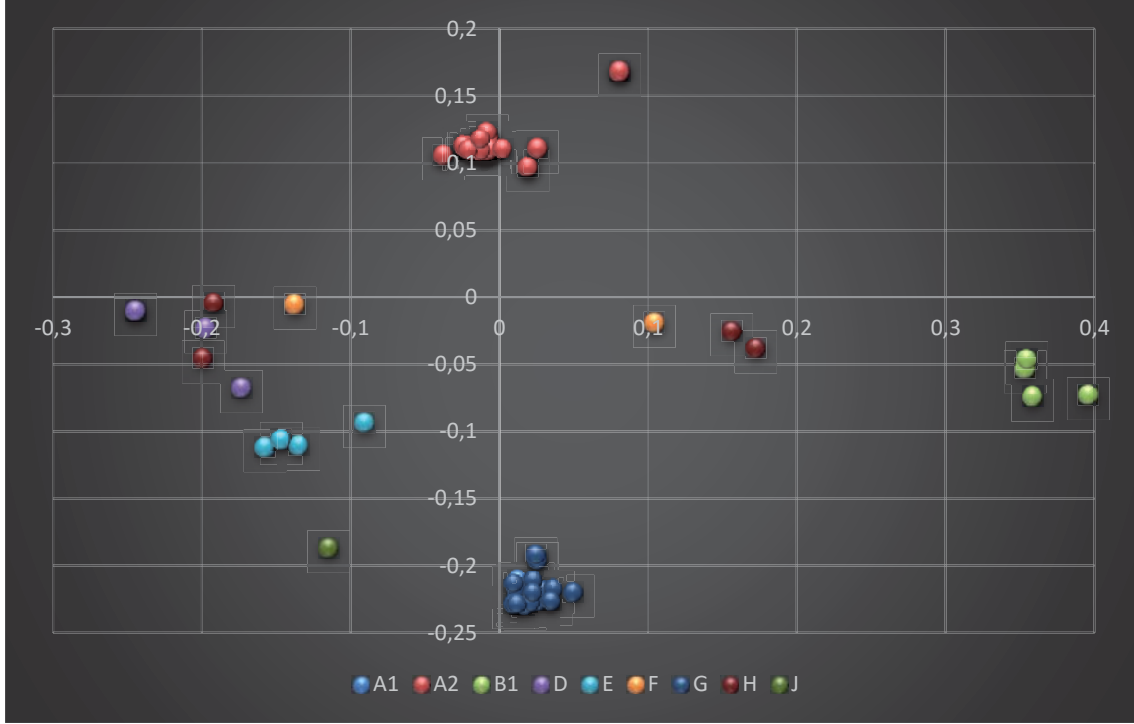
RPB2 gen bölgesi için izolatların tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.28) değerlendirmesinde, 108 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alınmıştır. On iki adet (HUF16M2K10003-(*Wickehamomyces anomalus*), HUF16M2K10010-(*Wickehamomyces anomalus*), HUF16M3A12014-(*Naganishia visniacii*), HUF17M3B32047-(*Saccharomycete sp.*), HUF17M3D31090-(*Metschnikowia sp.*), HUF17M3F21125-(*Metschnikowia pulcherrima*), HUF17M3F21128-(*Naganishia albida*), HUF17M3H22180-(*Candida raillenensis*), HUF17M3H32189-(*Naganishia albida*), HUF17M3H21196-(*Kluyveromyces marxianus*), HUF17M3H22218-(*Naganishia albida*), HUF17M3D32096-(*Naganishia vishniacii*)) izolasyona ait RPB2 gen bölgesi sekans verisi olmadığından değerlendirmeye alınmamıştır. İzolasyonların tamamının RPB2 gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 17 adet ana dal 74 adet alt dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde genel olarak *Cyriptococcus* ile *Naganishia* taksonlarına ait cinsler birbirine yakın çıkmakla beraber HUF17M3D32093 kodlu *Naganishia* izolatu *Cyriptococcus* türlerine ait gruplara daha yakın yer almıştır. İzolatların tamamının RPB2 gen bölgesi türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise net bir ilişki

bulunmamaktadır. Bunun sebebi RPB2 gen bölgesi jel elektroforez görüntülerinde çoklu bant yapılarının ortaya çıkmış olmasından kaynaklanmaktadır.

Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 14 adet ana grup dallanma ve 40 adet alt grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. RPB2 gen bölgesi için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filegenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-3'de (0.3924 ± 0.0110) en küçük Takson-7'de (0.0188 ± 0.0041) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-4 ile Takson-9 arasında (0.6250 ± 0.0150) en küçük farklılık ise Takson-2 ile Takson-7 arasında (0.2820 ± 0.0110) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.173 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.303 ± 0.006 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.129 ± 0.005 olarak bulunmuştur. RPB2 gen bölgesi için ayrışma katsayısı ise 0.427 ± 0.011 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.29) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.



Şekil 4.30. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit kullanılarak elde edilen barkodları ile RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



Şekil 4.31. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

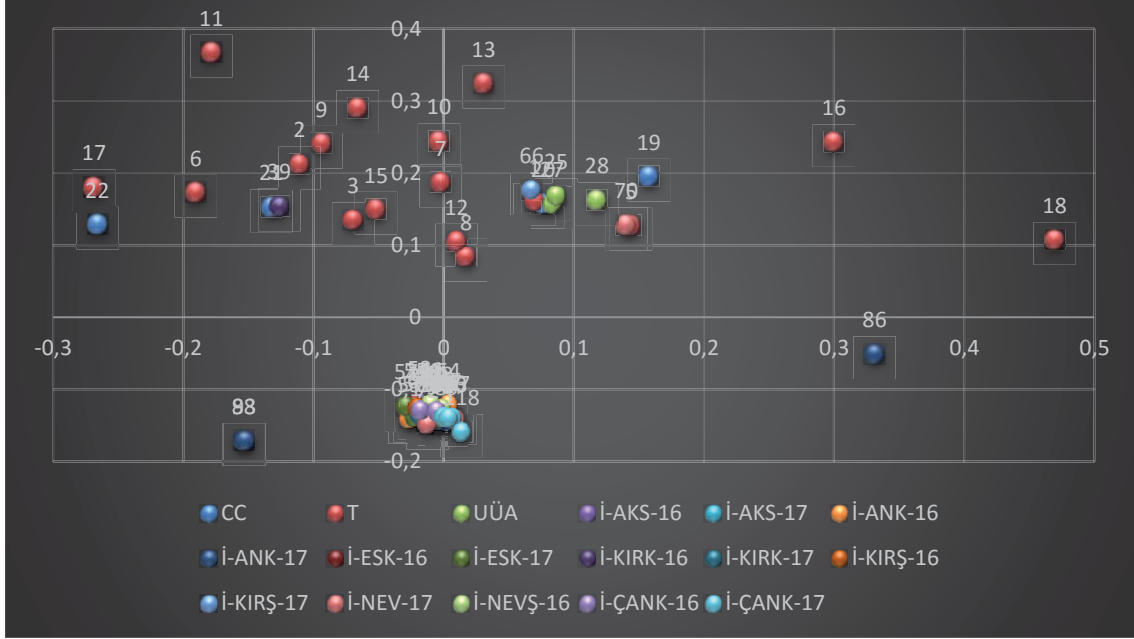
MEME suit yazılımı kullanılarak borkod yapısı olarak kullanılacak motif bölgeleri elde edilmiştir. RPB2 gen bölgesi barkodları için izolatların tamamının sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.30) değerlendirmesinde, 98 adet izolasyonun sekans verisi incelemeye alınmıştır. Bunlardan 12'si RPB2 bölgesi için sekans verisi bulunmayan 10'u ise barkod yapısı ortaya konamayan (HUF16M2K10003-(*Wickehamomyces anomalus*), HUF16M2K10010-(*Wickehamomyces anomalus*), HUF16M3A12014-(*Naganishia visniacii*), HUF17M3B32047-(*Saccharomycete sp.*), HUF17M3D31090-(*Metschnikowia sp.*), HUF17M3F21125-(*Metschnikowia pulcherrima*), HUF17M3F21128-(*Naganishia albida*), HUF17M3H22180-(*Candida raillenensis*), HUF17M3H32189-(*Naganishia albida*), HUF17M3H21196-(*Kluyveromyces marxianus*), HUF17M3H22218-(*Naganishia albida*), HUF17M3D32096-(*Naganishia vishniacii*)) izolatlarıdır. Geriye kalan 10 tanesi ise HUF17M3D32096-(*Naganishia vishniacii*), HUF16M0T10006-(*S. cerevisiae*), HUF16M0T10009-(*S. cerevisiae*), HUF16M0T10013-(*S. cerevisiae*), HUF17M3D31087-(*Cryptococcus adeliensis*), HUF17M3D32093-(*Naganishia vishniacii*), HUF17M3E21109-(*Naganishia vishniacii*), HUF17M3E21110-(*Naganishia*

albida), HUF17M3H22182-(*Cryptococcus adeliensis*), HUF17M3H31185-(*Pichia kudrievzevi*)) kodlu izolasyonlardır. İzolasyonların tamamının RPB2 gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 10 adet ana dal 74 adet alt dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise bütün grupların birbirlerinden başarılı bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir. RPB2 gen bölgesi için barkod sekansları kullanmanın ayırma gücünü arttırdığı gözlemlenmektedir. İzolatların tamamının RPB2 gen bölgesi türler arası ve tür içi filogenetik ağaç ilişkileri ve jel elektroforezinde elde edilen bant ayrımları birbirleri ile kıyaslandığında ise net bir ilişki bulunamamaktadır. Bunun sebebi RPB2 gen bölgesi jel elektroforez görüntülerinde çoklu bant yapılarının ortaya çıkmış olmasından kaynaklanmaktadır. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 18 adet ana grup dallanma ve 42 adet alt grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. Barkod yapıları kullanılarak elde edilen genel filogenetik ağaçta (Şekil 4.26) *S. cerevisiae* türlerine ait izolatların ayırımı başarıyla sağlanabilmiştir ve *S.cerevisiae* türüne ait dallanma içerisinde herhangi başka bir cins izolasyon yer almadığı görülmektedir.

RPB2 gen bölgesi barkod yapıları için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filogenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-5’de (0.1287 ± 0.0127) en küçük Takson-7’de (0.00357 ± 0.00242) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-3 ile Takson-7 arasında (0.4880 ± 0.0520) en küçük farklılık ise Takson-1 ile Takson-8 arasında (0.0170 ± 0.0030) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması (0.04771 ± 0.0030) olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.199 ± 0.0083 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.152 ± 0.0072 olarak bulunmuştur. RPB2 gen bölgesi için ayırma katsayısı ise 0.7631 ± 0.0136 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.31) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C’de verilmiştir.

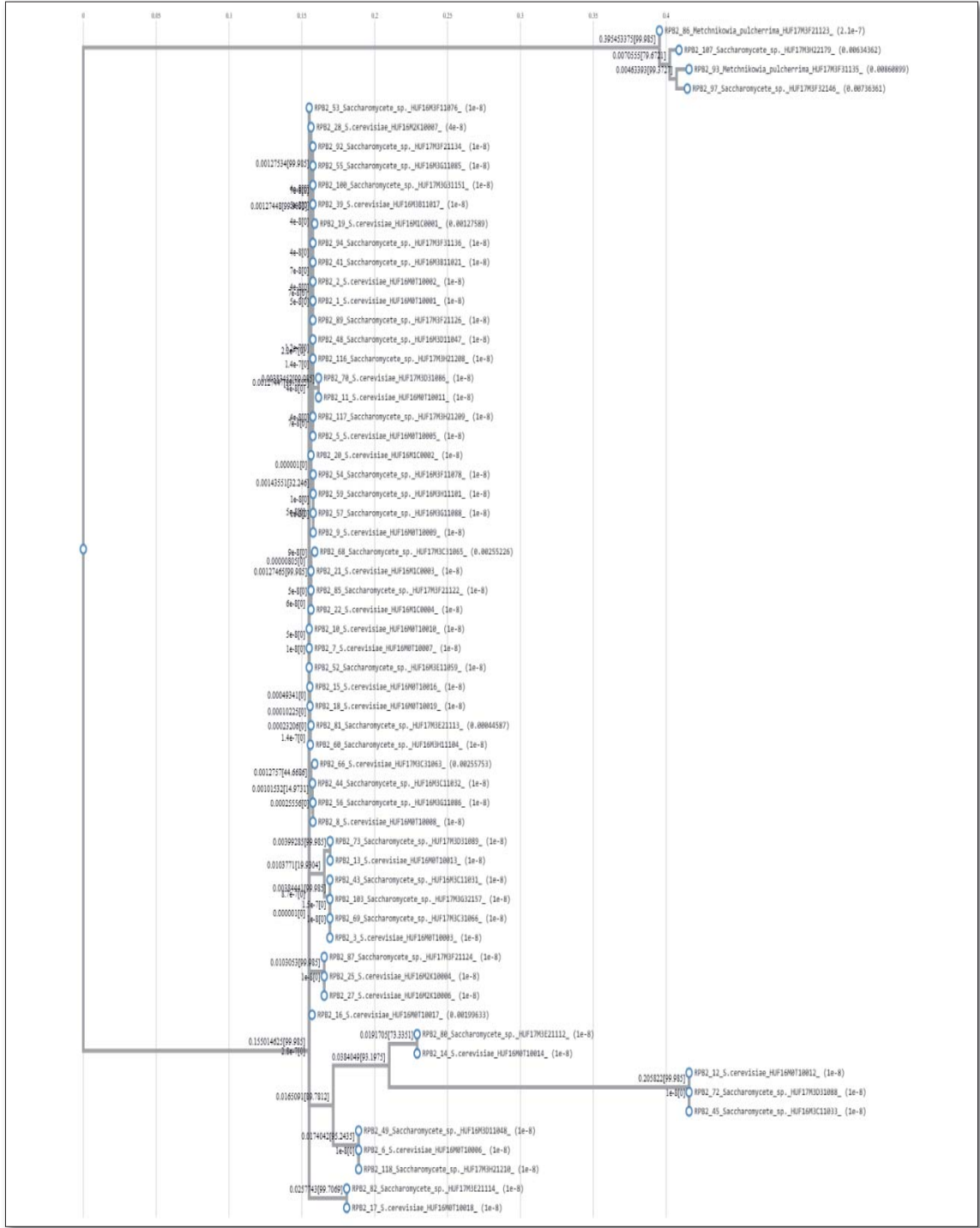


Şekil 4.32. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların RPB2 gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu

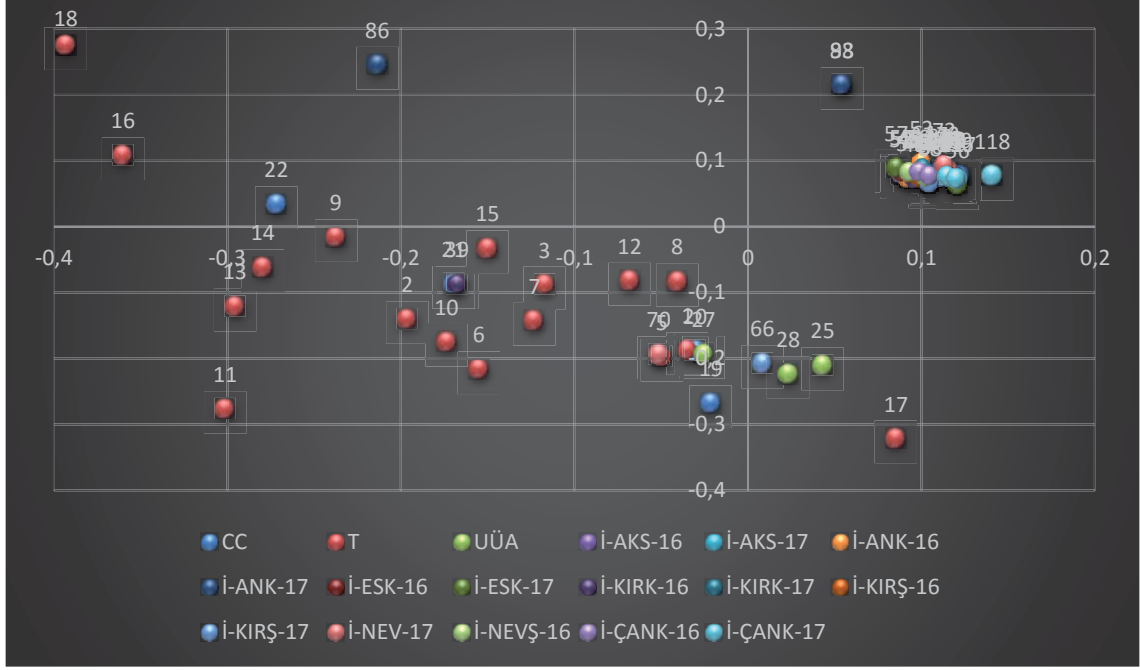


Şekil 4.33. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların RPB2 gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) tek başına değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.32) filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların 62'sinin değerlendirilmeye alındığı görülmektedir. İki adet izolasyonun (HUF17M3B32047-(*Saccharomycete* sp.), HUF17M3F21125-(*Metschnikowia pulcherrima*)) sekans verisi bulunmadığından değerlendirmeye alınamamıştır. Değerlendirmeye alınan *S. cerevisiae* izolatlarının sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların RPB2 gen bölgesine göre 7 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 7 ana grubun 44 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. *S. cerevisiae* türlerine ait izolatların ayrımı başarıyla sağlanabilmiştir ve *S. cerevisiae* türüne ait dallanma içerisinde herhangi başka bir cins izolasyon yer almadığı görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.33) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayrım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C'de verilmiştir.

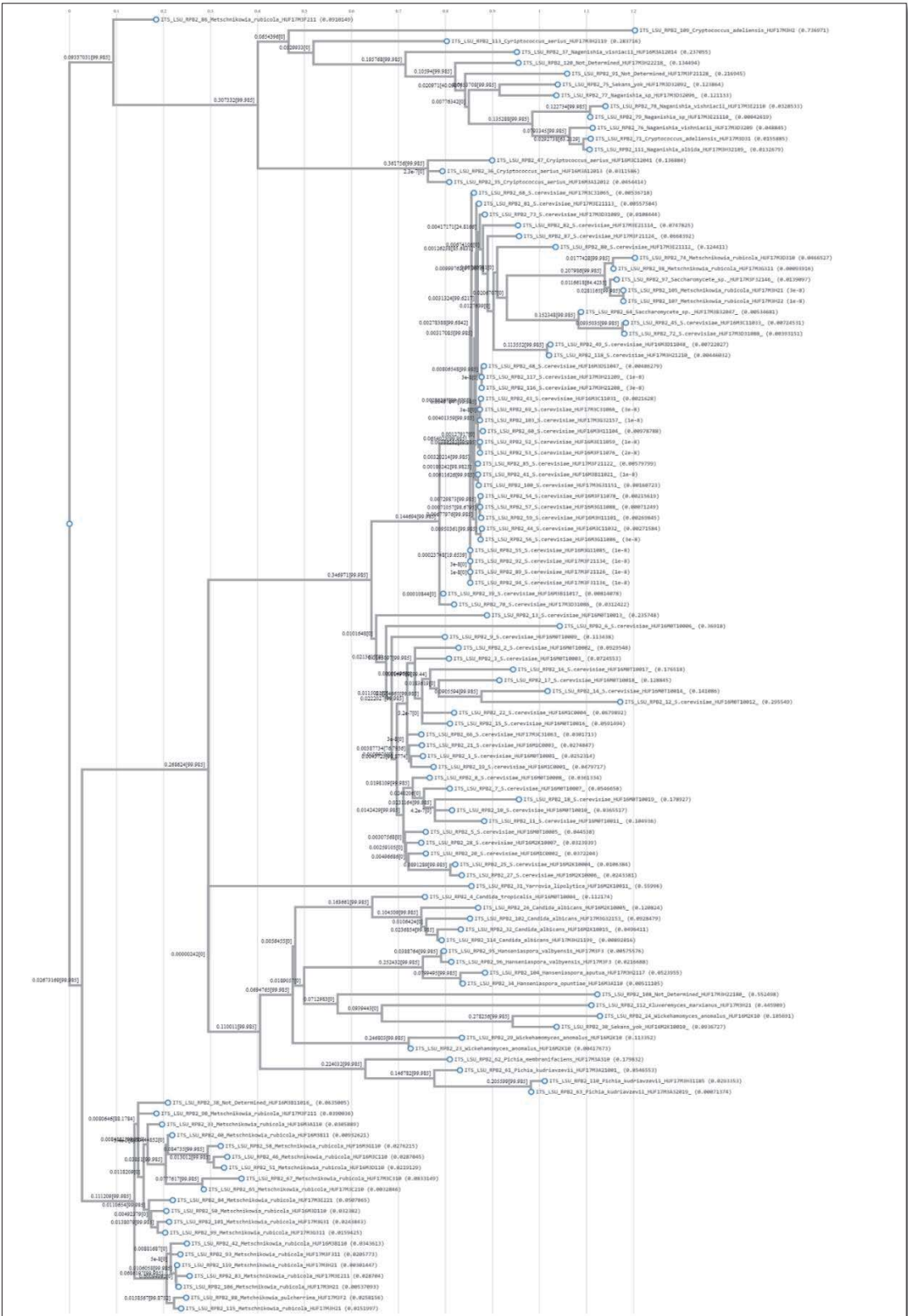


Şekil 4.34. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu

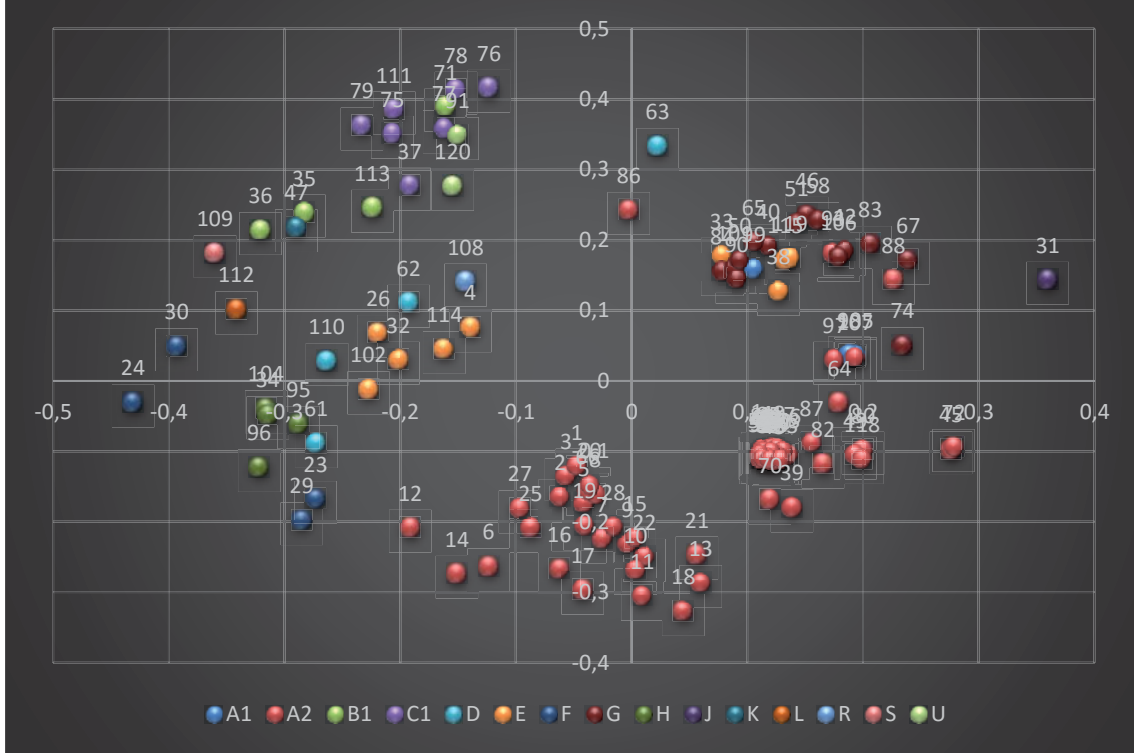


Şekil 4.35. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak RPB2 gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların (64 adet) RPB2 gen bölgesi barkod yapılarının (62 adet) değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.34) görülmektedir. Filogenetik ilişki değerlendirmesinde ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* olarak tespit edilen izolasyonların iki tanesinin barkod yapısı ortaya konulamadığından değerlendirilmeye alınmadığı görülmektedir. Değerlendirmeye alınmayan iki adet (HUF17M3B32047, HUF17M3F21125) izolasyonun motif yapıları elde edilemediğinden değerlendirmeye alınmamıştır. *S. cerevisiae* izolatlarının barkod sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların RPB2 gen bölgesine göre 10 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 10 ana grubun 44 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.35) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.



Şekil 4.36. Kullanılan 120 izolatın birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



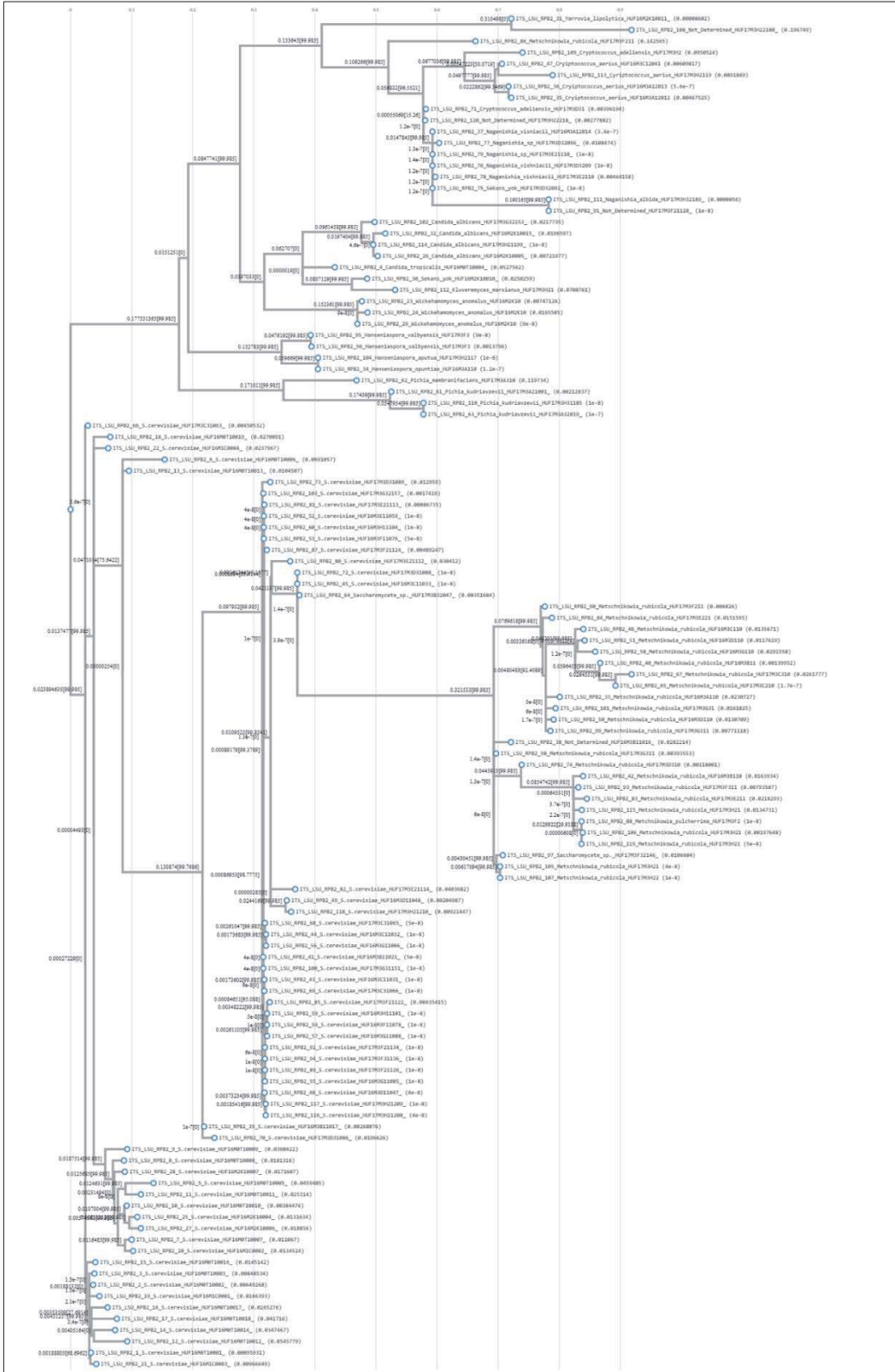
Şekil 4.37. Kullanılan 120 izolatin birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

DNA barkodlama çalışmasında kullanılan üç farklı gen bölgesi (ITS-LSU-RPB2) için izolatların tamamının birleştirilmiş sekanslarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.36) değerlendirmesinde, izolasyonların tamamının sekans verisi incelemeye alınmıştır. İzolasyonların tamamının ITS_LSU_RPB2 gen bölgesi sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 20 adet ana dal 88 adet uç dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise HUF17M3F21123 kodlu *Metschnikowia türüne ait* izolasyon *Cryptococcus* grubu içerisinde yer aldığı, HUF16M3A12014 ve HUF17M3H32189 kodlu *Naganishia türüne ait* izolasyon *Cryptococcus* grubu içerisinde yer aldığı, HUF17M3F32146 kodlu *Saccharomycete sp. türüne ait* izolasyon *Metschnikowia* grubu içerisinde yer aldığı ve birçok *Metschnikowia* türü *S. cerevisiae* içerisinde yer aldığı gözlemlenmektedir. Genel olarak *Cyriptococcus* ile *Naganishia* cinsleri birbirine yakın çıkmakla beraber HUF16M3A12014 ve HUF17M3H32189 kodlu *Naganishia* izolatu *Cyriptococcus* türlerine ait gruplara daha yakın yer almıştır.

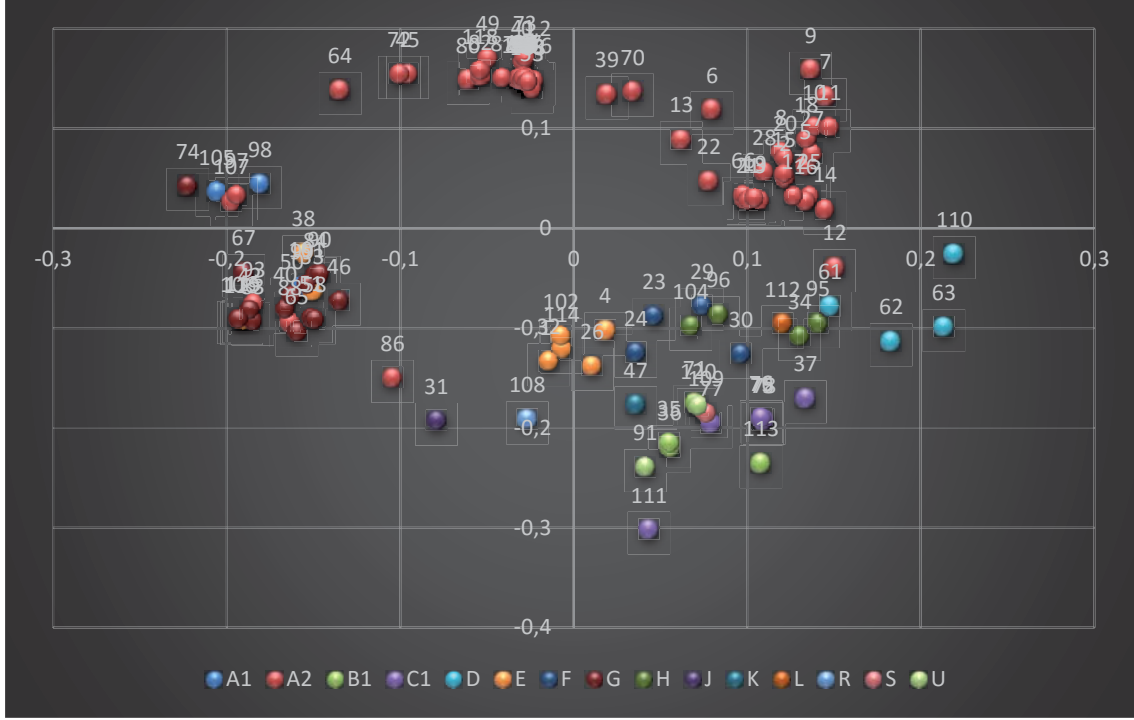
Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 13 adet ana grup dallanma ve 47 adet alt grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. *S. cerevisiae*, *Saccharomycete sp.* ve *Metschnikowia*

gruplarına ait türler birbirlerine karışık olarak çıktığı ve birçok *Metschnikowia* türünün *S. cerevisiae* grubu içerisinde yer aldığı gözlemlenmektedir.

Birleştirilmiş gen bölgesi için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filogenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama ıraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-3'de (0.32305 ± 0.0049) en küçük Takson-1'de (0.01406 ± 0.00315) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-4 ile Takson-7 arasında (0.531 ± 0.010) en küçük farklılık ise Takson-1 ile Takson-8 arasında (0.213 ± 0.007) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki ıraksaklıklarının ortalaması 0.20 ± 0.002 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama ıraksaklığı 0.340 ± 0.004 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki ıraksaklıkların ortalaması 0.140 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Birleştirilmiş gen bölgeleri için ayrışma katsayısı ise 0.412 ± 0.008 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.37) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.



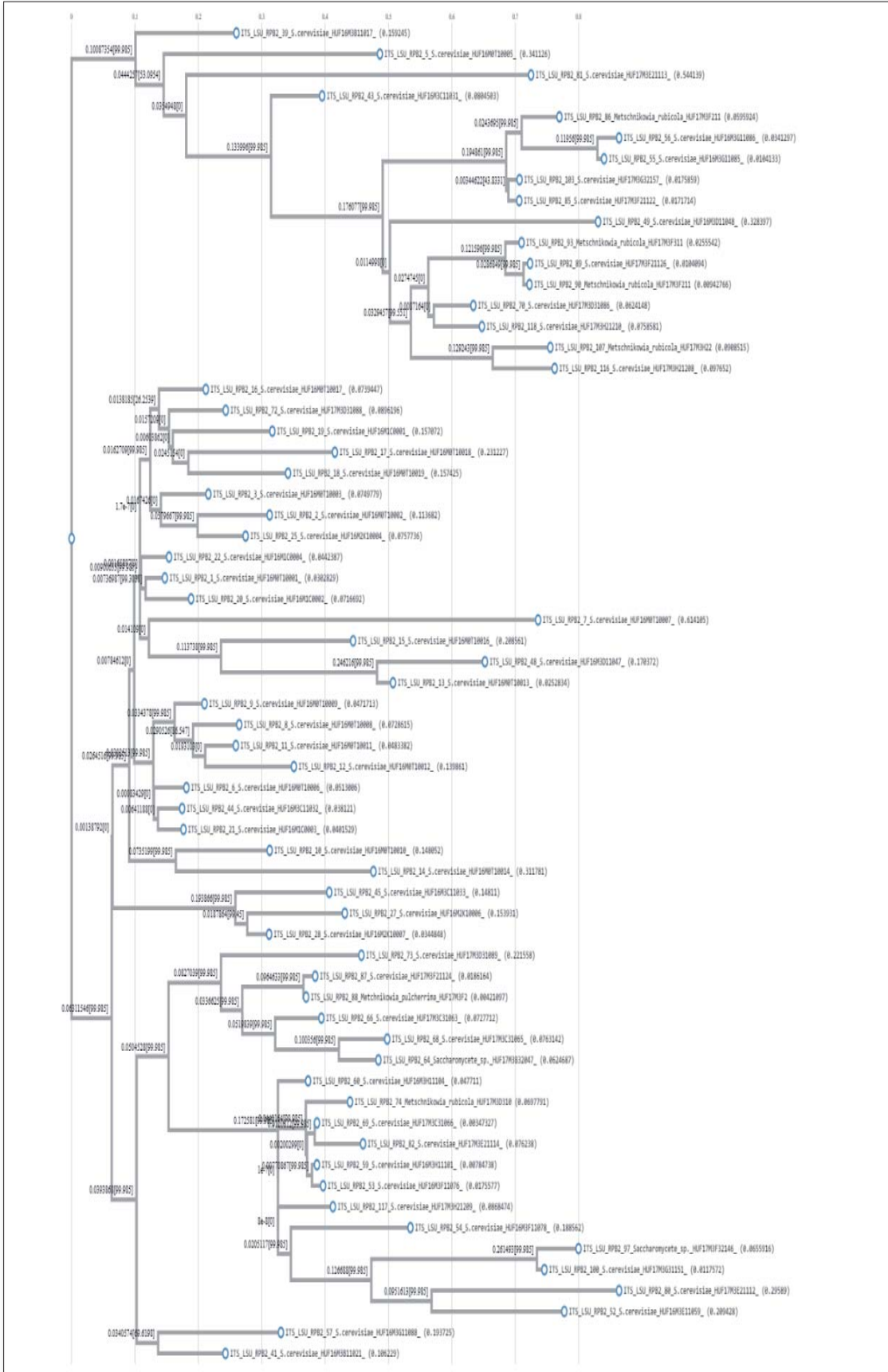
Şekil 4.38. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak elde edilen barkodları ile birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu



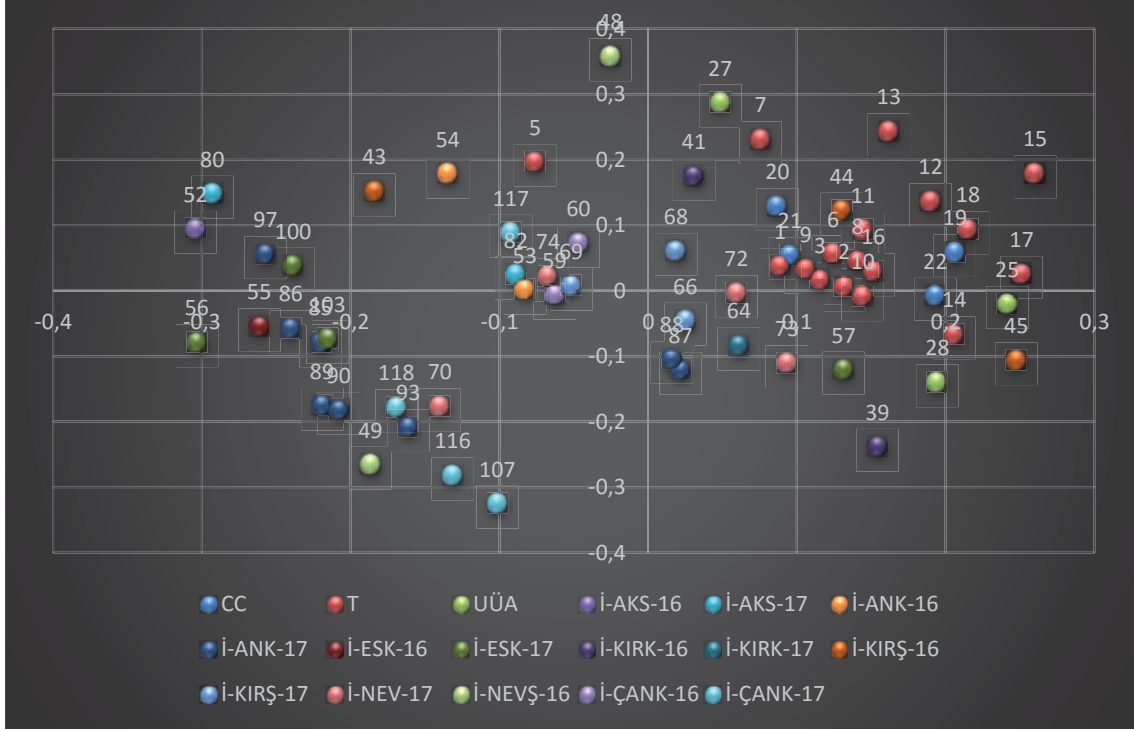
Şekil 4.39. Kullanılan 120 izolatın MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkod yapılarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

DNA barkodlama çalışmasında kullanılan üç farklı gen bölgesi (ITS-LSU-RPB2) için izolatların tamamının sekanslarının birleştirilmesi ve MEME suit programında ortaya konulan barkod yapılarına ait filogenetik ağaç oluşumu (Şekil 4.38) değerlendirmesinde, izolasyonların tamamının sekans verisi incelemeye alındığı görülmektedir. İzolasyonların tamamının ITS_LSU_RPB2 gen bölgesi barkod sekans verilerine ait filogenetik ilişkilendirme sonuçları değerlendirildiğinde 23 adet ana dal 91 adet alt dal oluşumu gözlemlendiği görülmektedir. Ana grup dallanmalar değerlendirildiğinde ise HUF16M0T10004 kodlu *Candida* grubunda yer alan, HUF16M2K10010 kodlu *Wickenomyces* grubunda yer alan ve HUF17M3H21196 *Kluyveromyces* grubunda yer alan üç farklı izolat aynı dallanma üzerinde yer aldığı, *S. cerevisiae*, *Saccharomycete sp.* ve *Metschnikowia* gruplarına ait türlerin birbirlerine karışmış olduğu, birçok *Metschnikowia* türü ve *Saccharomycete sp.* türünün *S. cerevisiae* grubu içerisinde yer aldığı gözlemlenmiştir. Ön tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış izolatların bu genel ağaçtaki dağılımları incelendiğinde ise 23 adet ana grup dallanma ve 64 adet alt grup dallanma oluşumu gözlemlenmiştir. Barkod yapıları kullanılarak elde edilen genel filogenetik ağaçta (Şekil 4.38) *S. cerevisiae* türlerine ait

izolatların ayrımı açısından değerlendirildiğinde ise *S. cerevisiae*, *Saccharomycete sp.* ve *Metschnikowia* gruplarına ait türler birbirlerine karışmış olduğu, birçok *Metschnikowia* türü ve *Saccharomycete sp.* türünün *S. cerevisiae* grubu içerisinde yer aldığı gözlemlenmektedir. Birleştirilmiş gen bölgesi için izolasyonların tamamı üzerinden elde edilen filogenetik ilişkiler, daha önce yapılmış olan moleküler ve MALDI-TOF tanımlamalarına göre belirlenmiş taksonlar açısından MEGA7 programı ile istatistiksel ayırım açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda grup içi ortalama iraksaklık (uzaklık) en büyük Takson-3'de (0.323 ± 0.0048) en küçük Takson-1'de (0.014064 ± 0.0031) belirlenmiştir. Takson ortalamaları arasındaki en büyük farklılık Takson-2 ile Takson-4 arasında (0.522 ± 0.007) en küçük farklılık ise Takson-1 ile Takson-2 arasında (0.2277 ± 0.006) olarak bulunmuştur. Taksonların kendi içlerindeki iraksaklıklarının ortalaması 0.2 ± 0.002 olarak bulunmuştur. Tüm popülasyonun ortalama iraksaklığı 0.34 ± 0.004 bulunmuş, taksonların birbiri arasındaki iraksaklıkların ortalaması 0.14 ± 0.004 olarak bulunmuştur. Birleştirilmiş gen bölgeleri için ayrışma katsayısı ise 0.412 ± 0.008 olarak bulunmuştur. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonları birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği yukarıda (Şekil 4.39) ayrıca verilmiştir. Filogenetik dağılımlar ve takson dağılımlarına ait MEGA7 kullanılarak elde edilen detaylı istatistiksel değerlendirmeler ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.

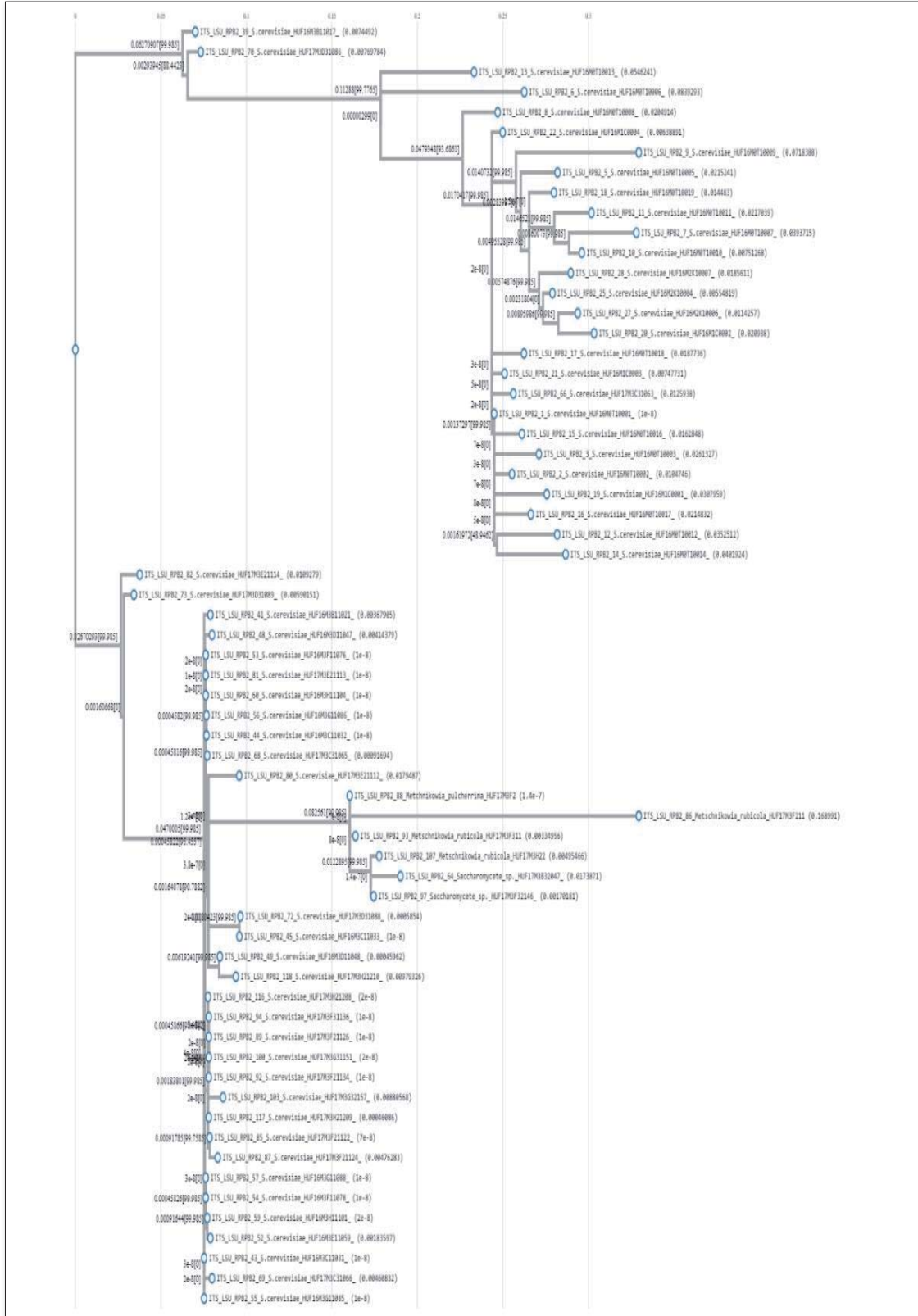


Şekil 4.40. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatın birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için filogenetik ağaç oluşumu

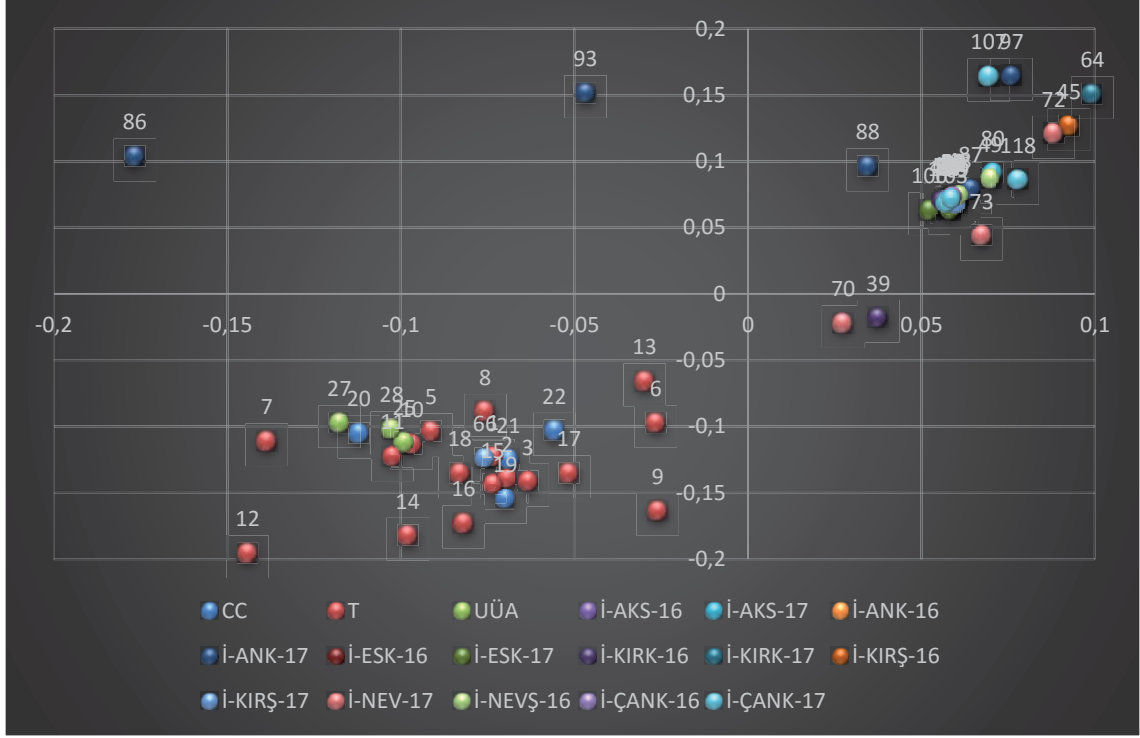


Şekil 4.41. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların tamamının değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.40) görülmektedir. Değerlendirmeye alınan *S. cerevisiae* izolatlarının sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların birleştirilmiş gen bölgelerine göre 12 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 12 ana grubun 44 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.41) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayrım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.



Şekil 4.42. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik ağaç oluşumu



Şekil 4.43. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların MEME-suit yazılımı kullanılarak birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için elde edilen barkodlarının filogenetik uzaklık verilerinin iki boyutlu dağılım grafiği

MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlamalara göre *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolatların tamamının birleştirilmiş gen bölgeleri barkod yapıları değerlendirmeye alındığı (Şekil 4.42) görülmektedir. Değerlendirmeye alınan *S. cerevisiae* izolatlarının barkod sekans verileri filogenetik değerlendirmesinde grupların birleştirilmiş gen bölgelerine göre 17 ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu 17 ana grubun 44 adet tür içi alt gruplara dağılım gösterdiği görülmektedir. XLSAT yazılımı kullanılarak izolasyonların kaynaklarına ve yıllara göre birbirlerine olan filogenetik uzaklık verileri üzerinden çok boyutlu ölçeklendirme yapılarak elde edilen x-y koordinatlarındaki dağılım grafiği (Şekil 4.43) elde edilmiştir. Elde edilen filogenetik dağılımlar ve XLSTAT programı kullanılarak elde edilen grup dağılımlarına ait dağılım istatistiklerine bakıldığında izolatların kaynak ve yıllara göre dağılımında anlamlı bir homojenlik gözlemlenememiştir. Gruplar anlamlı bir ayırım ilişkilendirmesi açısından yorumlanamamaktadır. Detaylı istatistiksel değerlendirmeler Ek-C’de verilmiştir.

Çalışma kapsamında *S.cerevisiae* türlerinin ayırımında kullanılacak DNA barkodlarının ortaya konmasında literatür çalışmaları doğrultusunda barkodlama amacıyla kullanılabilir gen bölgeleri belirlenmiş ve bu gen bölgeleri üzerinde ön denemeler

gerçekleştirilip çalışmanın yürütüleceği üç farklı gen bölgesinin kullanımına karar verilmiştir. Belirlenen bu üç farklı gen bölgesi (ITS, LSU, RPB2) ve bunların birleştirilmesi (ITS_LSU_RPB2) ile elde edilen sekans verileri üzerinden barkod yapıları ve başarı durumları ortaya konulmuştur. Ön tanımlamaları ve ileri tanımlamaları yapılan 120 izolat üzerinden DNA ekstraksiyonları yapılmış, ilgili gen bölgeleri için PCR reaksiyonları ve jel görüntülemeleri elde edilmiş ardından sekans analizlemeleri ve barkod veri analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu aşamalarda gerçekleştirilen işlemlerin gen bölgelerine bağlı başarıları aşağıda (Çizelge 4.31)'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.29. Gen bölgeleri ölçüm başarıları

| Gen Bölgesi | PCR Başarısı (%) | Sekanslama Başarısı (%) | Tanımlanan Tür % | Ort. Sekans Uzun. (bp) | Barkod Ortalama Uzunluğu | Tür İçi Ortalama Uzaklık (P-distance) | Türler Arası Ortalama Uzaklık (P-distance) | Ayrışma Katsayısı | Sekans örnek Sayısı |
|--------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--|-------------------|---------------------|
| ITS | 100 | 93 | 93 | 820 | 400 | 0,049±0,003 | 0,276±0,014 | 0,848±0,01 | 118 |
| LSU | 100 | 96 | 94 | 1100 | 300 | 0,241±0,004 | 0,045±0,007 | 0,157±0,002 | 119 |
| RPB2 | 100 | 90 | 90 | 1200 | 500 | 0,173±0,004 | 0,129±0,005 | 0,427±0,011 | 108 |
| ITS-LSU-RPB2 | | | 98 | 4120 | 1200 | 0,200±0,003 | 0,140±0,004 | 0,412±0,008 | 120 |

DNA barkodlama çalışmasında kullanılan 120 izolasyonun tamamında DNA ekstraksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği ve kullanılan her üç bölgesinin PCR amplifikasyonlarının %100 başarı ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Gen bölgeleri kullanılarak yapılan sekanslamalarda ve NCI sorgularından elde edilen tanımlama başarıları sırasıyla en yüksek LSU bölgesinde (%98) daha sonra ise ITS (%93) ve RPB2 (%90) bölgelerinden elde edildiği gözlemlenmektedir (Çizelge 4.31). En küçük tür içi ortalama uzaklığı ITS gen bölgesi (0.049±0.0014) en büyük tür içi ortalama uzaklığı LSU gen bölgesinde (0.241±0.004) gözlemlenmiştir. En küçük türler arası ortalama uzaklığı LSU gen bölgesi (0.045±0.007) en büyük türler arası ortalama uzaklığı ise (0.276±0.014) ile ITS gen bölgesi göstermiştir. Ayrışma katsayılarına bakıldığı zaman ise en küçük ayrışma katsayısını LSU gen bölgesi (0.157±0.002) en büyük ayrışma katsayısını ise ITS gen bölgesinin (0.848±0.01) gösterdiği gözlemlenmektedir.

DNA barkodlama çalışmasının yürütülmüş olduğu ve tanımlamaları yapılarak 9 farklı taksonomik grup altında toplanan izolasyonların tamamı üzerinde izolasyon sekansları ve barkod sekansları kullanılarak elde edilen filogenetik ayrım ağaçlarının başarıları her bir

türün kendi taksonunda yer alma yüzdesi göz önünde bulundurularak her bir gen bölgesinin takson bazında değerlendirilmesi yapılmıştır [280]. Bu bağlamda izolasyon sekansları ve barkod sekanslarından elde edilen filogenetik ayırım başarıları aşağıda (Çizelge 4.32 ve Çizelge 4.33)'de verilmiştir.

Çizelge 4.30. İzolasyon sekanslarının takson ayırım başarı yüzdeleri

| | Takson1 (A1) (%) <i>Saccharo mycete sp.</i> | Takson2 (A2) (%) <i>S.cerevisi ae</i> | Takson3 (B1) (%) <i>Cryptoco ccus sp.</i> | Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenish ia sp.</i> | Takson5 (D) (%) <i>Pichia sp.</i> | Takson 6 (E) (%) <i>Candida sp.</i> | Takson 7 (F) (%) <i>Wickeha momyces sp.</i> | Takson8 (G) (%) <i>Metchnikow ia sp.</i> | Takson9 (H) (%) <i>Hansenia spora sp.</i> |
|-------------|--|--|--|---|--------------------------------------|--|--|---|--|
| ITS | 100 | 95,83 | 60 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90,47 | 100 |
| LSU | 100 | 92,30 | 42,85 | 100 | 100 | 100 | 75 | 82,35 | 100 |
| RPB2 | yok | 98,24 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IT-LSU-RPB2 | yok | 95,16 | 90 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Bütün gen bölgelerinin, izolasyonlara ait sekans verilerinin 9 farklı takson grubundaki başarıları değerlendirildiğinde RPB2 gen bölgesinin bütün taksonlarda en yüksek doğrulukta ayırım yaptığı gözlemlenmektedir (Çizelge 4.32). *S.cerevisiae* türleri (Takson2 (A2)) için RPB2 gen bölgesinin başarıları % 98.24, ITS gen bölgesinin ayırım başarıları % 95.83, LSU gen bölgesinin başarıları % 92.3 ve birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB) gen bölgesinin başarıları ise % 95.16 olarak bulunmuştur.

MEME suit programı kullanılarak ortaya konan motif yapıları üzerinden elde edilen barkod bölgelerinin filogenetik ayırım ağacı üzerinden belirlenmiş olan taksonomik grupların ayırımı aşağıda (Çizelge 4.33) değerlendirmeye alınmıştır.

Çizelge 4.31. Barkod sekanslarının takson ayırım başarı yüzdeleri

| | Takson1 (A1) (%) <i>Saccharo mycete sp.</i> | Takson2 (A2) (%) <i>S.cerevis iae</i> | Takson3 (B1) (%) <i>Cryptoco ccus sp.</i> | Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenish ia sp.</i> | Takson5 (D) (%) <i>Pichia sp.</i> | Takson 6 (E) (%) <i>Candida sp.</i> | Takson 7 (F) (%) <i>Wickeha momyces sp.</i> | Takson8 (G) (%) <i>Metchnik owia sp.</i> | Takson9 (H) (%) <i>Hanseniasp ora sp.</i> |
|-------------|--|--|--|---|--------------------------------------|--|--|---|--|
| ITS | 100 | 95,83 | 80 | 100 | 100 | 80 | 100 | 85,71 | 100 |
| LSU | 100 | 96,153 | 100 | 100 | 100 | 75 | 75 | 82,35 | 100 |
| RPB2 | yok | 100 | 66,66 | yok | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IT-LSU-RPB2 | yok | 95,45 | 100 | 100 | 100 | 62,5 | 75 | 100 | 100 |

Ortaya konmuş olan barkod yapılarının filogenetik ayırımı kullanılması sonucunda elde edilen ayırım başarı sonuçlarına (Çizelge 4.33.) baktığımızda takson gruplarındaki en

yüksek başarıyı RPB2 gen bölgesinin verdiği ve motif yapısı ortaya konmamış gen bölgesi sekans verilerine göre genel olarak ayırım başarısının artmış olduğu görülmektedir. Barkod sekans yapıları kullanılarak ortaya konan filogenetik ayırında *S.cerevisiae* türleri için RPB2 gen bölgesi ayırım başarısının % 100, LSU gen bölgesi ayırım başarısının % 96.153, ITS gen bölgesinin ayırım başarısı % 95.83 ve birleştirilmiş gen bölgelerinin (ITS_LSU_RPB2) başarısı ise % 95.45 olarak belirlendiği görülmektedir. RPB2 gen bölgesinin ayırım yapmadaki başarısının yanında bazı türlere ait motif yapısı çıkarılamamış olmasından bu türlerin değerlendirme dışında kalmış olması söylenebilir. Örneğin barkod yapıları kullanarak taksonların ayırımının yapıldığı değerlendirmede Takson-4 (C1) *Naganishia sp.* türleri için bir motif yapısı ortaya konmamış olduğundan değerlendirmeye alınmamış ve Çizelge 4.33.'de değerlendirme "yok" olarak sonuç verilmiştir.

Taksonların birbirlerinden ayırımında kullanılan izolasyonlara ait sekans verileri ve barkod sekans verileri takson ayrışma yüzdeleri ve ayrışma katsayıları karşılaştırıldığında barkod sekanslarının kullanımıyla yapılan ayırımın izolasyon sekans verisi kullanımına kıyasla arttığı görülmektedir (Çizelge 4.32-Çizelge 4.33). Gen bölgelerinin ayrışma katsayıları izolasyon ve barkod yapıları için sırasıyla (ITS, LSU, RPB, birleştirilmiş ITS_LSU_RPB2) 0.848 ± 0.01 , 0.157 ± 0.002 , 0.427 ± 0.011 , 0.412 ± 0.008 ve 0.873 ± 0.01 , 0.725 ± 0.017 , 0.7636 ± 0.0136 , 0.412 ± 0.008 olduğu belirlenmiştir. Ayrışım katsayıları değerlendirildiğinde ITS ve birleştirilmiş gen bölgelerinde barkod sekansları kullanımının ayrışım katsayısı üzerinde büyük bir etkisi olmadığı fakat LSU ve RPB2 gen bölgeleri üzerinde dikkate değer bir artış sağladığı görülmektedir.

Funguslar alemi üzerinde yapılan evrimsel çalışmalarda DNA dizi varyasyonunun kullanımı, 1970'lerin başında moleküler markörlerin organizmalar arasındaki ilişkileri değerlendirmek için araçlar olarak kullanılmaya başlanmasından sonra başlamıştır [281-282]. Çeşitli mantar grupları arasındaki ilişkileri analiz etmek için 5S rRNA gen sekansları ilk kullanım bulan markörler arasındadır. Bununla birlikte, 1990'ların başlarına kadar DNA sekansları fungusların evrimsel ve popülasyon genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmış değildi. Funguslar üzerinde yapılan çalışmalarda moleküler sekansların ilk kabulü büyük ölçüde PCR ve DNA sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler ile olmuştur. Barkodlamayla ilgili yapılan ilk çalışmalarda evrensel olarak kullanılabilen öne sürülen ITS primerlerinin (ITS1 ve ITS4 dahil olmak üzere) çoğu günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır[283].

1990'ların ortalarına gelindiğinde tür tanımlamalarında biyoloji laboratuvarlarında PCR ve DNA dizilimi rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler, ribozomal RNA gen kümesinin birkaç DNA fragmanının fungal DNA sekanslarının kamuya açık veritabanlarında hızlı bir şekilde genişlemesine katkıda bulunmuştur. Örneğin, Kurtzman ve Robnett 1998'de nükleer büyük alt birimin (nLSU veya 28S) ribozomal DNA D1/D2 alanının ilk kapsamlı veri kümesini, yaklaşık 500 ascomycetes mayası için oluşturmuşlardır[284]. Bu alandaki dizi farklılığı kullanılarak tanınan taksonların aslında daha önce tarif edilen türlerin eş anlamlıları olduğunu ortaya koymada ve yakın ilişkili türleri ayırt etmek için kullanılabilir olduğunu bulmuşlardır. D1/D2 bölgesinden türetilmiş filogenetik ağaçların ve *Saccharomyces* kanadının seçilen üyeleri için nükleer küçük alt birim (nSSU, 18S) ribozomal DNA dizilerinin karşılaştırılması, istatistiki olarak benzer iyi desteklenmiş dallarla, iki ağacın oldukça uyumlu olduğunu göstermişlerdir.

Fell ve diğ. (2000) ve Scorzetti ve diğ. (2002) daha sonra basidiomycetes grubu için benzer bir veri seti oluşturmuşlardır[285]. Çoğu basidiomycetes maya türünün, nLSU rRNA'nın D1/D2 bölgesi dizileri kullanılarak ayırt edilebileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, genel olarak, ITS bölgesinin, D1/D2 bölgesinden daha yakın ilişkili türlerin ayırt edilmesinde daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Ek olarak, ribozomal gen kümesinin intergenik aralayıcısının (28S rRNA geninin 3'-ucu ile 18S rRNA geninin 5'-ucu arasında yer alan IGS) bölgesinin ilave farklılaşmaları ayırt etmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Türler ve hatta aynı tür içindeki suşlar arasında D1/D2 alanının dizilim verileri ve daha az ölçüde ITS ve IGS bölgeleri, hem ascomycetes hem de basidiomycetes mayalarda tür tanımlaması ve yeni türlerin tanınması yaklaşımında devrim yaratmıştır [286].

D1/D2 alan sekansları (ve daha az bir ölçüde ITS bölgesi) ascomycetous ve bazidiomycetous mayalarının yeni taksonlarını tanımlamak için gereken standart bilgi olmasına rağmen, filamentöz mantarları tanımlamak için DNA sekansı bilgilerinin gerekliliklerinde önemli farklılıklar olduğu vurgulanmaktadır[287].

Conrad L. Schoch ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada altı DNA bölgesi (ITS, LSU, SSU, RPB1, RPB2, MCM7) funguslar aleminde DNA barkodlamada kullanılmış, 742 suş veya numuneden üretilen diziler kullanılarak dört markörün barkodlama performansı incelenmiş, ve yaklaşık 200 fungustan daha küçük bir alt küme için analiz edilen iki ilave protein kodlama markeri ile karşılaştırmışlardır.

Mitokondriyal sitokrom oksidaz gen bölgesi funguslar alemi için çoğaltılması güç olduğundan, çoğu zaman büyük intronlar içeribileceğinden ve funguslar için yetersiz değişkenlik gösterebildiğinden araştırmaya dahil edilmemiştir. Yapılan çalışmada nükleer ribozomal RNA üç alt birim, üç protein kodlayan gen bölgesi (RNA polimeraz II'nin en büyük alt birimi, RNA polimeraz II'nin ikinci en büyük alt birimi ve minikromozom proteininin bölgeleri) karşılaştırılmıştır. Her ne kadar protein kodlayan gen bölgeleri, ribozomal markörlere kıyasla daha yüksek oranda doğru tanımlamaya sahip olsalar da, düşük PCR amplifikasyonu ve sekanslama başarısı, bunları evrensel bir fungus barkodu için aday olarak gösterilmelerini elimine ettiği belirtilmiştir. Ribozomal gen bölgeleri arasında ITS bölgesi, geniş fungus grupları aralığı için başarılı tanımlama olasılığının en yüksek olduğu ve özel olmayan değişkenlik arasındaki en yüksek barkod boşluğu olasılığına sahip olduğu vurgulanmıştır. Bazı gruplarda popüler filogenetik bir belirteç olan nükleer ribozomal büyük alt birim (LSU), erken ayrılan soylar ve ascomycete mayalar gibi bazı taksonomik gruplarda için üstün tür çözünürlüğüne sahip olduğu belirtilmiştir aksi durumlarda ise ITS'den daha düşük ayrışım sunduğu vurgulanmıştır. Nükleer ribozomal küçük alt birim (SSU), mantarlarda zayıf tür düzeyinde çözünürlüğe sahip olduğu vurgulanmıştır. Ribozomal RNA genlerinin PCR amplifikasyonlarının, funguslar için protein kodlayan markörlerden daha güvenilir olduğunu belirlemişlerdir. Beklendiği gibi PCR başarısı taksonomik gruba göre değişkenlik göstermiştir. Örneğin, ITS PCR amplifikasyon başarısı % 100 (*Saccharomycotina* grubu için) ile % 65 (erken ayrılan soylar için) arasında değişmiştir. Diğer ribozomal belirteçlerin amplifikasyon başarıları benzerlik göstermiş buna karşılık RPB1 için başarı % 80 (*Saccharomycotina* grubu için) ile % 14 (bazal soylar için) arasında değişim gösterdiği vurgulanmıştır. RPB1 gen bölgesi için PCR büyütme problemlerinin % 70 üzerinde olduğu vurgulanmış ve primer başarısızlığının (% 40-50) en büyük problem olarak bildirilmiştir.

Yapılan bu çalışmada elde etmiş oldukları sonuçları doğru tanımlama olasılığı (PCI) ve barkod boşluk analizi üzerinden değerlendirmeye almışlardır. ITS'nin PCI değeri (0.73), RPB1'den (0.76) marjinal olarak düşük bulunduğu vurgulanmıştır. RPB1 çoklu gen karşılaştırmaları ve erken ayrılan soylar hariç, bütün mantar gruplarında tutarlı bir şekilde yüksek seviyede tür ayrımı sağladığı vurgulanmıştır. ITS gen bölgesi en güçlü çözme gücüne *Dikarya* grubu içerisinde yer alan *Basidiomycota* taksonunda göstermiştir (ITS için 0.77 vs. RPB1 için 0.67). *Pezizomycotina* grubu için , RPB1 gen ayırım gücü PCI (0.80), ITS gen ayırım gücü PCI (0.71) daha üstün bulunmuştur. ITS, erken ayrılan

soylarda SSU ve LSU'dan daha düşük ayrımcı güce sahip olabileceği vurgulanmış, ancak hata payları yüksek bulunmuştur. LSU gen bölgesi tüm gruplar arasında değişken seviyelerde PCI (0.66-0.75) değerleri içermiştir fakat genel olarak RPB1 veya ITS'den daha düşük ayırım gücü sergilediği vurgulanmıştır. *Saccharomycotina* grubu için, LSU gen bölgesinin düşük PCI (0.67) sergilediği belirtilmiş, fakat benzer şekilde dört farklı belirteçinde benzer performans gösterdiği vurgulanmıştır. SSU gen bölgesi ise *Peizomycotina* ve *Basidiomycota* gruplarında ayırım yapmada sürekli olarak en kötü performans gösteren gen bölgesi olarak belirtilmiştir. Erken ayrılan soylarda SSU, LSU ile aynı seviyede ayırım başarısı gösterebildiği ve ITS ile RPB1'den daha iyi bir PCI'e sahip olabileceği vurgulanmıştır. Çoklu gen kombinasyonları kullanımında etkili olan iki gen, her ikisi de 0.78'lik bir PCI veren ITS ve RPB1 veya LSU ve RPB1 olarak vurgulanmıştır.

Barkod boşluğu açısından değerlendirme yapıldığında en büyük barkod boşluğunun RPB1 ve ardından ITS için görüldüğü vurgulanmıştır. LSU ve SSU gen bölgelerinin her biri barkod boşluğu konusunda zayıf kaldığı vurgulanmıştır. LSU gen bölgesi SSU gen bölgesine kıyasla barkod boşluğu açısından daha üstün özellikler sağladığı ve amplifikasyon sıralama hizalamada sorunsuz bir şekilde kullanılabilmesi vurgulanmıştır. ITS gen bölgesinin ise barkod boşluğu açısından LSU gen bölgesinden üstün olduğu ve funguslarda barkodlamada LSU gen bölgesinden daha güçlü ayırım yapabildiği vurgulanmıştır. Fungusların atasal yaşları ve çeşitliliği göz önünde alındığında tek bir gen bölgesinin tüm funguslar alemi için tanımlama sağlaması zorlaşabileceği vurgulanmıştır. ITS bölgesi, birkaç liken türünde potansiyel olarak etkili bir DNA barkodu olmasına rağmen, genetik kayma, yavaş gelişen bazı gruplarda soy atalarının polimorfizmlerinin dolayısıyla sınıflandırmada sorun gösterebileceği vurgulanmıştır.

Diğer tek kopya protein kodlama belirteçlerinin iyi barkod performansına sahip olup olmadığını test etmek için RPB1, RPB2 ve MCM7 sekansları bir alt takson kümesi üzerinden test edilmiştir. Bu gen bölgeleri erken ayrılan soylardan ayırım sağlayamamışlardır. Her iki belirteç için, tüm diziler türlere özgü bulunmuştur. İlave iki gen, RPB1'e benzer bir barkodlama performansına sahipken, RPB2, biraz daha üstün sonuçlar vererek RPB1 ve MCM7'den önce yer almıştır.

Protein kodlayan genler, mikolojide popüler filogenetik markörler olduğu vurgulanmakta ve bazı mantar gruplarında sınırlı taksonomik kapsamdaki fiili barkodlar olarak kullanılabilmesi vurgulanmıştır. Daha küçük örnekleme için analiz edilen RPB2 ve MCM7'e temsili bir marker olarak RPB1 üzerinden kıyaslamalar yapmışlardır ve genel

olarak, bu tür protein markörleri daha fazla tür çözme gücüne sahip olabileceğini, ancak PCR ve sekanslama başarısızlıkları onları funguslar aleminin geniş filogenetik kapsamı için potansiyel evrensel barkodlar olarak kullanımını engelleyeceğini vurgulamışlardır [288].

JB Stielow ve ark. tarafından 2015 yılında yapılmış olan çalışmada temel birincil barkod bölgelerine (ITS, LSU) ek olarak kullanılacak ikincil barkod bölgelerinin funguslar aleminde evrensel primer çiftlerinin değerlendirmesini ve bunların ayırım yapmadaki başarılarını araştırmışlardır. Sekiz genetik işaretleyiciyi hedef alan 14 evrensel primer çiftinin amplifikasyon verimleri üzerinden test işlemleri yaparak yaklaşık yirmi bin (19 577) polimeraz zincir reaksiyonunun sonuçlarını değerlendirilmişlerdir. Nükleer ribozomal RNA geni büyük alt biriminin bölümleri (26/28S'nin D1-D2 alanları), bütünleşik kopyalanmış boşluk bölgesi (ITS1/2), kısmi β -tubulin II (*TUB2*), γ -aktin (*ACT*), çeviri uzama faktörü 1- α (*TEF1 α*), ve RNA-polimeraz II'nin büyük ikinci alt birimi (*RPB2*) değerlendirmeye alınmış ve yeni aday primerlerle karşılaştırılmıştır. Bu yeni aday birimler fungal-spesifik translasyon uzama faktörü 3 (*TEF3*), t-RNA için gerekli küçük bir ribozomal protein, *60S L10 (L1) RP*, DNA topoizomeras I (*TOPI*), fosfogliserat kinaz (*PGK*), protein gen bölgesi *LNS2* ve *TEF1 α 'nın* alternatif bölümleridir. Sonuçlar, birkaç gen bölümünün, tek bir PCR-ürünü verecek şekilde evrensel primerlere (veya fila için evrensel primerlere) erişilebilir olduğunu göstermiştir. Barkod boşluğu ve çok boyutlu ölçekleme analizleri, test edilen aday işaretleyicilerin, türlerin tanımlanması için iyi birer barkod adayı yapan yeterli infra ve inter-spesifik varyasyon sağlayan evrensel özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu gen bölümleri arasında, mikolojide filogenetik bir işaretleyici olarak yaygın olarak kullanılan *TEF1 α* için yeni, yüksek kaliteli bir primer çifti, *ITS* gen bölgesine için üstün çözünürlüğe sahip ek bir DNA barkodu potansiyeline sahip olabileceğini belirtilmiştir. *Ascomycota* sınıfı için *TOPI* ve *PGK* gen bölgeleri umut verici sonuçlar elde edebilirken, ribozomal alt birimlerin ve evrensel primerlerin başarısız olduğu *Pucciniomycotina* için *TOPI* ve *LNS2* başarılı sonuçlar verebildiği belirtilmiştir. Genel olarak, yavaş evrimleşen genler (örneğin, *TEF1 α* , *RPB2* ekzonları), derin filogenetik ilişkilerin çıkarılması için daha uygunken, daha yüksek evrim oranlarına sahip olan genler (örneğin, *ITS*, *TUB2*) daha yeni evrimsel ayırım olaylarını yansıttığı belirtilmiştir. Dolayısıyla, bu özelliklerin her ikisini de yansıtan genler veya gen bölümleri, filogenetik sinyal açısından önemli kabul edildiğinde barkod olarak uygun bulunacağı vurgulanmıştır. Protein kodlayan genlerin fragmanlarına daha değişken

intronik ve daha konserve eksonik sekanslar ekleyerek nükleotit sekansları olarak değişkenlik seviyesinden ve amino asit sekansları olarak daha korunmuş kısımlar sağlayarak her iki gereksinimi potansiyel olarak karşılayabileceği vurgulanmıştır. Funguslar grubu söz konusu olduğunda *TEF1α*'nın özellikle çok yönlülük söz konusu olduğundan, rDNA olmayan barkodlar için en ideal adaylardan biri olabileceği vurgulanmıştır. Genomik taramalardan (*TEF1α*) gen fragmanını, evrensel bir ikincil barkod olarak en umut verici aday olarak önermişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada 'birincil barkodlu' numunelerin bilinmeyen veya doğrulanması gerekli türler için ITS ve *TEF1α* ile yapılan barkodlamaların çözünürlüğü artıracaklarını belirtmişlerdir [231].

2019 yılında D.Vu ve ark. tarafından Utrecht Üniversitesi'nde birçok farklı kaynaktan sağlanan filamentli funguslar üzerinde ITS ve LSU gen bölgelerinin DNA barkodu olarak kullanımı ve türlerin ayrımını belirleme üzerine yapılan çalışmada Utrecht, Westerdijk Fungal Biyoçeşitlilik Enstitüsü'nde CBS fungal biobank muhafaza edilmekte olan 17.000 türü içerecek şekilde farklı biyolojik bankalarda yer alan 100.000 mantar suşu çalışmada kullanılmıştır. İki nükleer ribozomal genetik markör dizisi (5.8S genini ITS ve 26S Büyük Alt Biriminin (LSU) D1/D2) alanının DNA barkod verileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 12.000 eski tip ve elle onaylanmış filamentli mantar suşları için 24.000'den fazla DNA barkod dizisi kullanılarak, filamentli mantar türlerini ayırt etmek için optimal kimlik eşiklerinin ITS için % 99.6 ve LSU için % 99.8 olduğu bulunmuştur. Türlerin % 17 ve % 18'inin sırasıyla ITS ve LSU genetik belirteçleri tarafından ayırt edilemediğini gösterilmiştir. Bunlardan, ~% 8 her iki genetik belirteç kullanılarak ayırt edilemediği belirtilmiştir. ITS gen bölgesi LSU gen bölgesine kıyasla filamentli mantar türlerinde, % 82 ile % 77.6 arasında doğru bir tanımlama ve % 84 ile % 77.7 arasında bir kümelenme kalite değeriyle daha iyi performans gösterdiği belirtilmiştir. Daha yüksek taksonomik sınıflandırmalarda, LSU'nun, ITS'den daha iyi bir ayırım gücüne sahip olduğu belirtilmiştir. Genel düzeyde, her iki genetik markör tarafından üretilen kümeleme kalitesi değerleri , cins düzeyinde taksonomik revizyonların gerekliliğini ve muhtemelen daha fazla korunmuş genetik markörlerin veya hatta tüm genomlara uygulanmasının gerekliliğini belirtmişlerdir . Cins, aile, takım ve sınıf seviyelerinde filamentöz fungal tanıma yönelik taksonomik eşikler , ITS barkodlarına göre % 94.3, % 88.5, % 81.2 ve % 80.9 ve LSU'ya göre % 98.2, % 96.2, % 94.7 ve % 92.7 olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada kullanılan DNA barkodları GenBank üzerinden kayıt altına alınmış ve ayrıca Westerdijk

Enstitüsü'nün internet sitesinde, mantarların tanımlanması için referans dizileri olarak kamuya açık olarak sunulmuştur [237].

Asma Asemaninejad ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan metabarkodlama çalışmasında ITS ve LSU gen bölgelerinin ayırma yapmadaki başarılarını araştırmışlardır. Nükleer büyük alt birimin (LSU) ribozomal DNA'sının D1/2 değişken bölgesini hedef alan yeni PCR primerleri tasarlamış ve test etmişlerdir. Bu primerler temelde *Ascomycota* sınıfını ve diğer tüm mantar filumlarının ayırma yapmada kullanılmıştır. Yeni primerlerden LSU200A-F/LSU476A-R (*Ascomycota*) hedef taksonların % 95-98'ini, tüm mantar filumlarında kullanılan LSU200-F/LSU481-R (diğer bütün mantarların) % 72-80'lik hedef okumaları verdiği belirtilmiştir. Her iki primer setinin de oldukça düşük veri kaybı oranlarına sahip oldukları ve birlikte çok çeşitli mantar taksonlarını kapsadığı vurgulanmıştır. *Ascomycota* ve *Basidiomycota* için ITS2, ITS3_KYO2 / ITS4_KYO3 primerlerini kullanarak bir alt grup kümesini amplifiye ederek ve sıralayarak, elde edilen sonuçlar bu primerlerle kıyaslanmıştır. Yaklaşık olarak eşdeğer okuma ile , LSU primerlerinin, ITS2 primerlerinden daha fazla sayıda filogenetik dizi çeşitliliği elde ettiği vurgulanmıştır. LSU primerleri ile güçlü ayrımlar elde edilen *Ascomycota* sınıfında yer alan *Eurotiales*, *Mytilinidiales*, *Pezizales*, *Saccharomycetales*, *Venturiales* üyelerinin yer aldığı, ITS primerleri ile güçlü ayrımları elde edilemediği *Basidiomycota* sınıfında yer alan *Exobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Pucciniomycetes*, *Tremellomycetes* üyelerinden (ITS3_KYO2/ITS4_KYO3) yer aldığı vurgulanmıştır.

ITS2 primerleri kullanılarak elde edilemeyen fakat LSU primerleri kullanılarak geri kazanılan OTU'lar arasında 127 cins 28 tür yer almıştır. Öte yandan ITS2 primerleri LSU primerlerinden herhangi biri kullanılarak elde edilmeyen 16 tür ve 10 benzersiz cins elde edildiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada geliştirilen yeni primer kümeleri, mantar çeşitliliği ve topluluk kompozisyonu çalışmaları için diğer evrensel primerlerin tamamlayıcısı olarak kullanılabilmesi vurgulanmıştır [289].

D.E. Gouliamova ve ark tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada Bulgar gıda ekosisteminde yer alan mayaların biyolojik çeşitliliği araştırılmıştır. Bu çalışmada, 14 maya suşu çeşitli ticari Bulgar gıda ürünlerinden izole edilmiş ve DNA barkodlama analizi ile karakterize edilmiştir. Gerçekleştirilen barkodlama yaklaşımında 26S rDNA kullanılmıştır. Bu çalışmada Bulgar kaynaklı gıdalarda *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Isatchenkia*, *Candida* ve *Rhodotorula*'dan çeşitli mayaların yer aldığı barkodlama yaklaşımı ile gösterilmiştir [238].

Pierce ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları *S. cerevisiae* türünde 20 bazlık gentik delesyonların gen çalışma fonksiyonları üzerindeki etkilerini *S. cerevisiae* kültür havuzunda türlerin başarıyla belirlenebileceğini göstermişlerdir [241].

Francisco ve ark. 2009 yılında genom sekanslama projesinde kullanılmış ve sekans bilgileri olan 55 adetlik *S. cerevisiae* ve *Saccharomyces paradoxus*'un haploid setleri ile yaptıkları barkodlama çalışmasında 6 baz çiftlik spesifik barkodlar üzerinden ayırım yapılabileceğini göstermişlerdir [243].

4.7. Elde Edilen Sonuçların Kayıt Altına Alınması

DNA barkodlama çalışması kapsamında elde edilen izolasyonlar, üzerine uygulanmış olan klasik tanımlama test sonuçları, MALDI-TOF MS tanımlama test sonuçları, DNA izolasyonları gen bölgeleri sekans verileri, gen bölgeleri barkod sekans verileri, moleküler tanımlama test sonuçları ve DNA tabanlı barkodlama süreçleri kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alma sürecinde mikroorganizma bilgi formları ve sorgulama kayıtları şeklinde iki ana kayıt kategorisi oluşturulmuştur. Bilgi formları ve tanımlama test sonuçlarını içeren kayıt verileri bir SQL veri tabanında, HTML, PHP, web arayüzü kullanılarak kayıt altına alınmıştır. Oluşturulan bu kayıt sistemlerin ilerleyen zamanlarda uluslararası kayıt sistemleri ile entegre edilebilmesi için bu sistemlere uygun olarak tasarlanmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen kayıt sorgulama siteminde izolasyon sıra numaraları, izolasyon ID numaraları, izolasyonun tanımlanan tür ismi, izolasyonun takson adı, izolasyonun takson kodu, izolasyonun kaynağı, izolasyonun kaynak kodu, izolasyonun örneklem kodu ve klasik tanımlama sonuçlarından makroskobik, mikroskobik, biyokimyasal test sonuçları yer almaktadır. Kayıt sorgulama sisteminde izolasyon ID numarası ve tür ismi üzerinden kayıtları çağırma ve ilgili kayıt bilgilerini görselleştirme yaklaşımı izlenmiştir.

İzolasyon ID numaraları bölüm 3.2 ve şekil 3.5'de verildiği üzere izolasyonlarla ilgili kodlayıcı bilgileri de bünyesinde taşımaktadır. Örnek bir ID kodu "HUF16M0T10001" şeklinde tasarlanmıştır. Bu bilgiler izolasyon sahibi kuruluş (HU:Hacettepe Üniversitesi), izolasyon sahibi bölüm veya laboratuvar (F:Gıda mühendisliği bölümü), izolasyon yılı (16: 2016, 17: 2017 yılında temin edilmiştir), İzolasyonu yapan kişi (M: Mithat Kurban tarafından izolasyon yapıldığı veya temin edilip saf kültür elde edildiği), izolasyon kaynağı (0:ticari, 1:ulusal üniversiteler, 2:kültür koleksiyonları, 3: üzüm bağı toprak-üzüm örnekleri izolasyonu), bölge ürün türü vb (A: A şehri), alt kaynak ve verilmiş

olan suş numarasından oluşmaktadır. İzolasyonlar yapılan MALDI-TOF ve moleküler tanımlama sonuçlarına göre taksonomik sınıflara ayrılmışlardır. Bu taksonomik gruplar (Takson-1(A2)=*Saccharomycete sp.*, Takson-2(A2)=*S. cerevisiae*, Takson-3(B1)=*Cryptococcus sp.*, Takson-4(C1)=*Nagenishia sp.*, Takson-5(D)=*Pichia sp.*, Takson-6(E)=*Candida sp.*, Takson-7(F)=*Wickehamomyces sp.*, Takson-8(G)=*Metchnikowia sp.*, Takson-9(H)=*Hanseniaspora sp.*, vb.) temel olarak dokuz gruptan oluşmakta ve grup dışı kalan tekli türlerden oluşmaktadır Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28’de gruplandırmalar verilmiştir. Benzer şekilde izolatların hangi kaynaklardan (T=ticari, CC=kültür koleksiyonu, UÜA=Ulusal üniversite araştırmacıları, İ-KAY-16=Kayseri ili 2016 yılı izolasyonu, İ-KAY-17=Kayseri ili 2017 izolasyonu, İ-ANK-17=Ankara ili 2017 izolasyonu vb.) geldiği, kaynak grubu kodları, izolasyonun ID bilgisi, örnek numaraları bigileri de yer almaktadır.

Makroskobik tanımlama sonuçları sorgulamalarında alt tanımlama karakteristikleri olarak renk, vizkozite, parlaklık-saydamlık, form, yayılma durumlarını değerlendirmeleri yer alırken, bu tanımlama başlıkları altında sonuçlar krem renginde gelişim, krem formunda ve kıvamında, yarı parlak-yarı mat, yuvarlak kremi pürüzsüz, yumuşak nemli ve düzgün vb. tanımlayıcı karakteristik sonuçlar verilmiştir.

Mikroskobik tanımlama sorgulamaları altında ise hücre şekli ve hücre dizilişi değerlendirmeleri yer alırken, elde edilen sonuçlar küresel, eliptik, uzun, tomurcuklanmalı hücre şekline ve rasgele dağınık veya kümeleşme şeklinde hücre dağılımına sahip şeklinde tanımlayıcı sonuçlar verilmiştir.

Benzer şekilde biyokimyasal değerlendirme sorgulaması altında ise izolasyonların maltoz, galaktoz, glukoz, rafinoz, sellebiyoz karbonhidrat fermantasyon testleri ve nitrat indirgeme test sonuçları yer almıştır. Bu testlere vermiş olduğu sonuçlar pozitif “+” veya negatif “-” olarak değerlendirilmiştir. İzolasyonlar için oluşturulan kayıt bilgi formlarında izolasyon adı, izolasyon ID’si, izolasyon kaynağı, izolasyon tipi, izolasyon kaynak kodu, takson adı, varsa GPS kodu, izolasyon alt kaynağı, izolasyon yılı, takson kodu, örneklem kodu gibi izolasyonlara ait kayıt bilgileri, klasik tanımlama sonuçları kısmında makroskobik tanımlama sonuçları ve görselleri, mikroskobik tanımlama sonuçları ve görselleri, biyokimyasal tanımlama sonuçları ve görselleri varsa bu tanımlamaların değerlendirmeleri yer almıştır. İzolasyon tanımlama formlarında MALDI-TOF tanımlama sonuçları değerlendirmeleri ve moleküler tanımlama sonuçları ayrı başlıklar halinde yer almıştır. Moleküler tanımlama sonuçlarına göre primer bölgeleri ve sekansları, izolasyon gen bölgeleri sekans verileri , NCBI BLAST sorgulamaları, erişim

numaraları, etkili barkod sekansları, açıklayıcı barkod görselleri, filogenetik takson grupları bilgileri yer almıştır. Son olarak izolasyonların bulundurulma şekilleri, sınıflandırılması, tür tayini varsa alternatif durum ve sinonimleri, güvenlik düzeyi, ürün formatı, depolama koşulları, genotipi, üreme şekli açıklamaları, kullanılan ortamlar, gelişim şartları, varsa geçmiş dökümantasyon bilgilerine yer verilmiştir. Barkod yapılarının ortaya konulduğu izolasyonlar için oluşturulan kayıt bilgi formuna ait bir örnek Ek-A3'de verilmiştir. Değerlendirmeler dikkate alındığında izolasyonların taksonomik gruplara göre dağılımı Takson-1(A2)=*Saccharomycete sp.* 1 adet, Takson-2(A2)=*S. cerevisiae* 64 adet, Takson-3(B1)=*Cryptococcus sp.* 4 adet, Takson-4(C1)=*Nagenishia sp.* 7 adet, Takson-5(D)=*Pichia sp.* 4 adet, Takson-6(E)=*Candida sp.* 8 adet, Takson-7(F)=*Wickehamomyces sp.* 4 adet, Takson-8(G)=*Metchnikowia sp.* 14 adet, Takson-9(H)=*Hanseniaspora sp.* 4 adet ve bunların dışında grup oluşturmayan tekli izolasyonlar *Yarrowia sp.* 1 adet, *Solicoccozyma sp.* 1 adet, *Kluyveromyces sp.* 1 adet izolasyon elde edilmiş ve izolasyon bilgi formlarında kayıt altına alınmıştır. Barkodlama çalışmasında kullanılan 120 izolatın gen bölgelerine göre sekans verileri kayıt altına alınmıştır. Gen bölgelerine göre sekans verilerine baktığımızda ITS bölgesi için 118 adet, LSU bölgesli için 119 adet, RPB2 bölgesi için ise 108 adet izolasyon sekans verisi izolasyon bilgi formlarında kayıt altına alınmıştır. Elde edilen izolatlara ait bilgiler online web sistemi üzerinden (“www.dnabarcodfoodomics.com”) kayıt altına alınmış ve çevrim içi erişime sunulmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında gıda ve diğer biyoteknoloji alanlarında yaygın kullanım alanı bulan ve model bir mikroorganizma olan *S. cerevisiae* maya suşlarının farklı kaynaklardan izolasyonu ve temini sağlanmış, bu izolatların tanımlanması için etkin DNA gen barkod bölgeleri ve başarıları ortaya konulmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada farklı kaynaklardan (Grup 1 = Ticari kaynaklardan (Ulusal ve uluslararası maya üreticisi firmalardan), Grup 2 = Kültür kuruluşlarından (Ulusal ve uluslararası kültür koleksiyonu kuruluşlarından), Grup 3 = Üniversite araştırmacılarından (Ulusal üniversite araştırmacılarından), Grup 4 = İç Anadolu Bölgesi şehirleri üzüm bağlarından toplanan üzüm örneklerinden izole edilen izolatlar) toplam 287 izolasyon elde edilmiştir.

Ön tanımlamalarda *S. cerevisiae* türüne uygun karakteristik özellikler taşıyan, klasik tanımlama yöntemlerine göre (makroskobik, mikroskobik) tanımlamaları yapılan ticari maya üreticisi firmalardan (Grup 1=19 adet), farklı kültür koleksiyonu kuruluşlarından (Grup 2=3 adet), ulusal üniversite araştırmacılarından (Grup 3=(12 adet 2016 yılı) + (33 adet 2018 yılı)), İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan bazı üzüm bağlarından (Grup 4= (31 adet 2016 yılında) + (69 adet 2017 yılında) + (62 adet 2018 yılında)) olmak üzere toplam 229 adet kültür izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tüm bu izolasyonlar üzerinde uygulanan klasik (makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal) tanımlama sonrasında ticari maya üreticisi firmalardan (Grup 1-19 adet), farklı kültür koleksiyonu kuruluşlarından (Grup 2-3 adet), ulusal üniversite araştırmacılarından (Grup 3- (10 adet 2017 yılı) + (31 adet 2018 yılı)), İç Anadolu Bölgesi'nde şehirleri üzüm bağlarından ((Grup 4-28 adet 2016 yılı) + (Grup 4-60 adet 2017 yılı) + (Grup 4-56 adet 2018 yılı)) olmak üzere toplam 207 adet *S. cerevisiae* maya karakteristiğine uygun izolat eldesi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen suşlar üzerine tanımlama amacıyla ilk aşamada klasik tanımlama yöntemleri (makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal) uygulanmıştır. Bütün izolasyonların makroskobik, mikroskobik koloni morfolojileri ve biyokimyasal test sonuçları *S. cerevisiae* uygunluğu yönünden değerlendirmeye alındığında toplam 207 adet suşun *S. cerevisiae* türü makroskobik, mikroskobik ve biyokimyasal test sonuçları karakteristiklerine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Klasik yöntemler kullanılarak tanımlamaları yapılmış ve *S. cerevisiae* türüne ait klasik tanımlama özellikleri gösterdiği tespit edilen izolatların tanımlamasında MALDI-TOF MS tanımlama yöntemi kullanılarak ileri tanımlama yapılmış ayrıca bu sonuçlar moleküler tanımlama sonuçları ile de karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS analiz sonuçlarına baktığımızda klasik yöntemle tanımlamaları yapılarak *S. cerevisiae* türüne ait olduğu düşünülen 207 adet izolasyondan 152 tanesi *S. cerevisiae* türü olarak tanımlanmıştır.

DNA barkodlarının ortaya konması süreci ise 2016 ve 2017 yılında temini ve izolasyonları gerçekleştirilen ve klasik tanımlama yöntemleri ile tanımlamaları yapılmış olan 120 izolat üzerinden yürütülmüştür.

DNA barkodlamada kullanılacak ve ön tanımlamalarla 120'si *S. cerevisiae* türüne özgü klasik tanımlama karakteristiği seğilediği tespit edilen bu izolasyonların karşılaştırmalı MALDI-TOF MS kromatogramları, moleküler tanımlama sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde ise 64 izolatın *S. cerevisiae* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Bu tanımlama yöntemi sonucunda elde edilen sonuçlar (Çizelge 4.19., Çizelge 4.20., Çizelge 4.21., ve Çizelge 4.22.)'de moleküler tanımlama sonuçları ile birlikte verilmiştir. Gerçekleştirilen MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları ile moleküler yöntem sorgulamalarını karşılaştırdığımızda ise moleküler tanımlama ile *Metschnikowia* sp. olarak tanımlanan izolatlardan yalnızca üçünün (HUF17M3F31135, HUF17M3F21123, HUF17M3F21125) MALDI-TOF MS analizi ile *S. cerevisiae* olarak tanımlandığı tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.19. ve Çizelge 4.21.) sonuçların *S. cerevisiae* olarak tespitinde %98.87 benzerlik gösterdiği görülmektedir. Moleküler tanımlama ile *S. cerevisiae* türünden farklı cins ve türde olduğu tespit edilen izolatların MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında ise (Çizelge 4.20. ve Çizelge 4.22.) MALDI-TOF MS tanımlama ile moleküler tanımlama sonuçlarının birbirinden oldukça farklı tür ve cins olarak çıktıkları görülmektedir. Ayrıca MALDI-TOF MS ve moleküler tanımlama yöntemleri kullanılarak tanımlanan izolatların temin edildiği kaynağa göre hangi mikroorganizma grubundan kaç adet bulunduğunu veren özet çizelgeler yukarıda (Çizelge 4.23., Çizelge 4.24., Çizelge 4.25., Çizelge 4.26.,)'da gösterilmiştir. Gerçekleştirilen tüm bu tanımlamalar doğrultusunda DNA barkodlamada kullanılan 120 izolasyon farklı taksomomik gruplara, izolasyon yıllarına ve kaynağına göre gruplandırmalara ayrıldığı özet tablolar yukarıda (Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.30) verilmiştir.

DNA barkod gen bölgelerinin belirlenmesi için literatür taramaları göz önünde bulundurularak izolasyonlar üzerinde ITS, SSU, LSU, TOP1 ve RPB1, RPB2 gibi yüksek korunmuş gen bölgeleri için ön deneme PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR reaksiyonları için jel görüntüleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonlarında elde edilen jel görüntüleri değerlendirmeleri sonucunda *S. cerevisiae* türü için başarılı amplifikasyon sonucu veren gen bölgelerinin (ITS, LSU ve RPB2) çalışmanın ilerleyen aşamalarında barkod gen bölgeleri olarak araştırılmasına karar verilmiştir.

Elde edilen bu ön değerlendirme sonuçları göz önünde bulundurularak ilgili gen bölgelerinin (ITS, LSU, RPB2) sekans verilerinin elde edilebilmesi için 120 adet izolasyon üzerinde DNA ekstraksiyonu, PCR reaksiyonları, jel görüntülemeleri yapılmış ve elde edilen PCR ürünleri sekanslama analizlerine tabi tutulmuştur.

ITS, LSU, RPB2 gen bölgelerinin ilk aşamada PCR jelleri incelendiğinde ITS gen bölgesi için bant ayrımlarının mikroorganizma takson ayrımlarına göre bant büyüklüklerine dağılım gösterebildiği gözlemlenmiştir. LSU gen bölgesinde ise jel görüntülerinin izolasyonların tamamı için tek bant oluşumu gözlemlenmiş taksonlara göre ayırım gerçekleşmemiştir. RPB2 gen bölgesi jel görüntülerinde ise her bir izolasyonda çoklu bant oluşumu gözlemlenmiş bu sebeple bu gen bölgelerinin jel görüntüleri üzerinden bir ayırma gidilemediği gözlemlenmiştir. RPB2 gen bölgesindeki çoklu bant oluşum durumu jel saflaştırma yoluyla giderilmiştir. ITS, LSU, RPB2 gen bölgelerinin sekans analizleri sonucunda elde edilen (ITS gen bölgesi için ortalama 820 bp, LSU gen bölgesi için ortalama 1100 bp, RPB2 gen bölgesi için ortalama 1200 bp'lik) sekans verileri elde edilmiştir.

Bütün izolasyonlardan ilgili gen bölgeleri (ITS, LSU, RPB2) için elde edilen sekans verileri veri ön işlemlerine tabi tutulduktan sonra NCBI veritabanı üzerinden BLAST sorgulamaları yapılarak moleküler düzeyde tanımlamaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20). Moleküler tanımlama sonrasında bütün tanımlama sonuçları göz önünde bulundurularak, tanımlamaları gerçekleştirilen suşların yakınlık uzaklık ilişkilerinin ortaya konması amacıyla ClustalW yazılımı aracılığı ile filogenetik ilişkileri çıkarılmıştır. Filogenetik yakınlık uzaklık değerlendirmeleri göz önünde bulundurularak DNA barkodlarının değerlendirilmesi ilgili bu gen bölgeleri dikkate alınarak yorumlanmıştır.

Veri analizleri sonucunda ITS, LSU ve RPB2 gen bölgelerinin *S. cerevisiae* ayrımını yapmada farklı başarı sonuçları verdiği gözlemlenmiştir. Her üç bölgenin başarılı ayrımlar yapabildiği söylenebilirken genel taksonomik ayrımlarda RPB2 gen bölgesinin başarısı ITS ve LSU gen bölgelerine kıyasla daha yüksek bulunmuş fakat RPB2 gen bölgesinde çoklu bant sorunu gözlemlenmiştir.

İzolasyonlara ait sekans verileri kullanıldığında *S.cerevisiae* türleri (Takson2 (A2)) için RPB2 gen bölgesinin ayırım başarısı % 98.24, ITS gen bölgesinin ayırım başarısı % 95.83, LSU gen bölgesinin ayırım başarısı % 92.3 ve birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB) gen bölgesinin başarısı ise % 95.16 olarak belirlenmiştir.

Barkod sekans yapıları kullanılarak ortaya konan filogenetik ayırmada *S.cerevisiae* türleri için RPB2 gen bölgesi ayırım başarısının % 100, LSU gen bölgesi ayırım başarısının % 96.153, ITS gen bölgesinin ayırım başarısı % 95.83 ve birleştirilmiş gen bölgelerinin (ITS_LSU_RPB2) başarısı ise % 95.45 olarak belirlendiği görülmektedir.

LSU gen bölgesinde farklı taksonlardaki izolasyonların, izolasyon sekans verisi filogenetik ayrımında birbiriyle karışma durumu daha sık gözlemlenmiş fakat barkod yapısı kullanımının LSU ve RPB2 gen bölgeleri için başarı durumunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

RPB2 gen bölgesinin ayırım yapmadaki başarısının yanında bazı türlere ait motif yapısı çıkarılamamış olmasından bu türlerin değerlendirme dışında kalmış olması söylenebilir. MEGA yazılımı kullanılarak elde edilen gen bölgelerinin filogenetik ayrışma katsayıları izolasyon sekansları ve barkod sekansları için sırasıyla (ITS, LSU, RPB2 ve birleştirilmiş ITS_LSU_RPB2) 0.848 ± 0.01 , 0.157 ± 0.002 , 0.427 ± 0.011 , 0.412 ± 0.008 ve 0.873 ± 0.01 , 0.725 ± 0.017 , 0.7636 ± 0.0136 , 0.412 ± 0.008 olarak belirlenmiştir. Gen bölgelerinin taksonomik sınıfları ayırmada kullanılacak açıklayıcı barkod yapıları Ek A2'de verilmiştir.

Elde edilen izolasyonları kaynaklarına (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4), coğrafik konumlarına ve yıllara göre *S.cerevisiae* türünün ayrımı yönünden değerlendirmesi yapıldığında ise ayırım konusunda homojen bir ayırım olduğu söylenememiştir.

Sonuç olarak, ITS, LSU ve RPB2 barkod bölgelerinin *S. cerevisiae* için türler arası ve tür içi ayırım ile tanımlamada tutarlı bir performans ile kullanılabileceği saptanmıştır. Çalışmada tespit edilen *S. cerevisiae* olmayan mayaların cins ve tür düzeyinde tanımlanması ve filogenetik ilişkilerinin tutarlı bir biçimde ortaya konulabilmesi ise seçilen gen bölgelerinin funguslarda cins ve türler arası ayırım gerçekleştirebildiği yönünde değerlendirilmiştir.

Elde edilen saf kültürler yatık agarlı besiyerinde 4 °C’de ve % 50 gliserol içeren ortamda, -18 °C’de stoklanmışlardır.

Saccharomyces cerevisiae DNA barkodunun elde edilmesi çalışmasında elde edilen izolatlara ait bilgiler bir veritabanında web uygulaması altında kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alma sürecinde mikroorganizmaların bilgi formları ve sorgulama kayıtları şeklinde iki ana kayıt kategorisi oluşturulmuştur. Bilgi formları ve tanımlama test sonuçlarını içeren kayıt verileri bir excel, SQL veri tabanında, HTML, PHP, web arayüzü sisteminde kayıt altına alınmıştır. İlgili kayıt bilgilerine “www.dnabarcodfoodomics.com” web linkinden ulaşılabilmektedir. Oluşturulan bu kayıt sistemlerinin ilerleyen zamanlarda uluslararası kayıt sistemleri ile entegre edilebilmesi için bu sistemlere uygun olarak tasarlanmasına dikkat edilmiştir.

Sonuç olarak DNA barkod bilgilerinin oluşturulması, kayıt altına alınması ve böylece bu konudaki bilgiye hızlı erişim sağlanması, önemli bir uluslararası maya üreticisi olan ülkemizde bu alanda rekabet edebilme gücüne katkı sağlaması yönünde bir adım atılmıştır.

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışması sonuçları ve incelenen literatür çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda funguslar aleminde yer alan tür cins ve taksonların tanımlama ve sınıflamalarında DNA barkodlamanın kullanımı incelenen türlere bağlı olarak etkin barkod bölgelerinin tespit edilmesi gerektiğini göstermektedir. Funguslar alemi gün geçtikçe yeni türlerin tespit edildiği ve kayıt ve incelemeye alındığı geniş bir canlı sınıfını bünyesinde barındırmaktadır. Tanımlama ve sınıflamada araştırılan barkod gen bölgelerinin ayırım yapmadaki başarıları birkaç farklı açıdan değerlendirmeye alınmaktadır. İncelenen gen bölgesinin organel veya çekirdek gen bölgesinde yer alması, tür içi ve türler arası korunmuş olup olmaması, barkod boşluğu taşıyıp taşıyamaması, gen aktarımları veya duplikasyonlarından etkilenip etkilenmemesi, seçilen primerlere bağlı olarak PCR amplifikasyonlarının düzgün sonuçlanması, elde edilen sekans verilerinin hizalama ve filogenetik oluşumlara elverişli olması gibi birçok nokta DNA barkodlamada önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışmada farklı kaynaklardan elde edilen maya türlerinin ve özellikle *S.cerevisiae* türlerinin DNA barkod bölgelerinin tespiti ve başarılarının ölçülmesinde birçok farklı gen bölgesi dikkate alınarak çalışmaya başlanılmış ve sonuçta etkin kullanılabilir üç gen bölgesi (ITS, LSU, RPB2) üzerinde durulmuş ve bunların DNA barkodlamadaki başarıları değerlendirmeye alınmıştır. İlerleyen çalışmalarda yön gösterici olması açısından elde edilen sonuçlar doğrultusunda

RPB2 gen bölgesinin ayırım yapmada başarılı sonuç vermesi fakat PCR amplifikasyonlarının düşük olmasına bağlı olarak bu gen bölgesinin amplifikasyon başarısını arttıracak daha özel primer bölgelerinin araştırılması üzerine durulabması elde edilen barkodlama başarısını arttırabileceğini düşünmekteyiz. Barkodlamada barkod sekansı kullanımının ilgili gen bölgelerinde ayırım yapma başarısını arttırdığı gözlemlenmiştir bu noktada barkod sekansı elde etmede yeni yaklaşımlar üzerinde durularak güçlendirme sağlanabileceğini düşünmekteyiz. Çoklu gen bölgeleri alternatif bir çözüm olarak taksonomik alt gruplamalar üzerinde başarılı sonuçlar elde etmeyi sağlayabileceği çalışma sonucunda varılan sonuçlar arasındadır.

Dünyada var olan biyoçeşitliliğin kayıt altına alınması ve hızlı tespit tanısı için birçok organizasyon ve konsorsiyum bulunmaktayken ülkemizde biyoçeşitliliğin barkodlanması ve kayıt altına alınması konusunda herhangi bir veri tabanı henüz bulunmaması önemli bir eksiklik olarak görülmektedir. Bu konuda farklı canlı gruplarıyla çalışan araştırmacıların ortak bir çatı altında DNA barkodlama yaklaşımından faydalanarak bir oluşum içerisinde yer alabilmeleri olumlu kazanımlar elde edilmesini sağlayacağını düşünmekteyiz. Oluşturulacak olan ortak sistemin uluslararası sistemlerle entegrasyonun uyumlu olması bu alandaki araştırmaları hızlandıracağını düşünmekteyiz. *S. cerevisiae* türlerine dayalı maya sektörü ülkemizde önemli bir ekonomik sektörü oluşturduğundan elde edilen izole türlerin tanımlanıp sınıflandırılıp fizyolojik testleri yapıp oluşturulmuş olan böyle bir veri tabanı altında kayıt altına alınmasının önem teşvik etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] D. E. Arnot, C. Roper, R. A. Bayoumi, Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates, *Mol Biochem Parasitol*, 61 (1993) 15-24.
- [2] N. L. Anderson, N. M. Parish, J. P. Richardson, T. W. Pearson, Comparison of African trypanosomes of different antigenic phenotypes, subspecies and life cycle stages by two-dimensional gel electrophoresis, *Mol Biochem Parasitol*, 16 (1985) 299-314.
- [3] J. L. Hubby, R. C. Lewontin, A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*, *Genetics*, 54 (1966) 577-594.
- [4] F. O. Costa, G. R. Carvalho, The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish, *Genomics, Society and Policy*, 3 (2007) 29.
- [5] J. Heinrichs, H. P. Kreier, K. Feldberg, A. R. Schmidt, R. L. Zhu, B. Shaw, A. J. Shaw, V. Wissemann, Formalizing morphologically cryptic biological entities: new insights from DNA taxonomy, hybridization, and biogeography in the leafy liverwort *Porella platyphylla* (Jungermanniopsida, Porellales), *American journal of botany*, 98 (2011) 1252-1262.
- [6] M. Hajibabaei, G. A. Singer, P. D. Hebert, D. A. Hickey, DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, *TRENDS in Genetics*, 23 (2007) 167-172.
- [7] B. A. Butcher, M. A. Smith, M. J. Sharkey, D. L. Quicke, A turbo-taxonomic study of Thai *Aleiodes* (*Aleiodes*) and *Aleiodes* (*Arcaleiodes*)(Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae) based largely on COI barcoded specimens, with rapid descriptions of 179 new species, *Zootaxa*, 3457 (2012) 232.
- [8] R. Yılmaz, DNA Barcoding for MPR Fruit and Vegetables, *Preservation methods for minimally processed refrigerated fruits and vegetables, Minimally processed refrigerated fruits & vegetables, Springer, (2017), pp. 639-649.*
- [9] X.-B. Wang, J. Deng, J.-T. Zhang, Q.-S. Zhou, Y.-Z. Zhang, S.-A. Wu, DNA barcoding of common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China, *Bulletin of entomological research*, 105 (2015) 545-554.
- [10] B. H. Holmes, D. Steinke, R. D. Ward, Identification of shark and ray fins using DNA barcoding, *Fisheries Research*, 95 (2009) 280-288.
- [11] R. Hanner, S. Becker, N. V. Ivanova, D. Steinke, FISH-BOL and seafood identification: Geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada, *Mitochondrial DNA*, 22 (2011) 106-122.
- [12] S. G. Newmaster, M. Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam, S. Ragupathy, DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products, *BMC medicine*, 11 (2013) 222.
- [13] V. A. Brugman, L. M. Hernández-Triana, S. W. Prosser, C. Weland, D. G. Westcott, A. R. Fooks, N. Johnson, Molecular species identification, host preference and detection of myxoma virus in the *Anopheles maculipennis*

- complex (Diptera: Culicidae) in southern England, UK, *Parasites & vectors*, 8 (2015) 421.
- [14] C. Saccone, C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole, A. Reyes, Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system, *Gene*, 238 (1999) 195-209.
- [15] P. D. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Dewaard, Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (2003) 313-321.
- [16] J. G. Lorenz, W. E. Jackson, J. C. Beck, R. Hanner, The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1869-1877.
- [17] W. Lakra, M. Verma, M. Goswami, K. K. Lal, V. Mohindra, P. Punia, A. Gopalakrishnan, K. Singh, R. D. Ward, P. Hebert, DNA barcoding Indian marine fishes, *Molecular Ecology Resources*, 11 (2011) 60-71.
- [18] R. D. Ward, R. Hanner, P. D. Hebert, The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL, *Journal of fish biology*, 74 (2009) 329-356.
- [19] C. Oliveira, DNA barcodes identify marine fishes of So Paulo State, Brazil, *Mol Ecol Resour*, 12 (2012) 1755-0998.12007.
- [20] M. Landi, M. Dimech, M. Arculeo, G. Biondo, R. Martins, M. Carneiro, G. R. Carvalho, S. L. Brutto, F. O. Costa, DNA barcoding for species assignment: the case of Mediterranean marine fishes, *PLoS one*, 9 (2014) e106135.
- [21] M. Bariche, M. Torres, C. Smith, N. Sayar, E. Azzurro, R. Baker, G. Bernardi, Red Sea fishes in the Mediterranean Sea: a preliminary investigation of a biological invasion using DNA barcoding, *Journal of Biogeography*, 42 (2015) 2363-2373.
- [22] J. L. Bennetzen, B. D. Hall, Codon selection in yeast, *Journal of Biological Chemistry*, 257 (1982) 3026-3031.
- [23] C. P. Meyer, G. Paulay, DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling, *PLoS biology*, 3 (2005) e422.
- [24] R. Collins, R. Cruickshank, The seven deadly sins of DNA barcoding, *Molecular Ecology Resources*, 13 (2013) 969-975.
- [25] G. W. Saunders, A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*-*Neodilsea* complex and *Weeksia*, *Botany*, 86 (2008) 773-789.
- [26] S. Seena, C. Pascoal, L. Marvanová, F. Cássio, DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species, *Fungal Diversity*, 44 (2010) 77-87.
- [27] W. J. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, D. H. Janzen, Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (2005) 8369-8374.
- [28] M. W. Chase, N. Salamin, M. Wilkinson, J. M. Dunwell, R. P. Kesanakurthi, N. Haidar, V. Savolainen, Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1889-1895.

- [29] R. D. Barrett, P. D. Hebert, Identifying spiders through DNA barcodes, *Canadian Journal of Zoology*, 83 (2005) 481-491.
- [30] R. D. Ward, T. S. Zemplak, B. H. Innes, P. R. Last, P. D. Hebert, DNA barcoding Australia's fish species, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1847-1857.
- [31] P. D. Hebert, M. Y. Stoeckle, T. S. Zemplak, C. M. Francis, Identification of birds through DNA barcodes, *PLoS biology*, 2 (2004) e312.
- [32] J. H. Robins, M. Hingston, E. MATISOO-SMITH, H. A. Ross, Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA, *Mol Ecol Notes*, 7 (2007) 717-729.
- [33] P. Kuksa, P.-H. Huang, V. Pavlovic. Efficient use of unlabeled data for protein sequence classification: a comparative study. *BMC bioinformatics*. (2009).
- [34] H. Fukami, A. F. Budd, G. Paulay, A. Solé-Cava, C. A. Chen, K. Iwao, N. Knowlton, Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals, *Nature*, 427 (2004) 832.
- [35] G. Giribet, Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A new paradigm for the Cambrian explosion?, *Molecular phylogenetics and evolution*, 24 (2002) 345-357.
- [36] K. J. Gaston, M. A. O'Neill, Automated species identification: why not?, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359 (2004) 655-667.
- [37] C. Mora, D. P. Tittensor, S. Adl, A. G. Simpson, B. Worm, How many species are there on Earth and in the ocean?, *PLoS biology*, 9 (2011) e1001127.
- [38] L. Bittner, S. Halary, C. Payri, C. Cruaud, B. de Reviers, P. Lopez, E. Bapteste, Some considerations for analyzing biodiversity using integrative metagenomics and gene networks, *Biology direct*, 5 (2010) 47.
- [39] M. Kuch, N. Rohland, J. L. Betancourt, C. Latorre, S. Steppan, H. N. Poinar, Molecular analysis of a 11 700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile, *Molecular ecology*, 11 (2002) 913-924.
- [40] F. Rollo, M. Ubaldi, L. Ermini, I. Marota, Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 12594-12599.
- [41] P. D. Hebert, S. Ratnasingham, J. R. de Waard, Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (2003) S96-S99.
- [42] J. Waugh, DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls, *BioEssays*, 29 (2007) 188-197.
- [43] M. Hajibabaei, D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs, P. D. Hebert, DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (2006) 968-971.
- [44] M. Lynch, P. Jarrell, A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA, *Genetics*, 135 (1993) 1197-1208.

- [45] D. J. Funk, K. E. Omland, Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34 (2003) 397-423.
- [46] D. Rubinoff, Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation, *Conserv Biol*, 20 (2006) 1026-1033.
- [47] S. M. Scicluna, B. Tawari, C. G. Clark, DNA barcoding of *Blastocystis*, *Protist*, 157 (2006) 77-85.
- [48] M. Vences, M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari, D. R. Vieites, Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians, *Front Zool*, 2 (2005) 5.
- [49] M. Virgilio, T. Backeljau, B. Nevado, M. De Meyer, Comparative performances of DNA barcoding across insect orders, *BMC bioinformatics*, 11 (2010) 206.
- [50] T. Moura, M. C. Silva, I. Figueiredo, A. Neves, P. D. Muñoz, M. M. Coelho, L. S. Gordo, Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries management and conservation, *Marine and Freshwater Research*, 59 (2008) 214-223.
- [51] D. Erpenbeck, G. Woerheide, On the molecular phylogeny of sponges (Porifera), *Zootaxa*, 1668 (2007) 107-126.
- [52] S. Kiewnick, M. Holterman, S. van den Elsen, H. van Megen, J. E. Frey, J. Helder, Comparison of two short DNA barcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives, *European Journal of Plant Pathology*, 140 (2014) 97-110.
- [53] Y. Xia, H. F. GU, R. Peng, Q. Chen, Y. C. ZHENG, R. W. Murphy, X. M. ZENG, COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae), *Molecular Ecology Resources*, 12 (2012) 48-56.
- [54] W. J. Kress, K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, D. H. Janzen, Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 8369-8374.
- [55] C. P. W. Group, P. M. Hollingsworth, L. L. Forrest, J. L. Spouge, M. Hajibabaei, S. Ratnasingham, M. van der Bank, M. W. Chase, R. S. Cowan, D. L. Erickson, A DNA barcode for land plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 12794-12797.
- [56] E. a. L. K. G. N. M. H. Aron J. Fazekas, *DNA Barcoding Methods for Land Plants*, Springer, (2012).
- [57] U. Eberhardt, *Methods for DNA Barcoding of Fungi*, Springer, USA, 2012.
- [58] J. W. Taylor, E. Turner, A. Pringle, J. Dettman, H. Johannesson, Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection, *Fungi in the Environment*, (2006) 313-339.
- [59] B. T. Dentinger, M. Y. Didukh, J.-M. Moncalvo, Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina), *PLoS one*, 6 (2011) e25081.

- [60] S. R. Gilmore, T. Graefenhan, G. LOUIS-SEIZE, K. A. Seifert, Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*, *Molecular Ecology Resources*, 9 (2009) 90-98.
- [61] S. Ratnasingham, P. D. Hebert, bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>), *Mol Ecol Notes*, 7 (2007) 355-364.
- [62] D. C. M. Gary W. Saunders, *Methods for DNA Barcoding Photosynthetic Protists Emphasizing the Macroalgae and Diatoms*, Springer, USA, 2012.
- [63] F. Austerlitz, O. David, B. Schaeffer, K. Bleakley, M. Olteanu, R. Leblois, M. Veuille, C. Laredo, DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods, *BMC bioinformatics*, 10 (2009) S10.
- [64] M. Blaxter, J. Mann, T. Chapman, F. Thomas, C. Whitton, R. Floyd, E. Abebe, Defining operational taxonomic units using DNA barcode data, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1935-1943.
- [65] M. Jones, A. Ghoorah, M. Blaxter, jMOTU and taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units, *PLoS one*, 6 (2011) e19259.
- [66] N. Puillandre, A. Lambert, S. Brouillet, G. Achaz, ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Molecular ecology*, 21 (2012) 1864-1877.
- [67] X. Hao, R. Jiang, T. Chen, Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering, *Bioinformatics*, 27 (2011) 611-618.
- [68] J. Pons, T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin, A. P. Vogler, Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects, *Systematic biology*, 55 (2006) 595-609.
- [69] S. Ratnasingham, P. D. Hebert, A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system, *PLoS one*, 8 (2013) e66213.
- [70] M. V. Matz, R. Nielsen, A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1969-1974.
- [71] H. A. Ross, S. Murugan, W. L. Sibon Li, Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation, *Systematic biology*, 57 (2008) 216-230.
- [72] R. Nielsen, M. Matz, Statistical approaches for DNA barcoding, *Systematic biology*, 55 (2006) 162-169.
- [73] R. DeSalle, M. G. Egan, M. Siddall, The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360 (2005) 1905-1916.
- [74] I. N. Sarkar, P. J. Planet, R. Desalle, CAOS software for use in character-based DNA barcoding, *Molecular Ecology Resources*, 8 (2008) 1256-1259.
- [75] P. Bertolazzi, G. Felici, E. Weitschek, Learning to classify species with barcodes, *BMC bioinformatics*, 10 (2009) S7.
- [76] A. Cywinska, F. Hunter, P. D. Hebert, Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes, *Medical and veterinary entomology*, 20 (2006) 413-424.

- [77] S. Ingrisch, EVOLUTION OF THE CHORTHIPPUS BIGUTTULUS GROUP (ORTHOPTERA, ACRIDITAE) IN THE ALPS, BASED ON MORPHOLOGY AND STRIDULATION, *Revue suisse de Zoologie*, 102 (1995) 475-535.
- [78] F. Rindi, M. D. Guiry, J. M. López-Bautista, DISTRIBUTION, MORPHOLOGY, AND PHYLOGENY OF KLEBSORMIDIUM (KLEBSORMIDIALES, CHAROPHYCEAE) IN URBAN ENVIRONMENTS IN EUROPE 1, *Journal of Phycology*, 44 (2008) 1529-1540.
- [79] L. Packer, J. Gibbs, C. Sheffield, R. Hanner, DNA barcoding and the mediocrity of morphology, *Molecular Ecology Resources*, 9 (2009) 42-50.
- [80] C. Gutiérrez-Gutiérrez, C. Cantalapiedra-Navarrete, M. Montes-Borrego, J. E. Palomares-Rius, P. Castillo, Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167 (2013) 473-500.
- [81] J. C. Nekola, M. Barthel, Morphometric analysis of the genus *Carychium* in the Great Lakes region of North America, *Journal of Conchology*, 37 (2002) 515-532.
- [82] A. Valentini, F. Pompanon, P. Taberlet, DNA barcoding for ecologists, *Trends in ecology & evolution*, 24 (2009) 110-117.
- [83] M. Hajibabaei, S. Shokralla, X. Zhou, G. A. Singer, D. J. Baird, Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos, *PLoS one*, 6 (2011).
- [84] B. W. Sweeney, J. M. Battle, J. K. Jackson, T. Dapkey, Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality?, *Journal of the North American Benthological Society*, 30 (2011) 195-216.
- [85] J. Azpurua, D. De La Cruz, A. Valderama, D. Windsor, *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (2010) e627.
- [86] N. Dawnay, R. Ogden, R. McEwing, G. R. Carvalho, R. S. Thorpe, Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification, *Forensic Sci Int*, 173 (2007) 1-6.
- [87] A. N. Muellner, H. Schaefer, R. Lahaye, Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae), *Mol Ecol Resour*, 11 (2011) 450-460.
- [88] C. S. Baker, G. M. Lento, F. Cipriano, S. R. Palumbi, Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets, *Proc Biol Sci*, 267 (2000) 1191-1199.
- [89] D. H. Phua, G. Cham, E. Seow, Two instances of Chinese herbal medicine poisoning in Singapore, *Singapore Med J*, 49 (2008) e131-133.
- [90] M. A. Smith, B. L. Fisher, P. D. Hebert, DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360 (2005) 1825-1834.
- [91] J. Rivera, D. C. Currie, Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae), *Molecular Ecology Resources*, 9 (2009) 224-236.

- [92] J. M. Burns, D. H. Janzen, M. Hajibabaei, W. Hallwachs, P. D. Hebert, DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 6350-6355.
- [93] P. Paquin, M. Hedin, The power and perils of ‘molecular taxonomy’: a case study of eyeless and endangered *Cicurina* (Araneae: Dictynidae) from Texas caves, *Molecular ecology*, 13 (2004) 3239-3255.
- [94] O. Jousson, P. Bartoli, J. Pawlowski, Molecular identification of developmental stages in *Opecoelidae* (Digenea), *International Journal for Parasitology*, 29 (1999) 1853-1858.
- [95] B. S. Dezfuli, S. Capuano, L. Congiu, Identification of life cycle stages of *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda: Spathebothriidea) using molecular techniques, *Journal of Parasitology*, 88 (2002) 632-634.
- [96] K. B. Miller, Y. Alarie, G. W. Wolfe, M. F. Whiting, Association of insect life stages using DNA sequences: the larvae of *Philodytes umbrinus* (Motschulsky)(Coleoptera: Dytiscidae), *Systematic Entomology*, 30 (2005) 499-509.
- [97] C. Fox, M. I. Taylor, R. Pereyra, M. Villasana, C. Rico, TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of spawning areas using egg-based methods, *Molecular ecology*, 14 (2005) 879-884.
- [98] V. Savolainen, R. S. Cowan, A. P. Vogler, G. K. Roderick, R. Lane, Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360 (2005) 1805-1811.
- [99] R. Floyd, E. Abebe, A. Papert, M. Blaxter, Molecular barcodes for soil nematode identification, *Mol Ecol*, 11 (2002) 839-850.
- [100] N. Puillandre, P. Bouchet, M. C. Boisselier-Dubayle, J. Brisset, B. Buge, M. Castelin, S. Chagnoux, T. Christophe, L. Corbari, J. Lambourdiere, P. Lozouet, G. Marani, A. Rivasseau, N. Silva, Y. Terryn, S. Tillier, J. Utge, S. Samadi, New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process, *Mol Ecol Resour*, 12 (2012) 396-402.
- [101] H. Song, J. E. Buhay, M. F. Whiting, K. A. Crandall, Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 13486-13491.
- [102] K. W. Erickson DL, DNA barkodları: yöntemler ve protokoller. , *Mol Bio.*(2012).
- [103] N. J. Besansky, D. W. Severson, M. T. Ferdig, DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you, *Trends in parasitology*, 19 (2003) 545-546.
- [104] T. L. LeuNg, K. M. Donald, D. B. Keeney, A. V. Koehler, R. C. Peoples, R. Poulin, Trematode parasites of Otago Harbour (New Zealand) soft-sediment intertidal ecosystems: Life cycles, ecological roles and DNA barcodes, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43 (2009) 857-865.
- [105] N. Becker, D. Petrić, C. Boase, J. Lane, M. Zgomba, C. Dahl, A. Kaiser, *Mosquitoes and their control*, Springer (2010).

- [106] S.-K. Lou, K.-L. Wong, M. Li, P. P.-H. But, S. K.-W. Tsui, P.-C. Shaw, An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database), *BMC genomics*, 11 (2010) 402.
- [107] N. J. Sucher, M. C. Carles, Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants, *Planta medica*, 74 (2008) 603-623.
- [108] D. A. Baker, DNA barcode identification of black cohosh herbal dietary supplements, *Journal of AOAC International*, 95 (2012) 1023-1034.
- [109] M. Williamson, *Biological invasions*, Springer Science & Business Media, (1996).
- [110] R. Floyd, J. Lima, L. Humble, R. Hanner, Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests, *Biological Invasions*, 12 (2010) 2947-2954.
- [111] J. Neigel, A. Domingo, J. Stake, DNA barcoding as a tool for coral reef conservation, *Coral Reefs*, 26 (2007) 487.
- [112] T. Shearer, M. Coffroth, DNA BARCODING: Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation, *Molecular Ecology Resources*, 8 (2008) 247-255.
- [113] S. Chow, T. Nakagawa, N. Suzuki, H. Takeyama, T. Matsunaga, Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence, *Journal of fish biology*, 68 (2006) 24-35.
- [114] O. Thalmann, J. Hebler, H. N. Poinar, S. Pääbo, L. Vigilant, Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes, *Molecular ecology*, 13 (2004) 321-335.
- [115] G. A. Sword, L. B. Senior, J. F. Gaskin, A. Joern, Double trouble for grasshopper molecular systematics: intra-individual heterogeneity of both mitochondrial 12S-valine-16S and nuclear internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences in *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae), *Systematic Entomology*, 32 (2007) 420-428.
- [116] E. Richly, D. Leister, NUMTs in sequenced eukaryotic genomes, *Molecular biology and evolution*, 21 (2004) 1081-1084.
- [117] T. Moum, I. Bakke, Mitochondrial control region structure and single site heteroplasmy in the razorbill (*Alca torda*; Aves), *Current genetics*, 39 (2001) 198-203.
- [118] T. Barbara, C. PALMA-SILVA, G. M. Paggi, F. Bered, M. F. Fay, C. Lexer, Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations, *Molecular ecology*, 16 (2007) 3759-3767.
- [119] C. D. Meiklejohn, K. L. Montooth, D. M. Rand, Positive and negative selection on the mitochondrial genome, *TRENDS in Genetics*, 23 (2007) 259-263.
- [120] D. W. Foltz, A. W. Hrinkevich, A. Rocha-Olivares, Apparent selection intensity for the cytochrome oxidase subunit I gene varies with mode of reproduction in echinoderms, *Genetica*, 122 (2004) 115-125.
- [121] N. Galtier, B. Nabholz, S. Glémin, G. Hurst, Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal, *Molecular ecology*, 18 (2009) 4541-4550.

- [122] A. Bucklin, D. Steinke, L. Blanco-Bercial, DNA barcoding of marine metazoa, *Annual review of marine science*, 3 (2011) 471-508.
- [123] M. T. Monaghan, R. Wild, M. Elliot, T. Fujisawa, M. Balke, D. J. Inward, D. C. Lees, R. Ranaivosolo, P. Eggleton, T. G. Barraclough, Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation, *Systematic biology*, 58 (2009) 298-311.
- [124] M. K. Fujita, A. D. Leaché, F. T. Burbrink, J. A. McGuire, C. Moritz, Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy, *Trends in ecology & evolution*, 27 (2012) 480-488.
- [125] J. W. H. Ferguson, On the use of genetic divergence for identifying species, *Biological journal of the Linnean Society*, 75 (2002) 509-516.
- [126] T. Whitworth, R. Dawson, H. Magalon, E. Baudry, DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae), *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274 (2007) 1731-1739.
- [127] K. C. Kerr, M. Y. Stoeckle, C. J. Dove, L. A. Weigt, C. M. Francis, P. D. Hebert, Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds, *Mol Ecol Notes*, 7 (2007) 535-543.
- [128] R. L. Cunha, C. Grande, R. Zardoya, Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes, *BMC Evolutionary Biology*, 9 (2009) 210.
- [129] S. A. Nichols, An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I, *Molecular phylogenetics and evolution*, 34 (2005) 81-96.
- [130] K. Meland, E. Willassen, Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Pseudomma* (Peracarida: Mysida), *Journal of Crustacean Biology*, 24 (2004) 541-557.
- [131] K. J. Osborn, Relationships within the Munnopsidae (Crustacea, Isopoda, Asellota) based on three genes, *Zoologica Scripta*, 38 (2009) 617-635.
- [132] J. Zhang, Exploiting formalin-preserved fish specimens for resources of DNA barcoding, *Molecular Ecology Resources*, 10 (2010) 935-941.
- [133] R. R. Kirby, J. A. Lindley, Molecular analysis of Continuous Plankton Recorder samples, an examination of echinoderm larvae in the North Sea, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85 (2005) 451-459.
- [134] A. Martini, Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Wine research*, 4 (1993) 165-176.
- [135] D. Botstein, G. R. Fink, Yeast: an experimental organism for 21st Century biology, *Genetics*, 189 (2011) 695-704.
- [136] F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods in enzymology*, Elsevier 2002, pp. 3-41.
- [137] K. O'Kennedy, G. Reid, Yeast nutrient management in winemaking, *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, (2008) 92-100.

- [138] M. J. Kuranda, P. W. Robbins, Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 266 (1991) 19758-19767.
- [139] M. Van der Rest, A. H. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman, W. N. Konings, The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59 (1995) 304-322.
- [140] I. Ishtar Snoek, H. Yde Steensma, Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 24 (2007) 1-10.
- [141] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Sexual Reproduction: Meiosis, Germ cells and Fertilization, *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., GS Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, (2008) 1269-1304.
- [142] M. Carlson, Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species, *Journal of Bacteriology*, 169 (1987) 4873.
- [143] A. Bekatorou, C. Psarianos, A. A. Koutinas, Production of food grade yeasts, *Food Technology & Biotechnology*, 44 (2006).
- [144] S. B. Elmacı, F. Özçelik, M. Tokatlı, İ. Çakır, Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105 (2014) 835-847.
- [145] C. Nurgel, H. Erten, A. Canbaş, T. Cabaroğlu, S. Selli, Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavor compounds of white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29 (2002) 28-33.
- [146] J. R. Dickinson, Life cycle and morphogenesis, *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*, 2nd Edition, CRC Press, (2004), pp. 17-35.
- [147] C. R. Landry, J. P. Townsend, D. L. Hartl, D. Cavalieri, Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular ecology*, 15 (2006) 575-591.
- [148] A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, Life with 6000 genes, *Science*, 274 (1996) 546-567.
- [149] F. Sherman, An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *The encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*, 6 (1998) 302-325.
- [150] J. Förster, I. Famili, P. Fu, B. Ø. Palsson, J. Nielsen, Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network, *Genome research*, 13 (2003) 244-253.
- [151] F. Foury, T. Roganti, N. Lecrenier, B. Purnelle, The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS letters*, 440 (1998) 325-331.
- [152] K. Dolinski, D. Botstein, Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence, *Genome research*, 15 (2005) 1611-1619.

- [153] P. Laun, A. Pichova, F. Madeo, J. Fuchs, A. Ellinger, S. Kohlwein, I. Dawes, K. U. Fröhlich, M. Breitenbach, Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis, *Molecular microbiology*, 39 (2001) 1166-1173.
- [154] P. Laun, M. Rinnerthaler, E. Bogengruber, G. Heeren, M. Breitenbach, Yeast as a model for chronological and reproductive aging-a comparison, *Experimental gerontology*, 41 (2006) 1208-1212.
- [155] D. L. Hawksworth, Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, WFCC, (1990).
- [156] D. Hawksworth, I. Sastramihardja, R. Kokke, R. Stevenson, WFCC Guidelines for the Establishment and Operation of collections of Cultures of Microorganisms. World Federation of Culture Collections, Simworth Press, Richmond, Surrey, UK, (1990).
- [157] Anonim, World Federation of culture collection, <http://www.wfcc.info/wdcmdb/> (Access Date Mart, 2018).
- [158] Anonim, Kültür Koleksiyonu Genel Tanımı Ve Türkiye'deki Kültür Koleksiyonları, <http://www.turkhijyen.org/jvi.aspx?pdire=turkhijyen&plng=tur&un=THDBD-07269> (Access Date Ocak 2018).
- [159] J. M. Bartlett, D. Stirling, A short history of the polymerase chain reaction, *PCR protocols*, Springer, (2003), pp. 3-6.
- [160] M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic press, (2012).
- [161] A. Genc, F. Eroglu, I. S. Koltas, Detection of *Plasmodium vivax* by nested PCR and real-time PCR, *The Korean journal of parasitology*, 48 (2010) 99.
- [162] S. A. Bustin, R. Mueller, Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, *Clinical Science*, 109 (2005) 365-379.
- [163] G.-R. Mazars, C. Moyret, P. Jeanteur, C.-G. Theillet, Direct sequencing by thermal asymmetric PCR, *Nucleic Acids Res*, 19 (1991) 4783.
- [164] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, Real time quantitative PCR, *Genome research*, 6 (1996) 986-994.
- [165] L. Wang, H. Gu, X. Lu, A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 11 (2012) 9.
- [166] A. M. Caliendo, R. Schuurman, B. Yen-Lieberman, S. A. Spector, J. Andersen, R. Manjiry, C. Crumpacker, N. S. Lurain, A. Erice, Comparison of quantitative and qualitative PCR assays for cytomegalovirus DNA in plasma, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2001) 1334-1338.
- [167] D. J. Korbie, J. S. Mattick, Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification, *Nature protocols*, 3 (2008) 1452.
- [168] D.-S. Sheu, Y.-T. Wang, C.-Y. Lee, Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR, *Microbiology*, 146 (2000) 2019-2025.

- [169] T. Sonneveld, K. Tobutt, T. Robbins, Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers, *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (2003) 1059-1070.
- [170] D. Bang, G. M. Church, Gene synthesis by circular assembly amplification, *Nature methods*, 5 (2008) 37.
- [171] J. A. Sanchez, K. E. Pierce, J. E. Rice, L. J. Wangh, Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (2004) 1933-1938.
- [172] J. Huggett, D. J. Scott, Digital polymerase chain reaction; new diagnostic opportunities, 64 (2011) 40-49.
- [173] M. Vincent, Y. Xu, H. Kong, Helicase-dependent isothermal DNA amplification, *EMBO reports*, 5 (2004) 795-800.
- [174] A. V. Lebedev, N. Paul, J. Yee, V. A. Timoshchuk, J. Shum, K. Miyagi, J. Kellum, R. I. Hogrefe, G. Zon, Hot start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance, *Nucleic Acids Res*, 36 (2008) e131-e131.
- [175] J. Nagaraju, M. Kathirvel, R. R. Kumar, E. Siddiq, S. E. Hasnain, Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (2002) 5836-5841.
- [176] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (1996) 9821-9826.
- [177] T. A. Isenbarger, M. Finney, C. Ríos-Velázquez, J. Handelsman, G. Ruvkun, Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (2008) 840-849.
- [178] J. D. Watson, F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 171 (1953) 737-738.
- [179] D. T. Zallen, Despite Franklin's work, Wilkins earned his Nobel, *Nature*, 425 (2003) 15.
- [180] C. A. Hutchison III, DNA sequencing: bench to bedside and beyond, *Nucleic Acids Res*, 35 (2007) 6227-6237.
- [181] R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir, Structure of a ribonucleic acid, *Science*, (1965) 1462-1465.
- [182] F. Sanger, G. Brownlee, B. Barrell, A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides, *Journal of molecular biology*, 13 (1965) 373-IN374.
- [183] S. Dube, K. A. Marcker, B. Clark, S. Cory, Nucleotide sequence of N-formyl-methionyl-transfer RNA, *Nature*, 218 (1968) 232.
- [184] W. Fiers, R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. M. Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene, *Nature*, 260 (1976) 500.

- [185] R. Wu, E. Taylor, Nucleotide sequence analysis of DNA: II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA, *Journal of molecular biology*, 57 (1971) 491-511.
- [186] F. Sanger, J. Donelson, A. Coulson, H. Kössel, D. Fischer, Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (1973) 1209-1213.
- [187] F. Sanger, A. R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of molecular biology*, 94 (1975) 441-448.
- [188] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (1977) 5463-5467.
- [189] Z. Chidgeavadze, R. S. Beabealashvilli, A. Atrazhev, M. Kukhanova, A. Azhayev, A. Krayevsky, 2', 3'-Dideoxy-3'aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases, *Nucleic Acids Res*, 12 (1984) 1671.
- [190] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science*, 238 (1987) 336-341.
- [191] T. Hunkapiller, R. Kaiser, B. Koop, L. Hood, Large-scale and automated DNA sequence determination, *Science*, 254 (1991) 59-67.
- [192] R. Staden, A strategy of DNA sequencing employing computer programs, *Nucleic Acids Res*, 6 (1979) 2601-2610.
- [193] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239 (1988) 487-491.
- [194] S. N. Cohen, A. C. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (1973) 3240-3244.
- [195] H. Klenow, I. Henningsen, Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65 (1970) 168-175.
- [196] C.-Y. Chen, DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present, *Frontiers in microbiology*, 5 (2014) 305.
- [197] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent, L. E. Hood, Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*, 321 (1986) 674.
- [198] W. J. Ansorge, Next-generation DNA sequencing techniques, *New biotechnology*, 25 (2009) 195-203.

- [199] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, others. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409 860-921.
- [200] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, The sequence of the human genome, *Science*, 291 (2001) 1304-1351.
- [201] A. Verroken, M. Janssens, C. Berhin, P. Bogaerts, T.-D. Huang, G. Wauters, Y. Glupczynski, Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (2010) 4015-4021.
- [202] P. Vandamme, M. Vancanneyt, A. Van Belkum, P. Segers, W. Quint, K. Kersters, B. Paster, F. Dewhirst, Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46 (1996) 782-791.
- [203] R. A. Everley, T. M. Mott, S. A. Wyatt, D. M. Toney, T. R. Croley, Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19 (2008) 1621-1628.
- [204] S. Ekström, P. Önnarfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification, *Analytical chemistry*, 72 (2000) 286-293.
- [205] J. R. Yates III, Mass spectrometry and the age of the proteome, *Journal of Mass Spectrometry*, 33 (1998) 1-19.
- [206] P. R. Murray, What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 14 (2012) 419-423.
- [207] N. Valentine, S. Wunschel, D. Wunschel, C. Petersen, K. Wahl, Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2005) 58-64.
- [208] E. Carbonnelle, P. Grohs, H. Jacquier, N. Day, S. Tenza, A. Dewailly, O. Vissouarn, M. Rottman, J.-L. Herrmann, I. Podglajen, Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification, *Journal of microbiological methods*, 89 (2012) 133-136.
- [209] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck, Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy, *Analytical chemistry*, 73 (2001) 1016-1022.
- [210] E. N. Ilina, A. D. Borovskaya, M. M. Malakhova, V. A. Vereshchagin, A. A. Kubanova, A. N. Kruglov, T. S. Svistunova, A. O. Gazarian, T. Maier, M. Kostrzewa, Direct Bacterial Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Identification of Pathogenic *Neisseria*, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11 (2009) 75-86.
- [211] R. Stephan, N. Cernela, D. Ziegler, V. Pflüger, M. Tonolla, D. Ravasi, M. Fredriksson-Ahomaa, H. Hächler, Rapid species specific identification and

- subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of microbiological methods*, 87 (2011) 150-153.
- [212] R. Eddabra, G. Prévost, J.-M. Scheftel, Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Microbiological research*, 167 (2012) 226-230.
- [213] L. G. Stevenson, S. K. Drake, P. R. Murray, Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (2010) 444-447.
- [214] E. S. Theel, B. H. Schmitt, L. Hall, S. A. Cunningham, R. C. Walchak, R. Patel, N. L. Wengenack, Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (2012) 3093-3095.
- [215] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.-E. Fournier, J. M. Rolain, D. Raoult, Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clinical Infectious Diseases*, 49 (2009) 543-551.
- [216] S. Emonet, H. Shah, A. Cherkaoui, J. Schrenzel, Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology, *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (2010) 1604-1613.
- [217] R. Patel, MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases, *Clinical chemistry*, 61 (2015) 100-111.
- [218] Y. Luo, G. K. Siu, A. S. Yeung, J. H. Chen, P. L. Ho, K. Leung, L. Tsang, V. C. Cheng, L. Guo, J. Yang, Performance of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid bacterial identification in two diagnostic centres in China, *Journal of medical microbiology*, (2015).
- [219] M. Strohm, M. Hassman, B. Košata, M. Kodíček, mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 22 (2008) 905-908.
- [220] J. Ndukum, M. Atlas, S. Datta, pkDACLASS: open source software for analyzing MALDI-TOF data, *Bioinformatics*, 6 (2011) 45.
- [221] S. Gibb, K. Strimmer, MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data, *Bioinformatics*, 28 (2012) 2270-2271.
- [222] M. Raus, M. Šebela, BIOSPEAN: a freeware tool for processing spectra from MALDI intact cell/spore mass spectrometry, *J Proteomics Bioinform*, 6 (2013) 283-287.
- [223] R. Samson, J. Varga, What is a species in *Aspergillus*?, *Medical mycology*, 47 (2009) S13-S20.
- [224] J. Qian, J. E. Cutler, R. B. Cole, Y. Cai, MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392 (2008) 439-449.

- [225] G. Pulcrano, E. Roscetto, V. Iula, D. Panellis, F. Rossano, M. Catania, MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31 (2012) 2919-2928.
- [226] B. Amiri-Eliasi, C. Fenselau, Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells, *Analytical chemistry*, 73 (2001) 5228-5231.
- [227] C. Cassagne, F. Pratlong, F. Jeddi, R. Benikhlef, K. Aoun, A. C. Normand, F. Faraut, P. Bastien, R. Piarroux, Identification of *L. eishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (2014) 551-557.
- [228] T. Spanu, B. Posteraro, B. Fiori, T. D'Inzeo, S. Campoli, A. Ruggeri, M. Tumbarello, G. Canu, E. M. Trecarichi, G. Parisi, Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories, *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (2012) 176-179.
- [229] G. Yaman, I. Akyar, S. Can, Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 73 (2012) 65-67.
- [230] J. O. Lay Jr, MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria, *Mass spectrometry reviews*, 20 (2001) 172-194.
- [231] J. B. Stielow, C. A. Levesque, K. A. Seifert, W. Meyer, L. Iriny, D. Smits, R. Renfurm, G. Verkley, M. Groenewald, D. Chaduli, One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes, *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35 (2015) 242.
- [232] Anonim, The World's Largest Fungal Culture Collection, <http://www.westerdijkinstitute.nl/collections/> (Acces Date.Şubat 2018)
- [233] Anonim, The World's Largest Fungal Culture Collection, <http://www.westerdijkinstitute.nl/collections/> (Acces Date.Mart 2018)
- [234] C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, F. B. Consortium, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) 6241-6246.
- [235] C. Moritz, C. Cicero, DNA barcoding: promise and pitfalls, *PLoS biology*, 2 (2004) e354.
- [236] K. A. Seifert, Progress towards DNA barcoding of fungi, *Molecular Ecology Resources*, 9 (2009) 83-89.
- [237] D. Vu, M. Groenewald, M. De Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, J. Groenewald, G. Cardinali, J. Houbraken, Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation, *Studies in mycology*, 92 (2019) 135-154.
- [238] D. Gouliamova, R. Dimitrov, M. Stoilova-Disheva, DNA barcoding of yeasts from selected Bulgarian food products, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26 (2012) 32-34.

- [239] D. E. Gouliamova, R. A. Dimitrov, M. T. Smith, M. Groenewald, M. M. Stoilova-Disheva, B. V. Guéorguiev, T. Boekhout, DNA barcoding revealed *Nematodospora valgi* gen. nov., sp. nov. and *Candida cetoniae* sp. nov. in the *Lodderomyces* clade, *Fungal biology*, 120 (2016) 179-190.
- [240] C. P. Kurtzman, C. J. Robnett, Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species, *FEMS yeast research*, 13 (2013) 23-33.
- [241] S. E. Pierce, R. W. Davis, C. Nislow, G. Giaever, Genome-wide analysis of barcoded *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion mutants in pooled cultures, *Nature protocols*, 2 (2007) 2958.
- [242] K. H. Wolfe, Comparative genomics and genome evolution in yeasts, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361 (2006) 403-412.
- [243] F. A. Cubillos, E. J. Louis, G. Liti, Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains, *FEMS yeast research*, 9 (2009) 1217-1225.
- [244] D. Smith, Culture collections over the world, *International Microbiology*, 6 (2003) 95-100.
- [245] F. Uruburu, History and services of culture collections, *International Microbiology*, 6 (2003) 101-103.
- [246] M. Parker, S. Stones-Havas, C. Starger, C. Meyer, Laboratory information management systems for DNA barcoding, *DNA barcodes*, Springer, (2012), pp. 269-310.
- [247] T. D. Vu, U. Eberhardt, S. Szöke, M. Groenewald, V. Robert, A laboratory information management system for DNA barcoding workflows, *Integrative Biology*, 4 (2012) 744-755.
- [248] H. Sugawara, World directory of collections of cultures of microorganisms, *WFCC World Data Center on Microorganisms*, (1993).
- [249] L. Wu, Q. Sun, P. Desmeth, H. Sugawara, Z. Xu, K. McCluskey, D. Smith, V. Alexander, N. Lima, M. Ohkuma, World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide, *Nucleic Acids Res*, 45 (2016) D611-D618.
- [250] K. Ten Kate, S. A. Laird, The commercial use of biodiversity: access to genetic resources and benefit-sharing, *Earthscan*, (2002).
- [251] E. J. Chrystal, S. K. Wrigley, R. Thomas, N. Nicholson, M. Hayes, Biodiversity: New leads for the pharmaceutical and agrochemical industries, *Royal Society of Chemistry*, (2007).
- [252] I. B. Zhulin, Databases for microbiologists, *Journal of Bacteriology*, 197 (2015) 2458-2467.
- [253] T. Ayhan, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Basın Yayın San.Tic.Ltd.Ştd., , Hatipoğlu Basın Yayın San.Tic.Ltd.Ştd., , (2016).
- [254] M. Tsukada, Y. Ohsumi, Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS letters*, 333 (1993) 169-174.

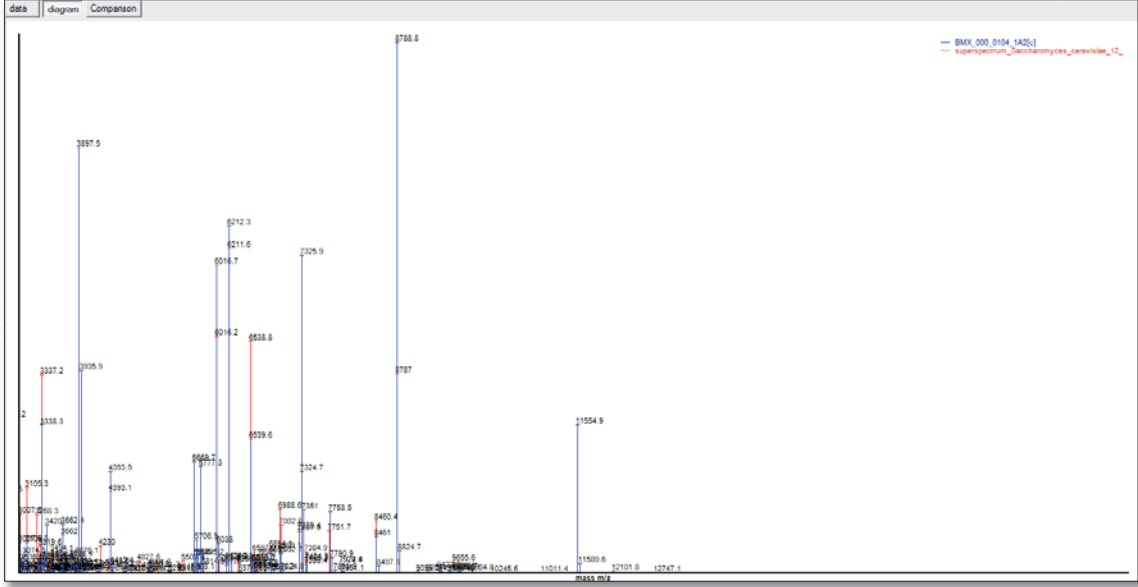
- [255] H. A.Kadir, Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Limited Şti, Başak Matbaacılık Limited Şti, (2005).
- [256] T. Deak, Handbook of food spoilage yeasts, CRC press, (2007).
- [257] W. J. Buesching, K. Kurek, G. D. Roberts, Evaluation of the modified API 20C system for identification of clinically important yeasts, Journal of Clinical Microbiology, 9 (1979) 565-569.
- [258] L. F. Westblade, R. Jennemann, J. A. Branda, M. Bythrow, M. J. Ferraro, O. B. Garner, C. C. Ginocchio, M. A. Lewinski, R. Manji, A. B. Mochon, Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts, Journal of Clinical Microbiology, 51 (2013) 2267-2272.
- [259] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, J. S. Viridi, MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis, Frontiers in microbiology, 6 (2015) 791.
- [260] Anonim, GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit, Universal kit for isolation of total DNA from bacteria Gram+, Gram- and yeast., https://www.roboklon.com/pdf/81_det_en.pdf (Acces Date, 2018).
- [261] Anonim, NanoDrop, 2000/2000c, Spectrophotometers, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000> (Acces Date, 2019).
- [262] D. Vu, M. Groenewald, S. Szöke, G. Cardinali, U. Eberhardt, B. Stielow, M. de Vries, G. Verkleij, P. Crous, T. Boekhout, DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation, Studies in mycology, 85 (2016) 91-105.
- [263] D. Begerow, H. Nilsson, M. Unterseher, W. Maier, Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures, Applied microbiology and biotechnology, 87 (2010) 99-108.
- [264] P. K. Krishnamurthy, R. A. Francis, A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation, Biodiversity and conservation, 21 (2012) 1901-1919.
- [265] Anonim, 5x FIREPol® Master Mix, https://www.solisbiodyne.com/EN/products/pcr/firepol_m-mix_12.5 (Acces Date, 2019).
- [266] E. M. Southern, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, Journal of molecular biology, 98 (1975) 503-517.
- [267] Anonim, GeneMATRIX AGAROSE - OUT DNA Purification Kit (Universal kit for purification of DNA from agarose gels), <https://www.bmlabosis.com/Urunler/2022/GeneMATRIX-AGAROSE---OUT-DNA-Purification-Kit-Universal-kit-for-purification-of-DNA-from-agarose-gels> (Acces Date, 2019).
- [268] Anonim, ExoSAP-IT (USB Europe GmBH, Staufen, Almanya) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78201.1.ML> (Acces Date, 2019).
- [269] Anonim, FinchTV, <https://digitalworldbiology.com/FinchTV> (Acces Date, 2019).

- [270] Anonim, BioEdit, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (Acces Date, **2019**)
- [271] Anonim, Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Acces Date, **2019**).
- [272] Anonim, Phylogenetic analysis pipeline by ETE3, <https://www.genome.jp/tools-bin/ete> (Acces Date, **2019**).
- [273] K. Katoh, D. M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Molecular biology and evolution*, 30 (**2013**) 772-780.
- [274] J. Huerta-Cepas, F. Serra, P. Bork, ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data, *Molecular biology and evolution*, 33 (**2016**) 1635-1638.
- [275] O. Gascuel, BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data, *Molecular biology and evolution*, 14 (**1997**) 685-695.
- [276] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0, *Systematic biology*, 59 (**2010**) 307-321.
- [277] Anonim, MEME-Multiple Em for Motif Elicitation, <http://meme-suite.org/tools/meme> (Acces Date, **2019**).
- [278] Anonim, MEGA7 molecular evolutionary genetics analysis, <https://www.megasoftware.net/> (Acces Date, **2019**).
- [279] Anonim, XLSTAT Your data analysis solution, <https://www.xlstat.com/en/> (Acces Date, **2019**).
- [280] J. Liu, M. Moeller, L. M. GAO, D. Q. ZHANG, D. Z. LI, DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the discovery of cryptic species, *Molecular Ecology Resources*, 11 (**2011**) 89-100.
- [281] S. Dutta, M. Ojha, Relatedness between major taxonomic groups of fungi based on the measurement of DNA nucleotide sequence homology, *Molecular and General Genetics MGG*, 114 (**1972**) 232-240.
- [282] W. F. Walker, W. F. Doolittle, Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences, *Nature*, 299 (**1982**) 723.
- [283] T. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, PCR protocols: a guide to methods and applications, (**1990**).
- [284] C. P. Kurtzman, C. J. Robnett, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73 (**1998**) 331-371.
- [285] J. W. Fell, T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti, A. Stazzell-Tallman, Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (**2000**) 1351-1371.
- [286] C. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout, *The yeasts: a taxonomic study*, Elsevier, (**2011**).

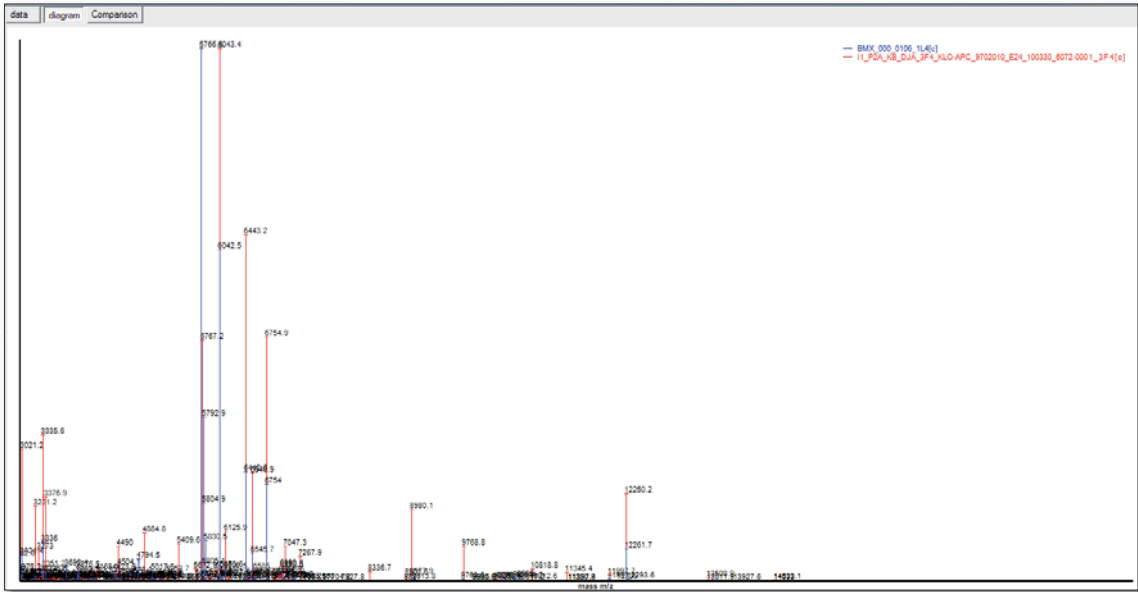
- [287] H.-M. Daniel, M.-A. Lachance, C. P. Kurtzman, On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106 (2014) 67-84.
- [288] R. G. Eason, N. Pourmand, W. Tongprasit, Z. S. Herman, K. Anthony, O. Jejelowo, R. W. Davis, V. Stolc, Characterization of synthetic DNA bar codes in *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion strains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (2004) 11046-11051.
- [289] A. Asemaninejad, N. Weerasuriya, G. B. Gloor, Z. Lindo, R. G. Thorn, New primers for discovering fungal diversity using nuclear large ribosomal DNA, *PLoS one*, 11 (2016) e0159043.

EK A1

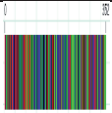
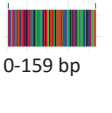
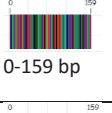
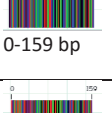
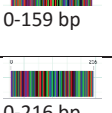
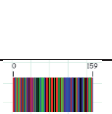
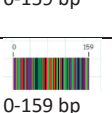

Türlere Ait MALDI-TOF MS Spektrumları



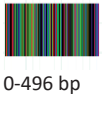
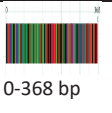
Şekil A1. 1. *S. cerevisiae* türüne ait MALDI-TOF MS standart spektrumu

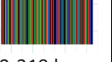
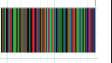
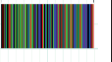
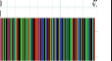


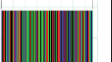


Şekil A1. 2. *Kloeckera apiculata* türüne ait MALDI-TOF MS standart spektrumu

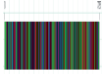

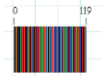
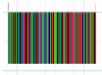
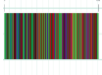

| | | | |
|--|-----------------|--|---|
| | | | |
| Takson 2 (A2) (%) <i>S.cerevisiae</i> | ITS-A2- Takson2 | TCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGAATGTTTGAGAAAGGAAATGACGCTCAA CAGGCATGCCCCGTGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCCGC AGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCATTATACCTCAAGCAGCAGAGA AACCTCTCTTTGGAAAAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTTA TGAGGTCAACTTTAAGAACATTGTTGCGCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGT TCCAATACGCTCAGTATAAAAAAG |  0-352 bp |
| Takson 3 (B1) (%) <i>Cryptococcus sp.</i> | ITS-B1- Takson3 | TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAGCC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTCAAGTTGATATTTTCATGACTCAAAC AGGCATGCTCTTCGGAATACCAAAGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTC |  0-159 bp |
| Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenishia sp.</i> | ITS-C1- Takson4 | TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAGCC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCAAGTTGAGGGTTTTTCATGACTCAAAC AGGCATGCTCTTCGGAATACCAAAGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTC |  0-159 bp |
| Takson 5 (D) (%) <i>Pichia</i> | ITS-D- Takson5 | GCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTTCGCTGCGCTTTCATCGATGCGAGAACC CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGCGACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAA ACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAATTC |  0-159 bp |
| Takson 6 (E) (%) <i>Candida</i> | ITS-E- Takson6 | TCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCAAAGTTTGAAGGAGAAATGACGCTCAA CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTC |  0-159 bp |
| Takson 7 (F) (%) <i>Wickehamomyces sp.</i> | ITS-F- Takson7 | TCTGCAATTCACAATACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGTTGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCGAAGTTTTGAGAGAGAAATGACGCTCAA CAGGCATACCCTCTGGAATACAGAGGGTGAATGTGCGTTCAAAGATTCTGGG TTCTGCAACCAAAAAAAGCACCGAAATGCGATACGTAATGTGGAATTGCAG |  0-216 bp |
| Takson 8 (G) (%) <i>Metchnikowia sp.</i> | ITS-G- Takson8 | TCTGCAAGTCATATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGGTAGTTTTGAGAGTAAATATCGCTCACCC ACGCATGCCCTGGGGAATACCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTC |  0-159 bp |
| Takson 9 (H) (%) <i>Hanseniaspora sp.</i> | ITS-H- Takson9 | TCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTACGTTTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATCTTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAAC AGGCATGCCCTGAGAATGCTCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTC |  0-159 bp |

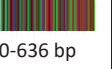
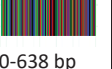
Şekil A2.1. ITS gen bölgesi için açıklayıcı (elucidation) barkod yapıları

| Taksonlar | Barkod Adı | Barkod Sekansı | Barkod Görseli |
|---|-----------------|---|---|
| Takson 1 (A1) (%) <i>Saccharomycete sp.</i> | LSU-A1-Takson1 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA ATACCGGCGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTG CAAGCAGACACTTAACTGGGCCAGCATCGGGGCGTCCACTGGAAGTGGCGCC ACAGAGGGTGACAGCCCCGTGTAAGGATGCTGGCGTAATGTTGCAAGTCGCC GTCTTGAACACGACCGGGGAAACAAACCACCGGGGAATGTACCTTTGAGGGA TTATAACCCCGTCTCGATTGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGGGC CAAAACCCATACGCGCAATGAAGTAACCGGAGCGAACCTTTGTGACGCTCCAG GGAAATGTAATTGAAGAGATTTGGTCCGGCCGCGAGGGCCCTTCAACGCCCT CATCCAGATCTCC |  0-496 bp |
| Takson 2 (A2) (%) <i>S.cerevisiae</i> | LSU-A2- Takson2 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATT TGATCAGACATGGTGTGTTGTCCTCTGCTCCGTTCTTGGAACAGGACGTCAT AGAGGGTGAGAATCCCGTGAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCGT CTTGAACACGCGACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTCTGGTACCTT CGGTGCCCGAGTTGTAATTTGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCC |  0-368 bp |

| | | | |
|---|-----------------|---|---|
| Takson 3 (B1) (%) <i>Cryptococcus sp.</i> | LSU-B1- Takson3 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGA AGTCAGTCGTGTCTATTGGACTCAGCCGGTTCGTCCCTTGGAAACAGGGCGTCATA GAGGGTGAGAATCCCGTCGCGGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTTGGCAG CCTCAGTTGTCCGAGTTGAATCTATAGAAAAGCTTTCCGCGCCGCCCA |  0-319 bp |
| Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenishia sp.</i> | LSU-C1- Takson4 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTGAATCCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGA AGTCAGTCATGCTCTTTGGATTAGCCGTTCTGTCCCTTGGAAACAGGGCGTCATA GAGGGTGAGAATCCCGTCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACCCGCT TGAAACACGGACGATTTGAGTAAGAGCATATATGTTGGGACCCGAAAAGATGGTG AACTATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAAAACCTGGTGGAGGCTCGTAGC GATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAAGACTAAT CGAACCATCTGGCGAGTGAAGCGGGAAGAAGCTCAAATTTGGTAGCCTTCGGCT GCCCCAGTTGAATCTAGAGAAGTGTTCCTGCGCGCCCA |  0-527 bp |
| Takson 5 (D) (%) <i>Pichia</i> | LSU-D- Takson5 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAGCGGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTAA ATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAAGGAAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTGAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATT GCGCCCGACATGGGATTGCGCACCGCTGCCTCGTCCCTTGGAAACAGGGCGCCC AGGAGGTGAGAGCCCGTGCACGGATGCTGGCAGAACGGCCCAACACCGCCC GTCTTGAACATGGACGATTTGACTAGGAGCATATCTGTTGGGACACGAGAGAT GGTGCACTATGCCTGAATACGGTGAACCCACAGAAAACCTGATGGAAGCACGA ATTATATCGAAGCTCATGTCTGATTCACTCACTTCTACAGAGGCGATCCATGCTG GTGTCGTTATCT |  0-441 bp |
| Takson 6 (E) (%) <i>Candida</i> | LSU-E- Takson6 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGA TAGCGAACAAAGTACAGTATGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGGATCAGACTTGGTATTTT GTATGTTACTTCTGTTTCTTGAACAGAAGCTCACAGAGGGTGAATCCCGTG CTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAAGTGCCCGCTTGAACACGGACGATTTG AGTAAGAGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAAGATGGTGAACATGCCTGAATAGG GTGAAGCCAGAGGAAAACCTGTTGGAGGCTGTAGCGGTTCTGACGTGCAAATC GATCGTGAATTTGGGTATAGGGGCGAAAAGACTAATCGAACCATCTGCGAAGTG AAGCGGCAAAAGCTCAAATTT |  0-470 bp |
| Takson 7 (F) (%) <i>Wickehamomyces sp.</i> | LSU-F- Takson7 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTATGAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATT AGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCGTTCCTTGAACAGGACGTCATA GAGGGTGAGAATCCCGTCGCGAAGTGAAGCGGAAAAGCTCAAATTTCTAGCA CCTTCGGTGTTCGAGTTGAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTC |  0-319 bp |
| Takson 8 (G) (%) <i>Metchnikowia sp.</i> | LSU-G- Takson8 | AAGTACAGTATGAAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTAC GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAGCAGACACTTAACCTGGGCCAGCA TCGGGGCGTCCACTGGAAAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCGTGCGGGG AGAACAACCCCGGGGAAAAGTGCCTTCTAGGAGAATAACCCGGGGCTTACTG GCGAGTGAAGCGGAAAAGCTCAATTGATGTGTGACAAAATCCCCCTGATGA AATGGCAGGAACAACTGGGAGCTGTACACCCCTCAACGCCCTATCCAG ATCTCC |  0-326 bp |
| Takson 9 (H) (%) <i>Hanseniaspora sp.</i> | LSU-H- Takson9 | CGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTATGAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATT TGATCAGACATGGTGTGTGATGCACTCGCTTCTTGGAAACAGGACGTCAT AGAGGGTGAGAATCCCGTTCAAGGATGTTGGCATAATGGTAAATGCCGCCCT CTTGAACACGGAC |  0-282 bp |

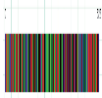
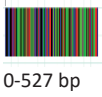
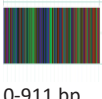
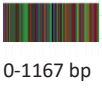
Şekil A2.2. LSU gen bölgesi için açıklayıcı (elucidation) barkod yapıları

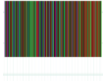
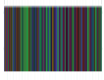
| Taksonlar | Barkod Adı | Barkod Sekansı | Barkod Görsele |
|---|------------------|--|---|
| Takson 1 (A1) (%) <i>Saccharomyces</i> <i>sp.</i> | RPB2-A1-Takson1 | AGAACAATACTCCAATTGGCCGTGACGGTAAGATCGCCAAACCTAGACAGTTG CACAACACCCACTGGGGTCTTGATGTCCTGCAGAACTCTGAAGGTGAGCGGT GTGGCGTTGGCGGTCAAGTCACAGACCATCACTGATGGTTTGGCGTACTCGTTG GCCACAGGTAATTGGGGTGAACAAGAAAGGCCATGAGTGCACGTCCGGTGT GTCGCAGGTGGCCGATCTTGANTTCTGGAGGAGTGGGGTATGGAACCTTGG AGGACTATGTTCTTGAACGCCAGACTGCACAAGAGTCTTTGTCAACGGTGT GTGGGTTGGTACACCTCTCCGAGGTGTGCATCATAGGGATATCAGAGAAATG GAGTCAAGATCTTCCAGTGCAGGCCGTGTCTACCCTCCGGGACGACGACCC AGAGTCCGAGACCAAGGGAGAGTTGATGTTGCAAAAAGAGCACGTGCACAAGT TGTTGAACCTCGCCCTACGATGAATATGACGAAGATGACTCCAATGCGTCAGAGA ACCGGCACAGCTTGTGCACACCATGAGGAGTTGAGNAGAAAGGGCGATATGT GAAGAANTGCTTTGATGACGTGTATATCTGTTGGTACTTGAACAGATACACAT ACTCATCGACATTGTGCATTTGAGCATGGTCGTCGTTGGTGAATGATGGTGTGG TAGAGTACGTTGACGCCGANGAGGAGG |  0-725 bp |
| Takson 2 (A2) (%) <i>S.cerevisiae</i> | RPB2-A2- Takson2 | AGAACAACACTCCTATTGGTCTGATGGTAAATTAGCCAAACCACGTCAATTGC ATAATACACATTGGGGTGGTCTGTCCTGCAGAACTCTGAAGGCCAAGCGT GTGGAATTAGCGATTAATGCAAAAACCATAACATCGGGTCTTAAGTACGCTTTGG CTACTGGTAACTGGGGTGAACAAAAAAGCCATGCTTCTAGGGCAGGTGTTT CTCAGGTTGCATATCACTTTTTAAGTGAATGGGGTATGGAACCTCGGAAG ATTACGTACCACATCAATCACCTGACGCGACAAGGGTCTTCGTAATGGTGTG GCACGGTGTCCAATCCGGAAGTTCTATGATTAGAGATATTCGTGAAAAGGAG CTAAAATCTTTACAGATGCCGGTAGAGTTATAGACCATGTTGAAGACGATGAA TCACTAGGCCATAAGGAATTAAGGTAAGAAAAGGGTCATATTGCCAACTGATG GCTACCGAATCAAGATATTGAAGGTGGATTTGAAGATGTAGGAATTGGCAGT CATTATTGGCCCACTTTTCAAGACATTGTTCAAAAATAAATAAAGATATTTTC CGTTATATGCAACAGAAACCCAGCAAGATTAATGGAAACCTTAGAACATTGAG AAGAAAGGGTATATGTTAAGAATCTGCTACTGATGCTTGTATTCTGTTGGTA CTTGAACGGTTACACTTATTCATCCACTTTATCACATTTAAGCATGGTCATCATT TGAATGAGGGTTAGTGAATACATTGATGCTGAAGAAGAAG |  0-808 bp |
| Takson 3 (B1) (%) <i>Cryptococcus</i> <i>sp.</i> | RPB2-B1- Takson3 | GGGATTGGCGGACGTTGTTGGCCATCTGTTCAAGTTGCTGTTCAAGAAAGTTACC AAGGACATTTACCGACATCTGCAAGTCAAGAACCTCGCCCTCATGCTCATCT CGGTCGGATC |  0-119 bp |
| Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenishia</i> <i>sp.</i> | RPB2-C1- Takson4 | yok | yok |
| Takson 5 (D) (%) <i>Pichia</i> | RPB2-D- Takson5 | AGAACAATACACCAATTGGTAGAGATGGTAAATTGGCCAAGCCAAGGCAGTTG CATAACACTCATTGGGGATTGGTATGTCCTGCGAAAACACCTGAAGGTCAAGCCT GTGGTTTCTGCAGTAAATCGACTACAATTACATCCGGTGAATATTCTTTGGC AACCGTAATTGGGGAGAACAAGAAGGCCATGCTCCTGAAGGTGGTGTTC CAAGTCTAATTGCGCTGCTCTATTGGCCATTTATTAGAATCTTATTCAGAAAA CTCTCTCGTATTCTATAGATATATGCAGGAAAAATCTGTTTTGAAATCATG TATTTCTGTGGTTTC |  0-345 bp |
| Takson 6 (E) (%) <i>Candida</i> | RPB2-E- Takson6 | AGAACGAATACTCCAATTGGAAGAGATGGTAAAGATTGCCAAACCAAGACAATTA CACAATACTCATTGGGGTGGTGTGCCCCGCAGAAACCCAGAAGGTCAAGCG TGTGGCTTTGGCTGTTAAATCACAGACAATCACCGATGGGTTAAGATACTGTTG GCTACTGGTAATTGGGGTAGCAAAAGAAAAGCCATGAGTCTAGAGCTGGTGT TCTCAAGTTACCAATTTAGGATTTTTAAGAGATTATGGTTTGAAGATTGGAA GATTATGTTCCATCAATGCTCCAGATTCAACTAGAGTGTGTTGCAATGGTGTG GGTTGGTGTTCGTCCTCAGAAGTATCTATCATTGAGATATTAGAGAAAAGAAT TCAAAATTTACTGATGCTGCTGTTTACCCTCCAGCATTAGCAGTCCTTTAT TGGCAACTGTTCCGATTTTATTCAAAAATAAATAAAGATATATATAATTATA TGCAAGTTAAGAACTATCATTAAATGACATGATTTCTGTTGGTACTTGAATCGTT ACACTACTCATCTACTTTGTACATTTAAGCTTGGTCTTCTTTAGTTGCCGATGGT ATTGTTGAATATGTGGATGCTGAAGAAAAAG |  0-636 bp |
| Takson 7 (F) (%) <i>Wickehamomyce</i> <i>s</i> <i>sp.</i> | RPB2-F- Takson7 | AGAACTAATACTCCAATTGGTCTGATGGTAAATTAGCAAAACCTCGTCAATTAC ACAATACTCATTGGGGCTTTGTTGCTGCTGAAACCCCTGAAGGTCAAGCTTG TGGAATTGGCTGTTAAGGCAACAACAATCACTCAGGTTTGAATATTCTTTAGC TACAGGTAATTGGGGTGAACAGAAAAAGGCTATGAGTTCAAGAGCTGGTGTTC TCAAGTTTCCAATCATTATTTCTTGGAAAGATGGGGTATGGAACCCCTGGAAGA TTATTTACCTCATCAAGCTCCAGATGTTACAAGAATTTTCTGTTAATGGTGTGGC |  0-638 bp |

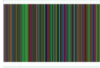
| | | | |
|--|-----------------|---|---|
| | | ATGGTATTCTCCAGAAGTTTCAATTATTAGAGATATTCTGTAAGGAATTT AAAGTTTTCACTGATGCTGGTAGAGTTTATAGACCTGAATTGGCGGTCTTTATTA GCTAATCTTTTCAGAATCTTGTTAAGAAGTTAACAAGAGATTTATCGTTATAT GCAAGTTAAAAATTTATCATTAAATGTCTTGATCTCTGTTGGTCTTAAATCGTTAT ACTTATTCTCAACTTTATCACATTTAAGCTTGAATTCTTTATTAATAATGGTAT TGTGGAATATGTTGATGCTGAAGAAAAA | |
| Takson 8 (G) (%) <i>Metchnikowia sp.</i> | RPB2-G- Takson8 | AGAACATAACTCCAATTGGTCGTGATGGTAAATTAGCAAAACCTCGCAATTAC ACAATACTCATTGGGGCTTGTTCCTGCTGAAACCCCTGAAGGTCAAGCTTG TGAATTGGCTGTTAAGGCAACAACAATCACTTCAGGTTTGAAATATTCCTTAGC TACAGGTAATTGGGGTGAACAGAAAAAGGCTATGAGTTCAAGAGCTGGTGTTC TCAAGTTTCCAATCATTATTTCTTGAAGAATGGGGTATGGAACCTTGGAGA TTATTTACCTCATCAAGCTCCAGATGTTACAAGAATTTTCGTTAATGGTGTTC ATGGTATTCTCTCCAGAAGTTTCAATTATTAGAGATATTCTGTAAGGAATTT AAAGTTTTCACTGATGCTGGTAGAGTTTATAGACCTGAATTGGCGGTCTTTATTA GCTAATCTTTTCAGAATCTTGTTAAGAAGTTAACAAGAGATTTATCGTTATAT GCAAGTTAAAAATTTATCATTAAATGTCTTGATCTCTGTTGGTCTTAAATCGTTAT ACTTATTCTCAACTTTATCACATTTAAGCTTGAATTCTTTATTAATAATGGTAT TGTGGAATATGTTGATGCTGAAGAAAAA |  0-636 bp |
| Takson 9 (H) (%) <i>Hanseniaspora sp.</i> | RPB2-H- Takson9 | AGAACCAACTCCGATTGGTAGAGATGGTAAGCTGGCCAAGCCTAGACAATTG CACAAACCCATTGGGGTCTTGTATGTCTGCTGAACTCCTGAAGGTCAAGCTT GTGGAACAGCCATCAAGCATCAACAATCACTGCTGGGTTAAAGTACGCCCTG GCTACTGGTAAGGGTGAACAAAAGAAGGCTATGCTCAAGAGCTGGTGA TCCAAGTTACCAATTTATTCCTACTTAAAGGAATTCGTTTGAACCTTGGAA GATTATGTCCATACAAGCTACCTGACGTTTCCAGAGTATTCGTAACGGTGTTC GGCATGGTATCCGTCCAGTGAATTTGCCATTGTTAGAGACATCAGAGAAAAAGA AATTCGTTTCTTAACTGATGCTGGTAGAGTTTACAGACCAAGCTACGTGGTCTC TATTGGCTCACTATTCAGAATCTTTTCAAAAAGGTTACCAAGGATTTTTCAGAG TCATGCAAGTTAAGAAGCTTGTCCCTGATGTCAGGTATCTCTGTTGGTCTTGAATA GATACTACTACTCCACTCTATCGCATTTAAGCATGGTCCACCTTGATCAACAA GGGTATGTTGAATACTTGGATGCTGAAGAGAAAG |  0-638 bp |

Şekil A2.3. RPB2 gen bölgesi için açıklayıcı (elucidation) barkod yapıları

| Taksonlar | Barkod Adı | Barkod Sekansı | Barkod Görseli |
|--|-----------------------------|---|--|
| Takson 1 (A1) (%) <i>Saccharomycete sp.</i> | ITS_LSU_RPB2-A1- Takson1 | GCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAA CATTCTGTTTGGTAGTGATACGTTTACAATGTTCTTATTTCTGGCAAGA AGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAAGTGCAGGCTTGCTC CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAA GAATTTTTCGTAAGTGAATTTTAAAAATAATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTC GCTTGCAATTTCTTCTGCTATTCAAAACAGTGAGACTTCTCTGTTTGTATA GGACAATTAACCGTTTCAACTTTTACAATGTTCTTAGTACTGAGCGTATTG AAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGCTGGC CTTTTTCATTGGATGTTTTTTTCAAAGAGAGGTTTCTCTGCTGCTTGAGGTATA TTGCAAGTACGGTGGTTTGGTCTCGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGCG ATACGTAATGGAATTCAGACACACTGTGGAGTTTTTATACTTTTGAACCTTTT CTTTGGGCTTCGAGCAATCGAGCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTAAGTGGGT GGTAAATCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCATAGCGAACAAGTAC AGTGATGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAA TTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAAGCAGACACTTAAGTGGCCAGCATCGGGG CGTCCACTGGAAGTGGCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGTAAGGATGCTG GCGTAATGTTGCAAGTCGCCGTCTTGAACACGGACCGGGAACAAAACCAC CGGGGAATGACCTTTTCGAGGATTATAACCCCGGTCTCGATTGGCGAGTGAAGC GGCAAAAGCTCAAATTTGGGCCAAAACCATACGCGCAATGAAGTAACCGGAG CGAACCTTTGTCAGCTCCACGGGAATTGTAATTGAAGAGATTTGGTCCGGCC GGCAGGGCCCCCTCAACGCCCTCATCCAGATCTCC |  0-1199 bp |
| Takson 2 (A2) (%) <i>S.cerevisiae</i> | ITS_LSU_RPB2-A2- Takson2 | TCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTCTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGAATGTTTGAAGGAATGACGCTCAAA CAGGCATGCCCTTGAATACCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATCCCGC AGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCAATTATACCTCAAGCAGCGAGAGA AACCTCTCTTGGAAAAAATCAATCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAAGTTA |  0-1128 bp |

| | | | |
|--|-----------------------------|---|--|
| | | TGAGGTCAACTTTAAGAACATTGTTGCGCTAGACGCTCTCTTATCGATAACGT TCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGCGAGTTGTTGGGAATGCGACTCTAAGTGG GTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGT ACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGA AATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTGTCCTCTGCTC CGTTCCTTGGAACAGGACGTATAGAGGGTGAGAATCCCGTCAAGGATGCTGG CATAATGGTTATATGCCGCCGTCTTGAACACGGACGGCAGTGAAGCGGCAA AAGCTCAAATTTTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAAC TTTGGGGCCGTCCAGAACAACACTCTATTGGTCGTGATGGTAAATTAGCCAA ACCACGTCAATTGCATAATACACATTGGGGGTTGGTCTGTCTGCAGAACTCT GAAGGCCAAGCGTGTGGAATTAGCGATTAATGCAAAAACCATAACATCGGGTCT TAAGTACGCTTTGGCTACTGTAACTGGGGTGAACAAAAAAAAGCCATGTCTCT AGGGCAGGTGTTTCTCAGGTTGCCTATCATCTTTTTAAGTGAATGGGGTATG GAACCACTGGAAGATTACGTACCACATCAATCACCTGACGCGACAAGGGTCTTC GTCAATGGTGTGTGGCACGGTGTCCAATCCGGAAGTTTCTATGATTAGAGAT TCGTGAAAAGGAGCTAAAAATCTTTACAGATGCCGGTAGAGTTTATAGACCATG TTGAAGACGATGAATCACTAGGCCATAAAGGAATTAAGGTAAGAAAGGGTCATA TTGCCAAACTGATGGCTACCGAATATCAAGATATTGAAGGTGGATTTGAAGATG TAGATTTGGGCAGTCATTATTGGCCCACTTTTCAAGACATTGTTCAAAAAATTA CTAAAGATATTTCCGTTATATGCAACAGAAAACCCAGCAAGATTAAGTGAACCC TTAGAACATTGAGAAGAAAGGGTGATATGTTAAGAATCTGTCCTGATGCTTGT ATTTCTGTTGGTACTTGAACCGTTACACTTATTCATCCACTTTATCACATTAAGCA TGGTCATCATTATTGAATGAGGGTTTAGTGAATACATTGATGCTGAAGAAAGAA G | |
| Takson 3 (B1) (%) <i>Cryptococcus sp.</i> | ITS_LSU_RPB2-B1- Takson3 | TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCTAAGGTTGAGGGTTTTTCATGACTCAAAC AGGCATGCTCCTCGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATCCGAGT TGTTTGGGAATGCGACTCAAATGGGTGGTGAATTCATCTAAAGCTAAATATTG GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTG GAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCA GTCATGCTCTTTGGATTAGCCGTTCTGTCCCTTGAACAGGGCGTCATAGAGGG TGAGAATCCCGTCTTATGATGTTGACATAATGGCTTTATACGACCCGTCTTGAA CACGGACGGCAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTTGGTAGCCTTCGGCTGCC CGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTTCCTGCGGCCCA |  0-528 bp |
| Takson 4 (C1) (%) <i>Nagenishia sp.</i> | ITS_LSU_RPB2-C1- Takson4 | CGAGTTGTTGGGAATGCGACTCAAATGGGTGGTGAATTCATCTAAAGCTAA ATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGC ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAACGATTGA AGTCAGTCATGCTCTTTGGATTAGCCGTTCTGTCCCTTGAACAGGGCGTCATA GAGGGTGAGAACCCGCTTAGGATGTTGACATAATGGCTTTAAACAGCCGCT TGAAACACGGACGATTTGAGTAAGAGCATATATGTTGGACCCGAAAAGATGGTG AACTATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGC GATTCTGAGTGCAAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGCGAAAAGACTAAT CGAACCATCTGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGGTAGCCTTCGGCT GCCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTTCCTGCGGCCCA |  0-527 bp |
| Takson 5 (D) (%) <i>Pichia</i> | ITS_LSU_RPB2-D- Takson5 | GCTGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAAC CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGCGACGCGCAAGATGGAACGACGCTCAA ACAGGCATGCCCCCGAATGCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAATCCGGA GTTGTTGGGAATGCGACTCCAAGCGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATA CTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACT TTGAAAAGAGAGTGAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCG CCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCGTCCCTTGAACAGGGCGCCAGG AGGGTGAGAGCCCCGTGCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCGTC TTGAAACATGGACAGAACAATACACCAATTTGGTAGAGATGGTAAATTTGGCCAA GCCAAGACAGTTGCATAACACTCATTGGGGATTGGTATGTCCTGCGGAGACACC TGAAGGTCAAGCCTGTGGTTTTCTGCAGTTAAATCGACTACAATTACATCCGGCT GAAATATTCTTTGGCAACCGGTAATTGGGGAGAACAAAAGAAGGCCATGTCCTC GAAGGCTGGTGTTCCTCAAGTATCATCCGAAGTTTCTTTGATTAGAGATATTAG AGAGCGAGAATTTAAGATTTTACAGATGACAGGTAGAGTCTATAGACCAATTTG GCTGGTCTCTATTGGCCATTTATTCAGAATCTTATTCAGAAAACCTCTCGTGAT ATCTATAGATATATGCAGGTCAAGAACTTGTATTGATGTCATGATATCTGTTG GTTCTTGAACAGATATACATATTCTCAACTTTGTCACATTTGAG |  0-911 bp |
| Takson 6 (E) (%) <i>Candida</i> | ITS_LSU_RPB2-E- Takson6 | TCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCAAAGGTTTGAAGGAGAAATGACGCTCAA CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATCCGAG TTGTTTGGGAATGCGACTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATT GGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAACTTT GAAAAGAGAGTGA AAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATT |  0-1167 bp |

| | | | |
|---|-------------------------------------|---|--|
| | | <p>AGACTTGGAAATTTCCATTATGGAGCTGTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGG GTGAGAATCCCGTGTAGGATGCTGGCGTAAATGATCTTAAGCCGCCCTTTGA AACACGGACGCGAAGTGAAGCGGCAATAGCTCAAATTTCTGGCACCTTCGGTG TCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGTTTTGGCTCAGAACCGAATCTCC AATTGGAAGAGATGGTAAGATTGCCAAACCAAGACAATTACACAATACTCATTG GGGGTTGGTGTGCCCGCAGAAACCCAGAAAGTCAAGCGTGTGGCTTTGGCT GTTAAATCACAGACAATCACCGATGGGTAAAGATACTCGTTGGCTACTGGTAATT GGGGTGAGCAAAGAAAAGCCATGAGTCTAGAGCTGGTGTCTCAAGTTACCA ATTTTAGGATTTTAAAGAGATTATGGTTTTAGAAGTATTGGAAGATTATGTTCCATC AAATGCTCCAGATTCAACTAGAGTGTGTCAATGGTGTGGTGGTGTTCGT CCTCAGAAGTATCTATCATTGAGATATTAGAGAAAAAGAATCAAATTTTCAC TGATGCTGGTGTGTTTACCCTCCAGCATTAGCAGTCCTTTATTGGCAACTGTTC CGATTTTATTCAAAAAATTAATAAAGATATATAATTATATGCAAGTTAAGAA CTTATCATTAAATGACATGATTTCTGTTGGTACTTGAATCGTTACACTACTCATCT ACTTTGTACATTTAAGCTTGGTCTCTTTAGTTGCCGATGGTATTGTTGAATATG TGGATGCTGAAGAAAAAG</p> | |
| <p>Takson 7 (F) (%) <i>Wickehamomyce</i> <i>s sp.</i></p> | <p>ITS_LSU_RPB2- Takson7</p> | <p>TCTGCAATTCACAATACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTCATCGTTCGAGAAACC AAGAGATCCGCTGTTGAAAGTTTTCGAAGGTTTGAGAGAGAAATGACGCTCAAAA CAGGCATACCCCTCGGAATACCAGAGGGTCAATGTGCGTTCAAAGATTCTGGG TTCTCAAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGGAATTGCAGC GAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAAT ATTGGCGAGAGACCAGATAGCGAACAAGTACAGTGTGGAAGATGAAAAGAAC TTTGAAGAAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAG ATCAGACTTGGTGTTCAGATTATCTTCTGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGA GGGTGAGAATCCCGTGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTCTAGCACC TTCGGTGTTCAGATTGTAATTTGAAGATGGTAACTTGGGTTTGGCTCAGAACTA ATACTCCAATTTGGTGTGATGGTAAATAGCAAAACCTCGTCAATTACACAATA TCATTGGGGCTGTTGTTGCTGCTGAAACCCCTGAAGGTCAAGCTTTGGGAATT GGCTGTAAAGGCAACAACAATCACTTCAGGTTTGAATATTCCCTAGCTACAGGT AATTGGGGTGAACAGAAAAGGCTATGAGTTCAAGAGCTGGTGTCTCAAGTT TCCAATCATTATTCTTGAAGAATGGGGTATGGAACCTTGAAGATTATTTA CCTCATCAAGTCCAGATGTTACAAGAATTTTCTGTTAATGGTGTGGCATGGTA TTCTCTCCAGAAGTTCAATTTAGAGATATTGTAAGAAAGAAATTTAAAGTTT TCACTGATGCTGGTAGAGTTTATAGACCTGAATTGGCGGTCTTTATTAGCTAATC TTTTCAGAATCTGTTTAAAGAAGTTAACAAGAGATATTTATCGTTATATGCAAGTT AAAAATTTATCATTAAATGTCTGTATCTCTGTTGGTCTTAAATCGTTACTTATT CTTCAACTTTATCACATTTAAGCTTGAATTTCTTTATAACTAATGGTATTGTGGA ATATGTTGATGCTGAAGAAAAA</p> |  <p>0-1175 bp</p> |
| <p>Takson 8 (G) (%) <i>Metchnikowia sp.</i></p> | <p>ITS_LSU_RPB2-G- Takson8</p> | <p>TCTGCAAGTCATATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCGAGAAACC AAGAGATCCGCTGTTGAAAGTTTTCCGGAGGTTTGAGAGTAATATCGCTCACCC ACGCATGCCCTGGGAATACCCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCGAGT TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATACCG GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGTGGAAGATGAAAAGCACTTTG AAAAGAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAAGCA GACACTTAACTGGCCAGCATCGGGCGTCCACTGGAAGTGGCGCCACAGAG GGTGACAGCCCCGTGTAAGGATGCTGGCGTAAATGGTTGCAAGTGCACCGTCTG AAACCGGACCGGGAGCAAAACCCAGGGGAATGTACCTTTGAGGATTATA ACCCCGTCTTACTGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGGGCCCAAAA CCCATACGCGCAATGAAAGTAAACCGAGCGAACCTTACCCTGTCAGCGGGAATT GTAATTTGAAGAGATTTGGTCCGGCCGGCAGGGCCCTTCAACGCCCTCATCCC AGATCTCCAGAACAAATACTCCAATTGGCCGTGACGGTAAGATCGCCAAACCTA GACAGTTGCAACAACCCACTGGGGTCTGTATGTCTGCAGAAACTCCTGAAG GTCAGCGGTGGCGTGGCGGTCAAGTACAGACCATCACTGATGGTTTGGCGG TACTGTTGGCCAGGTAATTGGGGTGAACAAGAAAGGCCATGAGTGCACGT GCCGGTGTGTCAGGTTGGCCGATCTGTACTTCTGGAGGAGTGGGGTATGGA ACCCTGGAGGACTATGTTCTTGAACCGCACCCAGACTGCACTAGAGTGTGTTGTC AACGGTGTGGGTTGGTACACCTCTCCGAGGTGTCGATCATCAGGGATATCA GAGAAATGGAGTTCAAGATCTTACCAGTGCAGGCCGTGTCTACCGTCCGGGAC GACGACCCAGAGTCCGAGACCAAGGGTGAATGATGTTGCAAAAGAGCAGCT GCACAAGTTGTTGAACCTGGCCTACGATGAATATGACGAGGATGACTCCAATGC GTCAGAGAACCAGGACAGCTTGTGACACCATGAGGAGTTGAGAAGAAAGGG CGATATGTGAAGAACTTGTCTTTGATGACGTGATATCTGTTGGTACTTGAACAG ATACACATACTCATCGACATTGTCGCATTTGAG</p> |  <p>0-1199 bp</p> |

| | | | |
|---|------------------------------------|---|--|
| <p>Takson 9 (H) (%) <i>Hanseniaspora</i> <i>sp.</i></p> | <p>ITS_LSU_RPB2-H- Takson9</p> | <p>TCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTTTTTATCTTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAAC AGGCATGCCCTTGAGAATGCTCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATCCGAGT TGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTG GCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTG AAAAGAGAGTAAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCA GACATGGTGTTTTTGCATGCACTCGCGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGG GTGAGAATCCCGTTCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCGCTTGAA ACACGGACGGTTTGAGTAAGAGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAAC TATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGTAGCGGT TCTGACGTGCAAATCGATCGTCAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGA ACCATCTGCGCAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGGGTGTA AAAACCCGTACG CGTAATGAAAGTGAACGTAGGTTGGGGCCTTCGGGTGCAAGAACCAACTCCG ATTGGTAGAGATGGTAAGCTGGCCAAGCCTAGACAATTGCACAACACCCATTGG GGTCTTGATGTCCTGCTGAAACTCCTGAAGGTCAAGCTTGTTGGAAACAGCCATC AAGCATCAAACAATCACTGCTGGGTAAAGTACGCCTTGGCTACTGGTAACTGG GGTGAACAAAAGAAGGCTATGTCCTCAAGAGCTGGTGTATCCCAAGTTACCAAT TATTGCCTACTTAAAGGAATTCGGTTTGGAACTTTGGAAGATTATGTCCATAC AAGCTACCTGACGTTTCCAGAGTATTCGTCAACGGTGTGGCATGGTATCCGTC CAGTGA AATTGCCATTGTTAGAGACATCAGAGAAAAAGAAATTCGTTTCTTAACT GATGCTGGTAGAGTTTACAGACCAAGCTACGTGGTCTCTATTGGCTCACTATTC AGA AACTTTTTCAAAAAGGTTACCAAGGATATTTTCAAGTCAATGCAAGTTAAGA ACTTGTCCCTGATGTCAGGTATCTCTGTTGGTCTTGAATAGATATACTTACTCAT CCACTCTATCGCATTAAAGCATGGTCCACCTTGATCAACAAGGGTATGGTTGAAT ACTTGGATGCTGAAGAGAAAAG</p> |  <p>0-1199 bp</p> |
|---|------------------------------------|---|--|

Şekil A2.4. Birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi için açıklayıcı (elucidation) barkod yapıları

EK A3

EKA-3.1. *S. cerevisiae* olarak klasik tanımlama yöntemi ile ön tanımlamaları yapılan suşların DNA miktar ve kalite değerleri

| No | İzolasyon Kodu | Kaynağı | Spektrometre Ölçüm Değerleri | | | | |
|----|----------------|---------------------------------------|------------------------------|--------------|--------------|------------------|------------------|
| | | | DNA Konsantrasyonu (ng/ul) | Absorb. A260 | Absorb. A280 | Absorb. A260/280 | Absorb. A260/230 |
| 1 | HUF16M0T10001 | Efsane yaş maya | 64,6 | 1,292 | 0,581 | 2,22 | 2,42 |
| 2 | HUF16M0T10002 | Dorbi yaş maya | 65,1 | 1,302 | 0,609 | 2,14 | 1,65 |
| 3 | HUF16M0T10003 | Pak yaş maya | 105,9 | 2,117 | 1,001 | 2,12 | 1,24 |
| 4 | HUF16M0T10004 | Germ Mautner markhof yaş maya | 80,2 | 1,604 | 0,816 | 1,96 | 2,09 |
| 5 | HUF16M0T10005 | Pak instatn maya 125g | 93,9 | 1,878 | 0,871 | 2,15 | 1,13 |
| 6 | HUF16M0T10006 | Dr.Oetker Instant kuru maya 10g | 49,7 | 0,993 | 0,467 | 2,13 | 2,22 |
| 7 | HUF16M0T10007 | Pak Instant kuru hamur maya 10g | 54 | 1,079 | 0,507 | 2,13 | 2,22 |
| 8 | HUF16M0T10008 | Yuva Instant kuru hamur maya 10g | 38,7 | 0,774 | 0,353 | 2,19 | 2,24 |
| 9 | HUF16M0T10009 | Pak kuru hamur mayası 100g | 42 | 0,839 | 0,388 | 2,16 | 1,21 |
| 10 | HUF16M0T10010 | Yuva aktif kuru hamur mayası 100g | 60,9 | 1,219 | 0,567 | 2,15 | 2,23 |
| 11 | HUF16M0T10011 | Dr.Oetker ekşi kuru hamur mayası 35g | 54,9 | 1,097 | 0,524 | 2,09 | 1,61 |
| 12 | HUF16M0T10012 | Piyale Instant kuru hamur mayası | 63,4 | 1,268 | 0,601 | 2,11 | 2,08 |
| 13 | HUF16M0T10013 | TIB/Dibosh winw 10g | 50,1 | 1,002 | 0,476 | 2,1 | 1,62 |
| 14 | HUF16M0T10014 | Angel Instant kuru hamur mayası 100g | 67,8 | 1,355 | 0,635 | 2,13 | 1,23 |
| 15 | HUF16M0T10016 | Dibosh aktif kuru şarap mayası 12g | 62,3 | 1,246 | 0,636 | 1,96 | 1,52 |
| 16 | HUF16M0T10017 | Danboili/Lesaff re yeeast 13g | 60,9 | 1,217 | 0,561 | 2,17 | 2,37 |
| 17 | HUF16M0T10018 | Dr oetker germ kein dampel netwending | 44,5 | 0,891 | 0,413 | 2,16 | 2,18 |
| 18 | HUF16M0T10019 | Buggeman Instan 500g | 88,3 | 1,765 | 0,834 | 2,12 | 0,83 |
| 19 | HUF16M1C0001 | RSK/Instant kuru maya (08022) | 47,7 | 0,954 | 0,463 | 2,06 | 1,66 |
| 20 | HUF16M1C0002 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763 | 39,8 | 0,796 | 0,385 | 2,07 | 1,73 |
| 21 | HUF16M1C0003 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC® 6328™ | 38,7 | 0,774 | 0,34 | 2,28 | 1,76 |
| 22 | HUF16M1C0004 | Şarapçılık | 24,5 | 0,491 | 0,212 | 2,11 | 1,78 |
| 23 | HUF16M2K10001 | HÜBB | 23,1 | 0,462 | 0,216 | 2,14 | 2,09 |
| 24 | HUF16M2K10003 | HÜBB | 65,3 | 0,106 | 0,047 | 2,27 | 0,66 |
| 25 | HUF16M2K10004 | HÜBB | 57,6 | 0,153 | 0,054 | 2,84 | 0,22 |
| 26 | HUF16M2K10005 | HÜBB | 28,4 | 0,569 | 0,256 | 2,22 | 2 |
| 27 | HUF16M2K10006 | HÜBB | 33,5 | 0,67 | 0,306 | 2,19 | 2,06 |


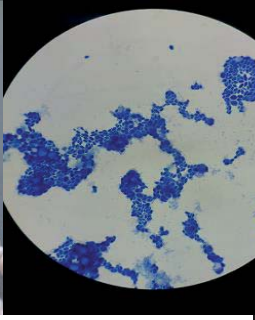
| | | | | | | | |
|----|---------------|-------------------|-------|-------|-------|------|------|
| 28 | HUF16M2K10007 | HÜBB | 39,7 | 0,794 | 0,367 | 2,16 | 2,23 |
| 29 | HUF16M2K10009 | HÜBB | 52,8 | 0,056 | 0,022 | 2,52 | 1,95 |
| 30 | HUF16M2K10010 | HÜBB | 64,8 | 0,096 | 0,033 | 2,91 | 1,19 |
| 31 | HUF16M2K10011 | HÜBB | 48,2 | 0,364 | 0,183 | 1,98 | 1,69 |
| 32 | HUF16M2K10015 | HÜBB | 26,9 | 0,538 | 0,25 | 2,15 | 0,37 |
| 33 | HUF16M3A11002 | Kayseri Üzüm | 42,2 | 0,044 | 0,059 | 0,74 | 0,55 |
| 34 | HUF16M3A11003 | Kayseri Üzüm | 28,5 | 0,57 | 0,283 | 2,02 | 1,88 |
| 35 | HUF16M3A12012 | Kayseri Toprak | 44,6 | 0,092 | 0,049 | 1,88 | 2,9 |
| 36 | HUF16M3A12013 | Kayseri Toprak | 47,9 | 0,158 | 0,085 | 1,86 | 0,65 |
| 37 | HUF16M3A12014 | Kayseri Toprak | 53,2 | 0,065 | 0,032 | 2,04 | 0,79 |
| 38 | HUF16M3B11016 | Kırıkkale Üzüm | 85,5 | 1,71 | 0,882 | 1,94 | 0,83 |
| 39 | HUF16M3B11017 | Kırıkkale Üzüm | 65,6 | 1,312 | 0,7 | 1,88 | 1,75 |
| 40 | HUF16M3B11020 | Kırıkkale Üzüm | 35,2 | 0,703 | 0,357 | 1,97 | 1,8 |
| 41 | HUF16M3B11021 | Kırıkkale Üzüm | 73 | 1,459 | 0,781 | 1,87 | 1,85 |
| 42 | HUF16M3B11023 | Kırıkkale Üzüm | 54,6 | 1,093 | 0,57 | 1,92 | 1,76 |
| 43 | HUF16M3C11031 | Kırşehir Üzüm | 32,1 | 0,642 | 0,328 | 1,95 | 2,13 |
| 44 | HUF16M3C11032 | Kırşehir Üzüm | 57,1 | 0,342 | 0,163 | 2,1 | 0,94 |
| 45 | HUF16M3C11033 | Kırşehir Üzüm | 42 | 0,841 | 0,419 | 2,01 | 1,59 |
| 46 | HUF16M3C11034 | Kırşehir Üzüm | 43,2 | 0,863 | 0,428 | 2,02 | 0,58 |
| 47 | HUF16M3C12041 | Kırşehir Toprak | 10,8 | 0,217 | 0,18 | 1,2 | 0,92 |
| 48 | HUF16M3D11047 | Nevşehir Üzüm | 26,4 | 0,528 | 0,275 | 1,92 | 1,99 |
| 49 | HUF16M3D11048 | Nevşehir Üzüm | 34,7 | 0,695 | 0,344 | 2,02 | 0,53 |
| 50 | HUF16M3D11049 | Nevşehir Üzüm | 33,2 | 0,664 | 0,353 | 1,88 | 0,6 |
| 51 | HUF16M3D11052 | Nevşehir Üzüm | 41,6 | 0,832 | 0,449 | 1,85 | 0,63 |
| 52 | HUF16M3E11059 | Aksaray Üzüm | 34,8 | 0,697 | 0,335 | 2,08 | 0,9 |
| 53 | HUF16M3F11076 | Ankara Üzüm | 39,9 | 0,799 | 0,412 | 1,94 | 1,01 |
| 54 | HUF16M3F11078 | Ankara Üzüm | 38,9 | 0,777 | 0,4 | 1,94 | 1,29 |
| 55 | HUF16M3G11085 | Eskişehir Üzüm | 33,5 | 0,669 | 0,33 | 2,03 | 1,72 |
| 56 | HUF16M3G11086 | Eskişehir Üzüm | 24,5 | 0,489 | 0,313 | 1,86 | 0,72 |
| 57 | HUF16M3G11088 | Eskişehir Üzüm | 78,5 | 1,571 | 0,8 | 1,96 | 1,45 |
| 58 | HUF16M3G11089 | Eskişehir Üzüm | 48,9 | 0,978 | 0,495 | 1,98 | 1,67 |
| 59 | HUF16M3H11101 | Çankırı Üzüm | 53,1 | 1,063 | 0,547 | 1,94 | 1,6 |
| 60 | HUF16M3H11104 | Çankırı Üzüm | 49,2 | 0,985 | 0,515 | 1,91 | 1,98 |
| 61 | HUF17M3A21001 | Kayseri1 Üzüm | 100,6 | 2,011 | 1,077 | 1,87 | 1,03 |
| 62 | HUF17M3A31013 | Kayseri2 Üzüm | 76,6 | 1,531 | 0,819 | 1,87 | 1,09 |
| 63 | HUF17M3A32019 | Kayseri2 Toprak | 97,6 | 1,952 | 1,05 | 1,86 | 0,46 |
| 64 | HUF17M3B32047 | Kırıkkale2 Toprak | 50,6 | 0,212 | 0,104 | 2,04 | 0,39 |
| 65 | HUF17M3C21050 | Kırşehir1 Üzüm | 99,7 | 1,994 | 1,015 | 1,96 | 1,63 |

| | | | | | | | |
|-----|---------------|----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| 66 | HUF17M3C31063 | Kırşehir2 Üzüm | 41,9 | 0,838 | 0,406 | 2,06 | 0,32 |
| 67 | HUF17M3C31064 | Kırşehir2 Üzüm | 94,5 | 1,889 | 0,999 | 1,89 | 1,45 |
| 68 | HUF17M3C31065 | Kırşehir2 Üzüm | 73,6 | 1,471 | 0,766 | 1,92 | 1,56 |
| 69 | HUF17M3C31066 | Kırşehir2 Üzüm | 97,5 | 1,949 | 1,019 | 1,91 | 1,33 |
| 70 | HUF17M3D31086 | Nevşehir2 Üzüm | 77,2 | 1,544 | 0,802 | 1,93 | 1,31 |
| 71 | HUF17M3D31087 | Nevşehir2 Üzüm | 44 | 0,079 | 0,027 | 2,88 | 0,18 |
| 72 | HUF17M3D31088 | Nevşehir2 Üzüm | 70,9 | 1,418 | 0,739 | 1,92 | 1,43 |
| 73 | HUF17M3D31089 | Nevşehir2 Üzüm | 51,6 | 1,032 | 0,548 | 1,88 | 0,73 |
| 74 | HUF17M3D31090 | Nevşehir2 Üzüm | 56,3 | 1,126 | 0,578 | 1,95 | 0,87 |
| 75 | HUF17M3D32092 | Nevşehir2 Toparak | 70,9 | 1,418 | 0,739 | 1,92 | 1,43 |
| 76 | HUF17M3D32093 | Nevşehir2 Toparak | 53,8 | 0,077 | 0,036 | 2,12 | 0,12 |
| 77 | HUF17M3D32096 | Nevşehir2 Toparak | 40,6 | 0,212 | 0,104 | 2,04 | 0,39 |
| 78 | HUF17M3E21109 | Aksaray2 Üzüm | 49,8 | 0,196 | 0,107 | 1,84 | 0,62 |
| 79 | HUF17M3E21110 | Aksaray2 Üzüm | 54,4 | 0,089 | 0,048 | 1,85 | 0,5 |
| 80 | HUF17M3E21112 | Aksaray2 Üzüm | 105,4 | 2,109 | 1,018 | 2,07 | 0,67 |
| 81 | HUF17M3E21113 | Aksaray2 Üzüm | 67,6 | 1,353 | 0,711 | 1,9 | 0,96 |
| 82 | HUF17M3E21114 | Aksaray2 Üzüm | 47,3 | 0,946 | 0,484 | 1,95 | 1,48 |
| 83 | HUF17M3E21115 | Aksaray2 Üzüm | 54,4 | 1,088 | 0,558 | 1,95 | 1,14 |
| 84 | HUF17M3E22117 | Aksaray2 Toprak | 48,5 | 0,97 | 0,504 | 1,92 | 1,75 |
| 85 | HUF17M3F21122 | Ankara1 Üzüm | 88,3 | 1765 | 914 | 1,93 | 1,81 |
| 86 | HUF17M3F21123 | Ankara1 Üzüm | 67,6 | 1351 | 695 | 1,95 | 1,89 |
| 87 | HUF17M3F21124 | Ankara1 Üzüm | 86,7 | 1735 | 902 | 1,92 | 1,67 |
| 88 | HUF17M3F21125 | Ankara1 Üzüm | 72,4 | 1448 | 725 | 2 | 1,96 |
| 89 | HUF17M3F21126 | Ankara1 Üzüm | 70,4 | 1409 | 728 | 1,94 | 1,75 |
| 90 | HUF17M3F21127 | Ankara1 Üzüm | 58,8 | 1176 | 599 | 1,96 | 1,85 |
| 91 | HUF17M3F21128 | Ankara1 Toprak | 48,1 | 161 | 82 | 1,96 | 0,88 |
| 92 | HUF17M3F21134 | Ankara1 Toprak | 54,4 | 1088 | 572 | 1,9 | 1,5 |
| 93 | HUF17M3F31135 | Ankara2 Üzüm | 57,5 | 1150 | 589 | 1,95 | 1,75 |
| 94 | HUF17M3F31136 | Ankara2 Üzüm | 55,3 | 1105 | 594 | 1,86 | 1,42 |
| 95 | HUF17M3F31139 | Ankara2 Üzüm | 40,7 | 814 | 410 | 1,98 | 1,59 |
| 96 | HUF17M3F32141 | Ankara2 Toparak | 37,8 | 756 | 375 | 2,01 | 2,08 |
| 97 | HUF17M3F32146 | Ankara2 Toparak | 45,2 | 905 | 461 | 1,96 | 1,58 |
| 98 | HUF17M3G31147 | Eskişehir1 Üzüm | 47 | 941 | 524 | 1,79 | 1,06 |
| 99 | HUF17M3G31150 | Eskişehir1 Üzüm | 59 | 1180 | 613 | 1,92 | 1,67 |
| 100 | HUF17M3G31151 | Eskişehir1 Üzüm | 57,4 | 1149 | 611 | 1,88 | 1,56 |
| 101 | HUF17M3G31152 | Eskişehir1 Üzüm | 81,7 | 1634 | 868 | 1,88 | 1,57 |
| 102 | HUF17M3G32153 | Eskişehir1 Toprak | 27,2 | 544 | 259 | 2,1 | 2,12 |


| | | | | | | | |
|-----|---------------|----------------------|------|------|-----|------|------|
| 103 | HUF17M3G32157 | Eskişehir1 Toprak | 61,8 | 1236 | 642 | 1,93 | 1,83 |
| 104 | HUF17M3H21173 | Çankırı1 Üzüm | 71,3 | 1425 | 685 | 2,08 | 1,9 |
| 105 | HUF17M3H21174 | Çankırı1 Üzüm | 62,6 | 1251 | 657 | 1,91 | 1,54 |
| 106 | HUF17M3H21175 | Çankırı1 Üzüm | 56,8 | 1135 | 610 | 1,86 | 1,3 |
| 107 | HUF17M3H22179 | Çankırı1 Toprak | 50,9 | 1018 | 532 | 1,91 | 1,52 |
| 108 | HUF17M3H22180 | Çankırı1 Toprak | 44,2 | 85 | 38 | 2,23 | 0,37 |
| 109 | HUF17M3H22182 | Çankırı1 Toprak | 54,6 | 92 | 48 | 1,94 | 0,5 |
| 110 | HUF17M3H31185 | Çankırı2 Üzüm | 37,7 | 755 | 420 | 1,8 | 1,01 |
| 111 | HUF17M3H32189 | Çankırı2 Toprak | 66,5 | 131 | 78 | 1,68 | 0,51 |
| 112 | HUF17M3H21196 | Karaman1 Üzüm | 31,3 | 625 | 319 | 1,96 | 1,31 |
| 113 | HUF17M3H21197 | Karaman1 Üzüm | 47,5 | 150 | 77 | 1,94 | 0,49 |
| 114 | HUF17M3H21199 | Karaman1 Üzüm | 46,9 | 139 | 73 | 1,9 | 1,25 |
| 115 | HUF17M3H21200 | Karaman1 Üzüm | 42,9 | 859 | 424 | 2,03 | 1,42 |
| 116 | HUF17M3H21208 | Karaman2 Üzüm | 57,9 | 1159 | 613 | 1,89 | 1,29 |
| 117 | HUF17M3H21209 | Karaman2 Üzüm | 52,7 | 55 | 28 | 1,97 | 0,4 |
| 118 | HUF17M3H21210 | Karaman2 Üzüm | 73,4 | 1468 | 736 | 2 | 2,08 |
| 119 | HUF17M3H21212 | Karaman2 Üzüm | 52,4 | 1047 | 528 | 1,98 | 2,1 |
| 120 | HUF17M3H22218 | Karaman2 Toprak | 47,9 | 159 | 80 | 1,98 | 0,88 |

EKA-3.2. İzolasyon tanımlama kayıt bilgi formu örneği

| | | | |
|--------------------------|--|--------------------|------|
| Genel Bilgi Formu | | No:1 | |
| ID | HUF16M0T10001 | | |
| Kaynağı | Ticari | GPS Kodu: | |
| Takson Adı | <i>S. cerevisiae</i> | Tarih | 2016 |
| | | Takson Kodu | A2 |
| Sınıflandırılma | <i>Saccharomyces, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Saccharomycetaceae, Saccharomycetaceae, Saccharomyces, cerevisiae</i> | | |
| Tür tayini | <i>S. cerevisiae</i> | | |
| Güvenlik düzeyi | BSL1 <i>Kullanıcıların kendi ülkelerindeki biyogüvenlik yasalarının belirlediği güvenlik kriterlerinden kullanıcı sorumludur.</i> | | |
| Ürün Formatı | Yatık agar (YGC) ve %50 gliserollü stok – 80 °C | | |

| | | | |
|---|---|-------------------------------|----------------------|
| Depolama Koşulları | Gliserol stok: -80°C veya altı Agar kültürü: 4°C, - 8°C | | |
| Besiyeri | YGC/YPD/NB/NA | | |
| Gelişme Şartları | Sıcaklık: 25°C - 30°C Atmosfer: Tipik aerobik, fakültatif aerob | | |
| Sınıflandırılma | <i>Saccharomyces</i> , <i>Saccharomycetidae</i> , <i>Saccharomycetales</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>cerevisiae</i> | | |
| Klasik Tanımlama Sonuçları | | | |
| Makroskobik Tanımlama | Mikroskobik Tanımlama | Biyokimyasal Tanımlama | |
|  |  | Test Adı | Değerlendirme |
| | | Maltoz Testi | <i>Pozitif</i> |
| | | Galaktoz Testi | <i>Pozitif</i> |
| | | Glukoz Testi | <i>Pozitif</i> |
| | | Rafinoz Testi | <i>Pozitif</i> |
| | | Cellobiyoz Testi | <i>Negatif</i> |
| | | Nitrat İndirgeme Testi | <i>yok</i> |
| Değerlendirme | Değerlendirme | Değerlendirme | |
| Krem rengi Yarı parlak-yarı mat Yuvarlak kremi/pürüzsüz Yumuşak nemli/düzgün Altta kahverengi | Küresel, eliptik veya uzun Tomurcuklanma Rastgele dağılım | - | |
| MALDI-TOF MS Tanımlama Sonucu | | | |
| Family | Genus | Species | Similarity |
| <i>Saccharomycetaceae</i> | <i>Saccharomyces</i> | <i>S. cerevisiae</i> | %99 |
| | | | |
| Moleküler Tanımlama Sonuçları | | | |

| Primer Gen Bölgesi | ITS (ileri-geri yön) | LSU (ileri-geri yön) | RPB (ileri-geri yön) | |
|--------------------------------|--|--|--|--|
| Primer Sekansı | ITS1 F: 5'- TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3' ITS4 R: 5'- TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3' | LR0R: 5'- ACCCGCTGA ACTTAAGC-3' LR5: 5'- TCCTGAGGG AAACCTCG-3' | fRPB2-5F: 5'- GAYGAYMGWGATCAYTTYGG -3' RPB2-7R: 5'- CCCATWGCYTGCTTMCCCAT- 3' | |
| Sekans Datası | GGAAGACAC CGGGATTGC CTTAGTAAC GGCGAGTGA AGCGGCAAA AGCTCAAAT TTGAAATCT GGTACCTTC GGTGCCCGA GTTGTAAATTT GGAGAGGGC AACTTTGGG GCCG | GGGGGGTGAATTTGGGCAGTC ATTATTGGCCCAACTTTTCAA GACATTGTTCAAAAAATTAAC TAAAGATATTTCCGTTATAT GCAAAGAAGTGTAGAGGAAG CCCATGACTTTAACATGAAAT TAGCGATTAATGCAAAAACCA TAACATCGGGTCTTAAGTACG CTTTGGCTACTGGTAACTGGG GTGAACAAAAAAGCCATG TCTTCTAGGGCAGGTGTTTCT CAGGTTTTGAACCGTTACACT TATTCATCCACTTTATCACATT TAAGAAGAACAACACTCCT ATTGGTCGTGATGGTAAATTA GCCAAACCACGTCAATTGCAT AA | | |
| | ITS | LSU | RPB2 | |
| NCBI Blast Sorgulaması: | KX023222.1 | KY109392.1 | CP005599.2 | |
| | | | | |
| DNA Barkod Yapısı | | | | |
| | ITS | LSU | RPB2 | |
| Barkod Sekansı | TCTGCAATTCACAT TACGTATCGCATTT CGCTGCGTTCTTCA TCGATGCGAGAACC AAGAGATCCGTTGT TGAAAGTTTTAGAA | CGAGTTGTTT GGGAATGCA GCTCTAAGT GGGTGGTAA ATTCCATCTA AAGCTAAAT | AGAACAAACACTCCTATTGGT CGTGATGGTAAATTAGCCAAA CCACGTCAATTGCATAATACA CATTGGGGGTTGGTCTGTCCT GCAGAACTCCTGAAGGCCA AGCGTGTGGAATTAGCGATTA | |

| | | | |
|-----------------------|---|---|--|
| | TGTTTGAGAAGGAA ATGACGCTCAAACA GGCATGCCCCCTGG AATACCAAGGGGC GCAATGTGCGTTCA AA | ATTGGCGAG AGACCGATA GCGAACAAG TACAGTGAT GGAAAGATG AAAAGAACT TTGAAAAGA GAGT | ATGCAAAAACCATAACATCG GGTCTTAAGTACGCTTTGGCT ACTGGTAACTGGGGTGAACA AAAAAAAGCCATGTCTTCTAG GGCAGGTGTTTCTCAGGTTGC CTATCATCACTTTTTTAAGTG AATGGGGTATGGAACCACTG GAAGATTACG |
| Barkod Görsele |  | | |

EK-B-C

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

EKB- 1. İzolasyonların tamamında ITS gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | d | SE | | | | | | | |
| Takson 1 | 0,041373 | 0,003338524 | | | | | | | |
| Takson 2 | 0,129738 | 0,009611768 | | | | | | | |
| Takson 3 | 0,058125 | 0,011623471 | | | | | | | |
| Takson 4 | 0 | 0 | | | | | | | |
| Takson 5 | 0,06875 | 0,016295698 | | | | | | | |
| Takson 6 | 0,033522 | 0,009100421 | | | | | | | |
| Takson 7 | 0,011521 | 0,004348733 | | | | | | | |
| Takson 8 | 0,097024 | 0,008244879 | | | | | | | |
| Takson 9 | 0,004167 | 0,004177143 | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | Takson_4 | Takson_8 | Takson_1 | Takson_2 | Takson_7 | Takson_6 | Takson_3 | Takson_5 | Takson_9 |
| Takson_4 | | 0,016 | 0,020 | 0,015 | 0,014 | 0,018 | 0,009 | 0,018 | 0,015 |
| Takson_8 | 0,489 | | 0,023 | 0,013 | 0,015 | 0,017 | 0,016 | 0,019 | 0,014 |
| Takson_1 | 0,637 | 0,549 | | 0,018 | 0,025 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,022 |
| Takson_2 | 0,520 | 0,490 | 0,588 | | 0,012 | 0,013 | 0,015 | 0,017 | 0,011 |
| Takson_7 | 0,557 | 0,479 | 0,569 | 0,469 | | 0,015 | 0,017 | 0,019 | 0,013 |
| Takson_6 | 0,493 | 0,438 | 0,610 | 0,457 | 0,393 | | 0,018 | 0,020 | 0,014 |
| Takson_3 | 0,240 | 0,445 | 0,612 | 0,502 | 0,502 | 0,446 | | 0,017 | 0,017 |
| Takson_5 | 0,570 | 0,507 | 0,641 | 0,542 | 0,545 | 0,493 | 0,547 | | 0,018 |
| Takson_9 | 0,555 | 0,476 | 0,589 | 0,468 | 0,510 | 0,463 | 0,510 | 0,542 | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | Takson_4 | Takson_8 | Takson_1 | Takson_2 | Takson_7 | Takson_6 | Takson_3 | Takson_5 | Takson_9 |
| Takson_4 | | 0,014 | 0,021 | 0,015 | 0,014 | 0,016 | 0,006 | 0,016 | 0,015 |
| Takson_8 | 0,283 | | 0,023 | 0,012 | 0,015 | 0,014 | 0,014 | 0,018 | 0,013 |
| Takson_1 | 0,561 | 0,409 | | 0,019 | 0,026 | 0,019 | 0,020 | 0,020 | 0,023 |
| Takson_2 | 0,317 | 0,222 | 0,451 | | 0,013 | 0,011 | 0,014 | 0,016 | 0,010 |
| Takson_7 | 0,376 | 0,233 | 0,453 | 0,227 | | 0,012 | 0,016 | 0,015 | 0,013 |
| Takson_6 | 0,275 | 0,155 | 0,458 | 0,177 | 0,135 | | 0,015 | 0,015 | 0,013 |
| Takson_3 | 0,073 | 0,213 | 0,511 | 0,273 | 0,295 | 0,202 | | 0,015 | 0,015 |
| Takson_5 | 0,360 | 0,232 | 0,496 | 0,270 | 0,295 | 0,206 | 0,312 | | 0,017 |
| Takson_9 | 0,358 | 0,214 | 0,458 | 0,209 | 0,273 | 0,189 | 0,288 | 0,277 | |

| DİVERSİTY | | | |
|---|-------|-------|--|
| Mean Diversity Within Sub Population | | | |
| | d | SE | |
| Diversity | 0,049 | 0,003 | |
| | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | |
| Diversity | 0,325 | 0,015 | |
| | | | |
| Mean İnterpopulation Diversity | | | |
| Diversity | 0,276 | 0,014 | |
| | | | |
| Coefficient Of Differantiation | | | |
| Diversity | 0,848 | 0,01 | |

EKB- 2.İzolasyonların tamamında ITS gen bölgesi barkod sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | d | SE | | | | | | | |
| <i>Takson 8</i> | 0,086862 | 0,007576 | | | | | | | |
| <i>Takson 1</i> | 0,015942 | 0,001650 | | | | | | | |
| <i>Takson 4</i> | 0 | 0 | | | | | | | |
| <i>Takson 2</i> | 0,110707 | 0,010222 | | | | | | | |
| <i>Takson 6</i> | 0,033522 | 0,009287 | | | | | | | |
| <i>Takson 3</i> | 0,058125 | 0,011612 | | | | | | | |
| <i>Takson 9</i> | 0,004166 | 0,004135 | | | | | | | |
| <i>Takson 7</i> | 0,011520 | 0,00446 | | | | | | | |
| <i>Takson 5</i> | 0,05 | 0,012520 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | <i>Takson _8</i> | <i>Takson _1</i> | <i>Takson _4</i> | <i>Takson _2</i> | <i>Takson _6</i> | <i>Takson _3</i> | <i>Takson _9</i> | <i>Takson _7</i> | <i>Takson _5</i> |
| <i>Takson _8</i> | | 0,036 | 0,024 | 0,022 | 0,020 | 0,023 | 0,022 | 0,024 | 0,026 |
| <i>Takson _1</i> | 0,499 | | 0,039 | 0,023 | 0,034 | 0,039 | 0,039 | 0,033 | 0,037 |
| <i>Takson _4</i> | 0,181 | 0,539 | | 0,024 | 0,023 | 0,013 | 0,026 | 0,025 | 0,027 |
| <i>Takson _2</i> | 0,251 | 0,585 | 0,249 | | 0,019 | 0,022 | 0,022 | 0,021 | 0,023 |
| <i>Takson _6</i> | 0,136 | 0,507 | 0,137 | 0,232 | | 0,021 | 0,023 | 0,017 | 0,025 |
| <i>Takson _3</i> | 0,179 | 0,558 | 0,060 | 0,236 | 0,135 | | 0,025 | 0,023 | 0,027 |
| <i>Takson _9</i> | 0,166 | 0,548 | 0,172 | 0,216 | 0,132 | 0,167 | | 0,025 | 0,026 |
| <i>Takson _7</i> | 0,167 | 0,472 | 0,156 | 0,266 | 0,073 | 0,154 | 0,141 | | 0,026 |
| <i>Takson _5</i> | 0,204 | 0,561 | 0,183 | 0,226 | 0,151 | 0,198 | 0,165 | 0,154 | |
| | | | | | | | | | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> | <i>Takson</i> |

| | _8 | _1 | _4 | _2 | _6 | _3 | _9 | _7 | _5 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Takson_8 | | 0,033 | 0,023 | 0,019 | 0,017 | 0,021 | 0,020 | 0,022 | 0,023 |
| Takson_1 | 0,448 | | 0,038 | 0,024 | 0,034 | 0,038 | 0,039 | 0,033 | 0,039 |
| Takson_4 | 0,137 | 0,531 | | 0,022 | 0,022 | 0,008 | 0,026 | 0,025 | 0,027 |
| Takson_2 | 0,153 | 0,522 | 0,193 | | 0,017 | 0,019 | 0,020 | 0,021 | 0,020 |
| Takson_6 | 0,076 | 0,482 | 0,120 | 0,160 | | 0,018 | 0,021 | 0,015 | 0,020 |
| Takson_3 | 0,106 | 0,521 | 0,031 | 0,152 | 0,089 | | 0,023 | 0,023 | 0,025 |
| Takson_9 | 0,120 | 0,537 | 0,170 | 0,159 | 0,113 | 0,136 | | 0,026 | 0,024 |
| Takson_7 | 0,118 | 0,458 | 0,150 | 0,205 | 0,050 | 0,119 | 0,133 | | 0,024 |
| Takson_5 | 0,136 | 0,528 | 0,158 | 0,146 | 0,109 | 0,144 | 0,138 | 0,123 | |
| | | | | | | | | | |
| DIVERSITY | | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| Diversity | 0,041 | 0,003 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,325 | 0,015 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean Interpopulation Diversity | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,284 | 0,014 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Coefficient Of Differentiation | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,873 | 0,01 | | | | | | | |

EKB- 3. İzolasyonların tamamında LSU gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | d | SE | | | | | | | |
| Takson 1 | 0,023253786 | 0,0034587 | | | | | | | |
| Takson 8 | 0,229310872 | 0,0073598 | | | | | | | |
| Takson 2 | 0,252464021 | 0,0065207 | | | | | | | |
| Takson 7 | 0,436320036 | 0,0092486 | | | | | | | |
| Takson 9 | 0,302094531 | 0,0080013 | | | | | | | |
| Takson 6 | 0,251522236 | 0,0088945 | | | | | | | |
| Takson 4 | 0,209057141 | 0,0066240 | | | | | | | |
| Takson 3 | 0,260127498 | 0,0073204 | | | | | | | |
| Takson 5 | 0,205974935 | 0,0073962 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | Takson_1 | Takson_8 | Takson_2 | Takson_7 | Takson_9 | Takson_6 | Takson_4 | Takson_3 | Takson_5 |
| Takson_1 | | 0,009 | 0,013 | 0,015 | 0,016 | 0,014 | 0,018 | 0,015 | 0,019 |
| Takson_8 | 0,153 | | 0,012 | 0,011 | 0,012 | 0,012 | 0,014 | 0,013 | 0,015 |
| Takson_2 | 0,325 | 0,377 | | 0,011 | 0,011 | 0,010 | 0,011 | 0,011 | 0,013 |
| Takson_7 | 0,354 | 0,471 | 0,377 | | 0,008 | 0,009 | 0,009 | 0,010 | 0,010 |

| | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Takson_9</i> | 0,287 | 0,440 | 0,338 | 0,459 | | 0,009 | 0,010 | 0,011 | 0,010 |
| <i>Takson_6</i> | 0,286 | 0,387 | 0,323 | 0,390 | 0,340 | | 0,011 | 0,012 | 0,012 |
| <i>Takson_4</i> | 0,311 | 0,431 | 0,403 | 0,530 | 0,458 | 0,421 | | 0,006 | 0,010 |
| <i>Takson_3</i> | 0,335 | 0,410 | 0,405 | 0,492 | 0,430 | 0,411 | 0,246 | | 0,011 |
| <i>Takson_5</i> | 0,322 | 0,440 | 0,401 | 0,506 | 0,442 | 0,411 | 0,468 | 0,446 | |
| | | | | | | | | | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | <i>Takson_1</i> | <i>Takson_8</i> | <i>Takson_2</i> | <i>Takson_7</i> | <i>Takson_9</i> | <i>Takson_6</i> | <i>Takson_4</i> | <i>Takson_3</i> | <i>Takson_5</i> |
| <i>Takson_1</i> | | 0,007 | 0,013 | 0,015 | 0,016 | 0,014 | 0,018 | 0,014 | 0,019 |
| <i>Takson_8</i> | 0,027 | | 0,011 | 0,010 | 0,011 | 0,010 | 0,012 | 0,010 | 0,013 |
| <i>Takson_2</i> | 0,187 | 0,136 | | 0,009 | 0,010 | 0,008 | 0,011 | 0,010 | 0,012 |
| <i>Takson_7</i> | 0,124 | 0,138 | 0,033 | | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,009 | 0,009 |
| <i>Takson_9</i> | 0,125 | 0,175 | 0,061 | 0,090 | | 0,008 | 0,010 | 0,011 | 0,010 |
| <i>Takson_6</i> | 0,149 | 0,147 | 0,071 | 0,046 | 0,063 | | 0,010 | 0,010 | 0,011 |
| <i>Takson_4</i> | 0,195 | 0,212 | 0,172 | 0,208 | 0,202 | 0,191 | | 0,003 | 0,010 |
| <i>Takson_3</i> | 0,194 | 0,165 | 0,149 | 0,144 | 0,149 | 0,155 | 0,011 | | 0,010 |
| <i>Takson_5</i> | 0,207 | 0,222 | 0,171 | 0,185 | 0,188 | 0,182 | 0,261 | 0,213 | |
| | | | | | | | | | |
| DİVERSİTY | | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| Diversity | 0,241 | 0,004 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,286 | 0,008 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean İnterpopulation Diversity | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,045 | 0,007 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Coefficient Of Differantiation | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,157 | 0,02 | | | | | | | |

EKB- 4. İzolasyonların tamamında LSU gen bölgesi barkod sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| | | | |
|-----------------------------------|----------|----------|--|
| DİSTANCES | | | |
| Within group Mean Distance | | | |
| | d | SE | |
| <i>Takson 1</i> | 0,011975 | 0,001161 | |
| <i>Takson 8</i> | 0,114953 | 0,008248 | |
| <i>Takson 6</i> | 0,042823 | 0,006838 | |
| <i>Takson 2</i> | 0,038925 | 0,006855 | |
| <i>Takson 3</i> | 0,076178 | 0,011651 | |
| <i>Takson 4</i> | 0,006593 | 0,002236 | |

| | | | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Takson 9 | 0,005520 | 0,001952 | | | | | | | |
| Takson 5 | 0,056967 | 0,007049 | | | | | | | |
| Takson 7 | 0,089934 | 0,012663 | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | Takson _1 | Takson _8 | Takson _6 | Takson _2 | Takson _3 | Takson _4 | Takson _9 | Takson _5 | Takson _7 |
| Takson_1 | | 0,011 | 0,018 | 0,025 | 0,020 | 0,023 | 0,019 | 0,021 | 0,021 |
| Takson_8 | 0,121 | | 0,020 | 0,024 | 0,020 | 0,024 | 0,022 | 0,025 | 0,021 |
| Takson_6 | 0,198 | 0,220 | | 0,015 | 0,016 | 0,017 | 0,014 | 0,020 | 0,013 |
| Takson_2 | 0,266 | 0,273 | 0,120 | | 0,017 | 0,024 | 0,014 | 0,025 | 0,017 |
| Takson_3 | 0,249 | 0,262 | 0,193 | 0,230 | | 0,008 | 0,019 | 0,020 | 0,017 |
| Takson_4 | 0,266 | 0,288 | 0,184 | 0,254 | 0,060 | | 0,018 | 0,020 | 0,022 |
| Takson_9 | 0,188 | 0,236 | 0,126 | 0,142 | 0,194 | 0,174 | | 0,019 | 0,013 |
| Takson_5 | 0,220 | 0,242 | 0,210 | 0,217 | 0,222 | 0,214 | 0,186 | | 0,025 |
| Takson_7 | 0,249 | 0,273 | 0,102 | 0,153 | 0,226 | 0,245 | 0,114 | 0,211 | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | Takson _1 | Takson _8 | Takson _6 | Takson _2 | Takson _3 | Takson _4 | Takson _9 | Takson _5 | Takson _7 |
| Takson_1 | | 0,008 | 0,018 | 0,024 | 0,018 | 0,021 | 0,019 | 0,020 | 0,021 |
| Takson_8 | 0,057 | | 0,018 | 0,022 | 0,018 | 0,022 | 0,021 | 0,023 | 0,020 |
| Takson_6 | 0,171 | 0,142 | | 0,014 | 0,014 | 0,016 | 0,013 | 0,018 | 0,011 |
| Takson_2 | 0,240 | 0,196 | 0,079 | | 0,016 | 0,023 | 0,014 | 0,023 | 0,016 |
| Takson_3 | 0,205 | 0,167 | 0,133 | 0,172 | | 0,004 | 0,017 | 0,018 | 0,016 |
| Takson_4 | 0,257 | 0,227 | 0,159 | 0,231 | 0,018 | | 0,016 | 0,019 | 0,020 |
| Takson_9 | 0,180 | 0,176 | 0,102 | 0,120 | 0,153 | 0,168 | | 0,019 | 0,011 |
| Takson_5 | 0,186 | 0,156 | 0,160 | 0,169 | 0,155 | 0,182 | 0,154 | | 0,025 |
| Takson_7 | 0,198 | 0,171 | 0,035 | 0,089 | 0,143 | 0,197 | 0,066 | 0,138 | |
| DIVERSITY | | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| Diversity | 0,049 | 0,003 | | | | | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,179 | 0,011 | | | | | | | |
| Mean İnterpopulation Diversity | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,13 | 0,01 | | | | | | | |
| Coefficient Of Differantiation | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,725 | 0,017 | | | | | | | |

EKB- 5. İzolasyonların tamamında RPB gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | d | SE | | | | | | |
| Takson 2 | 0,11952600 | 0,003626054 | | | | | | |
| Takson 9 | 0,11716034 | 0,007217648 | | | | | | |
| Takson 8 | 0,06649552 | 0,003702548 | | | | | | |
| Takson 6 | 0,14703163 | 0,006889293 | | | | | | |
| Takson 3 | 0,39241498 | 0,011070763 | | | | | | |
| Takson 4 | 0,25831202 | 0,011682106 | | | | | | |
| Takson 5 | 0,26804820 | 0,010072808 | | | | | | |
| Takson 7 | 0,01880035 | 0,004168908 | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | |
| | Takson _2 | Takson _9 | Takson _8 | Takson _6 | Takson _3 | Takson _4 | Takson _5 | Takson _7 |
| Takson_2 | | 0,012 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,016 | 0,011 | 0,011 |
| Takson_9 | 0,367 | | 0,014 | 0,013 | 0,012 | 0,015 | 0,011 | 0,013 |
| Takson_8 | 0,360 | 0,392 | | 0,013 | 0,012 | 0,018 | 0,012 | 0,014 |
| Takson_6 | 0,364 | 0,372 | 0,325 | | 0,012 | 0,016 | 0,012 | 0,012 |
| Takson_3 | 0,521 | 0,535 | 0,516 | 0,536 | | 0,012 | 0,011 | 0,012 |
| Takson_4 | 0,604 | 0,625 | 0,607 | 0,624 | 0,533 | | 0,013 | 0,016 |
| Takson_5 | 0,388 | 0,404 | 0,381 | 0,380 | 0,532 | 0,616 | | 0,012 |
| Takson_7 | 0,282 | 0,315 | 0,340 | 0,303 | 0,529 | 0,615 | 0,345 | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | |
| | Takson _2 | Takson _9 | Takson _8 | Takson _6 | Takson _3 | Takson _4 | Takson _5 | Takson _7 |
| Takson_2 | | 0,011 | 0,013 | 0,011 | 0,011 | 0,016 | 0,010 | 0,011 |
| Takson_9 | 0,249 | | 0,013 | 0,011 | 0,012 | 0,015 | 0,009 | 0,012 |
| Takson_8 | 0,267 | 0,300 | | 0,011 | 0,011 | 0,019 | 0,011 | 0,014 |
| Takson_6 | 0,230 | 0,240 | 0,218 | | 0,012 | 0,016 | 0,010 | 0,011 |
| Takson_3 | 0,265 | 0,280 | 0,286 | 0,266 | | 0,009 | 0,011 | 0,011 |
| Takson_4 | 0,415 | 0,437 | 0,444 | 0,421 | 0,207 | | 0,014 | 0,016 |
| Takson_5 | 0,194 | 0,211 | 0,214 | 0,172 | 0,202 | 0,353 | | 0,010 |
| Takson_7 | 0,213 | 0,247 | 0,297 | 0,221 | 0,323 | 0,477 | 0,202 | |
| DIVERSITY | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | |
| Diversity | 0,173 | 0,004 | | | | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | | | | | | |
| Diversity | 0,303 | 0,006 | | | | | | |
| Mean Interpopulation Diversity | | | | | | | | |
| Diversity | 0,129 | 0,005 | | | | | | |
| Coefficient Of Differantiation | | | | | | | | |
| Diversity | 0,427 | 0,011 | | | | | | |

EKB- 6. İzolasyonların tamamında RPB2 gen bölgesi barkod sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | d | SE | | | | | | | |
| Takson 8 | 0,0234 | 0,002921 | | | | | | | |
| Takson 2 | 0,0261 | 0,002883 | | | | | | | |
| Takson 9 | 0,0791 | 0,008542 | | | | | | | |
| Takson 1 | n/c | n/c | | | | | | | |
| Takson 3 | 0,0084 | 0,005832 | | | | | | | |
| Takson 6 | 0,0607 | 0,006162 | | | | | | | |
| Takson 4 | n/c | n/c | | | | | | | |
| Takson 7 | 0,0035 | 0,002505 | | | | | | | |
| Takson 5 | 0,1287 | 0,012729 | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | Takson_8 | Takson_2 | Takson_9 | Takson_1 | Takson_3 | Takson_6 | Takson_4 | Takson_7 | Takson_5 |
| Takson_8 | | 0,016 | 0,015 | 0,003 | 0,044 | 0,016 | 0,035 | 0,017 | 0,019 |
| Takson_2 | 0,329 | | 0,016 | 0,017 | 0,046 | 0,016 | 0,040 | 0,014 | 0,020 |
| Takson_9 | 0,290 | 0,255 | | 0,017 | 0,044 | 0,015 | 0,040 | 0,015 | 0,018 |
| Takson_1 | 0,017 | 0,321 | 0,273 | | 0,066 | 0,017 | 0,035 | 0,018 | 0,020 |
| Takson_3 | 0,401 | 0,413 | 0,422 | 0,432 | | 0,047 | 0,065 | 0,049 | 0,044 |
| Takson_6 | 0,241 | 0,257 | 0,270 | 0,231 | 0,440 | | 0,040 | 0,016 | 0,019 |
| Takson_4 | 0,221 | 0,301 | 0,309 | 0,213 | 0,244 | 0,271 | | 0,040 | 0,052 |
| Takson_7 | 0,272 | 0,206 | 0,238 | 0,266 | 0,488 | 0,223 | 0,301 | | 0,019 |
| Takson_5 | 0,283 | 0,265 | 0,256 | 0,267 | 0,455 | 0,268 | 0,358 | 0,240 | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | Takson_8 | Takson_2 | Takson_9 | Takson_1 | Takson_3 | Takson_6 | Takson_4 | Takson_7 | Takson_5 |
| Takson_8 | | 0,016 | 0,015 | 0,003 | 0,044 | 0,016 | 0,035 | 0,017 | 0,019 |
| Takson_2 | 0,329 | | 0,016 | 0,017 | 0,046 | 0,016 | 0,040 | 0,014 | 0,020 |
| Takson_9 | 0,290 | 0,255 | | 0,017 | 0,044 | 0,015 | 0,040 | 0,015 | 0,018 |
| Takson_1 | 0,017 | 0,321 | 0,273 | | 0,066 | 0,017 | 0,035 | 0,018 | 0,020 |
| Takson_3 | 0,401 | 0,413 | 0,422 | 0,432 | | 0,047 | 0,065 | 0,049 | 0,044 |
| Takson_6 | 0,241 | 0,257 | 0,270 | 0,231 | 0,440 | | 0,040 | 0,016 | 0,019 |
| Takson_4 | 0,221 | 0,301 | 0,309 | 0,213 | 0,244 | 0,271 | | 0,040 | 0,052 |
| Takson_7 | 0,272 | 0,206 | 0,238 | 0,266 | 0,488 | 0,223 | 0,301 | | 0,019 |
| Takson_5 | 0,283 | 0,265 | 0,256 | 0,267 | 0,455 | 0,268 | 0,358 | 0,240 | |
| DİVERSİTY | | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| Diversity | 0,0471 | 0,00325 | | | | | | | |

| Mean Diversity in Entire Population | | | |
|--|--------|--------|--|
| Diversity | 0,199 | 0,083 | |
| | | | |
| Mean Interpopulation Diversity | | | |
| Diversity | 0,1524 | 0,0072 | |
| | | | |
| Coefficient Of Differantiation | | | |
| Diversity | 0,7636 | 0,0136 | |

EKB- 7. İzolasyonların tamamında birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB) gen bölgeleri sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | d | SE | | | | | | | |
| Takson 2 | 0,18712 | 0,0043 | | | | | | | |
| Takson 8 | 0,17603 | 0,0032 | | | | | | | |
| Takson 7 | 0,23647 | 0,0064 | | | | | | | |
| Takson 9 | 0,19309 | 0,0037 | | | | | | | |
| Takson 3 | 0,32305 | 0,0049 | | | | | | | |
| Takson 6 | 0,18979 | 0,0042 | | | | | | | |
| Takson 4 | 0,22352 | 0,0065 | | | | | | | |
| Takson 5 | 0,25561 | 0,0045 | | | | | | | |
| Takson 1 | 0,01406 | 0,0031 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | Takson _2 | Takson _8 | Takson _7 | Takson _9 | Takson _3 | Takson _6 | Takson _4 | Takson _5 | Takson _1 |
| Takson_2 | | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,009 | 0,006 |
| Takson_8 | 0,361 | | 0,009 | 0,009 | 0,008 | 0,009 | 0,008 | 0,007 | 0,007 |
| Takson_7 | 0,438 | 0,453 | | 0,006 | 0,008 | 0,007 | 0,010 | 0,006 | 0,013 |
| Takson_9 | 0,421 | 0,435 | 0,437 | | 0,007 | 0,006 | 0,008 | 0,006 | 0,012 |
| Takson_3 | 0,491 | 0,467 | 0,495 | 0,478 | | 0,008 | 0,005 | 0,008 | 0,012 |
| Takson_6 | 0,393 | 0,370 | 0,402 | 0,369 | 0,450 | | 0,011 | 0,007 | 0,012 |
| Takson_4 | 0,522 | 0,488 | 0,531 | 0,515 | 0,338 | 0,477 | | 0,009 | 0,012 |
| Takson_5 | 0,422 | 0,409 | 0,466 | 0,404 | 0,483 | 0,387 | 0,504 | | 0,012 |
| Takson_1 | 0,227 | 0,213 | 0,463 | 0,433 | 0,466 | 0,410 | 0,474 | 0,412 | |
| | | | | | | | | | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | Takson _2 | Takson _8 | Takson _7 | Takson _9 | Takson _3 | Takson _6 | Takson _4 | Takson _5 | Takson _1 |
| Takson_2 | | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,008 | 0,009 | 0,005 |
| Takson_8 | 0,179 | | 0,010 | 0,009 | 0,006 | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 0,006 |
| Takson_7 | 0,226 | 0,246 | | 0,006 | 0,007 | 0,007 | 0,011 | 0,006 | 0,014 |
| Takson_9 | 0,231 | 0,250 | 0,223 | | 0,006 | 0,005 | 0,008 | 0,006 | 0,013 |
| Takson_3 | 0,236 | 0,218 | 0,215 | 0,220 | | 0,007 | 0,005 | 0,008 | 0,011 |
| Takson_6 | 0,204 | 0,188 | 0,188 | 0,177 | 0,194 | | 0,010 | 0,006 | 0,013 |
| Takson_4 | 0,317 | 0,289 | 0,301 | 0,307 | 0,065 | 0,270 | | 0,010 | 0,013 |

| | | | | | | | | | |
|---|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Takson_5</i> | 0,200 | 0,193 | 0,220 | 0,180 | 0,194 | 0,164 | 0,264 | | 0,011 |
| <i>Takson_1</i> | 0,127 | 0,118 | 0,338 | 0,329 | 0,298 | 0,308 | 0,355 | 0,278 | |
| | | | | | | | | | |
| DİVERSİTY | | | | | | | | | |
| Mean Diversity Within Sub Population | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| Diversity | 0,199 | 0,0017 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean Diversity in Entire Population | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,3399 | 0,004 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mean İnterpopulation Diversity | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,1401 | 0,004 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Coefficient Of Differentiation | | | | | | | | | |
| Diversity | 0,412 | 0,007 | | | | | | | |

EKB- 8. İzolasyonların tamamında birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB) gen bölgeleri barkod sekanslarının filogenetik ilişkilerinin MEGA7 ile dağılım istatistikleri

| | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Within group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | d | SE | | | | | | | |
| <i>Takson_2</i> | 0,1871 | 0,0041 | | | | | | | |
| <i>Takson_8</i> | 0,1760 | 0,0032 | | | | | | | |
| <i>Takson_7</i> | 0,2364 | 0,0065 | | | | | | | |
| <i>Takson_9</i> | 0,1930 | 0,0036 | | | | | | | |
| <i>Takson_3</i> | 0,3230 | 0,0048 | | | | | | | |
| <i>Takson_6</i> | 0,1897 | 0,0042 | | | | | | | |
| <i>Takson_4</i> | 0,2235 | 0,0067 | | | | | | | |
| <i>Takson_5</i> | 0,2556 | 0,0047 | | | | | | | |
| <i>Takson_1</i> | 0,0140 | 0,0031 | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Between Group Mean Distance | | | | | | | | | |
| | <i>Takson_2</i> | <i>Takson_8</i> | <i>Takson_7</i> | <i>Takson_9</i> | <i>Takson_3</i> | <i>Takson_6</i> | <i>Takson_4</i> | <i>Takson_5</i> | <i>Takson_1</i> |
| <i>Takson_2</i> | | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 0,009 | 0,006 |
| <i>Takson_8</i> | 0,361 | | 0,010 | 0,009 | 0,008 | 0,009 | 0,008 | 0,007 | 0,007 |
| <i>Takson_7</i> | 0,438 | 0,453 | | 0,006 | 0,008 | 0,007 | 0,010 | 0,006 | 0,013 |
| <i>Takson_9</i> | 0,421 | 0,435 | 0,437 | | 0,007 | 0,006 | 0,007 | 0,006 | 0,011 |
| <i>Takson_3</i> | 0,491 | 0,467 | 0,495 | 0,478 | | 0,008 | 0,005 | 0,008 | 0,012 |
| <i>Takson_6</i> | 0,393 | 0,370 | 0,402 | 0,369 | 0,450 | | 0,010 | 0,007 | 0,012 |
| <i>Takson_4</i> | 0,522 | 0,488 | 0,531 | 0,515 | 0,338 | 0,477 | | 0,009 | 0,012 |
| <i>Takson_5</i> | 0,422 | 0,409 | 0,466 | 0,404 | 0,483 | 0,387 | 0,504 | | 0,011 |
| <i>Takson_1</i> | 0,227 | 0,213 | 0,463 | 0,433 | 0,466 | 0,410 | 0,474 | 0,412 | |
| | | | | | | | | | |
| Net Group mean Distanece | | | | | | | | | |
| | <i>Takson_2</i> | <i>Takson_8</i> | <i>Takson_7</i> | <i>Takson_9</i> | <i>Takson_3</i> | <i>Takson_6</i> | <i>Takson_4</i> | <i>Takson_5</i> | <i>Takson_1</i> |

| | | | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Takson_2</i> | | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,008 | 0,009 | 0,005 |
| <i>Takson_8</i> | 0,179 | | 0,009 | 0,009 | 0,006 | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 0,006 |
| <i>Takson_7</i> | 0,226 | 0,246 | | 0,006 | 0,007 | 0,007 | 0,011 | 0,006 | 0,013 |
| <i>Takson_9</i> | 0,231 | 0,250 | 0,223 | | 0,006 | 0,005 | 0,008 | 0,007 | 0,012 |
| <i>Takson_3</i> | 0,236 | 0,218 | 0,215 | 0,220 | | 0,007 | 0,005 | 0,007 | 0,011 |
| <i>Takson_6</i> | 0,204 | 0,188 | 0,188 | 0,177 | 0,194 | | 0,011 | 0,006 | 0,012 |
| <i>Takson_4</i> | 0,317 | 0,289 | 0,301 | 0,307 | 0,065 | 0,270 | | 0,010 | 0,012 |
| <i>Takson_5</i> | 0,200 | 0,193 | 0,220 | 0,180 | 0,194 | 0,164 | 0,264 | | 0,011 |
| <i>Takson_1</i> | 0,127 | 0,118 | 0,338 | 0,329 | 0,298 | 0,308 | 0,355 | 0,278 | |
| | | | | | | | | | |

DIVERSITY

Mean Diversity Within Sub Population

| | d | SE |
|-----------|-----|-------|
| Diversity | 0,2 | 0,002 |
| | | |

Mean Diversity in Entire Population

| | | |
|-----------|------|-------|
| Diversity | 0,34 | 0,004 |
|-----------|------|-------|

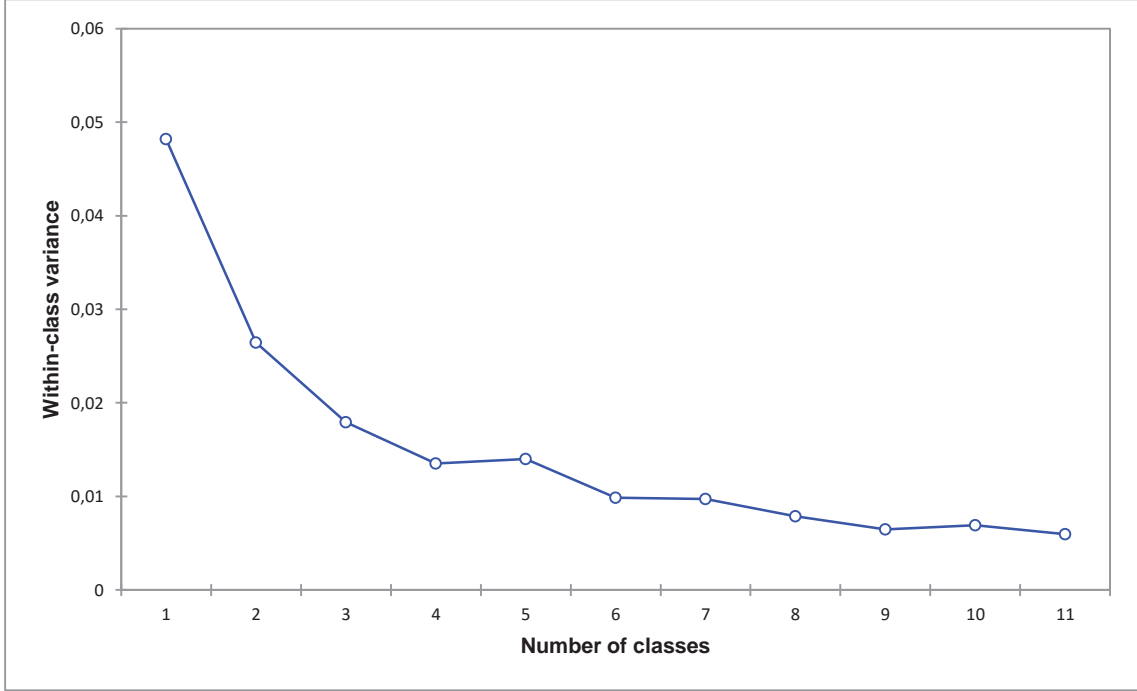
EK-C

EKC- 1. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların ITS gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means

| Summary statistics: | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,355 | 0,312 | 0,000 | 0,141 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,296 | 0,250 | 0,000 | 0,168 |

clustering) ile istatistiksel grup dağılımları istatistiksel grup dağılımları

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,048 | 0,026 | 0,018 | 0,014 | 0,014 | 0,010 | 0,010 | 0,008 | 0,006 | 0,007 | 0,006 |
| Between-classes | ##### | 0,022 | 0,030 | 0,035 | 0,034 | 0,038 | 0,038 | 0,040 | 0,042 | 0,041 | 0,042 |
| Total | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 |



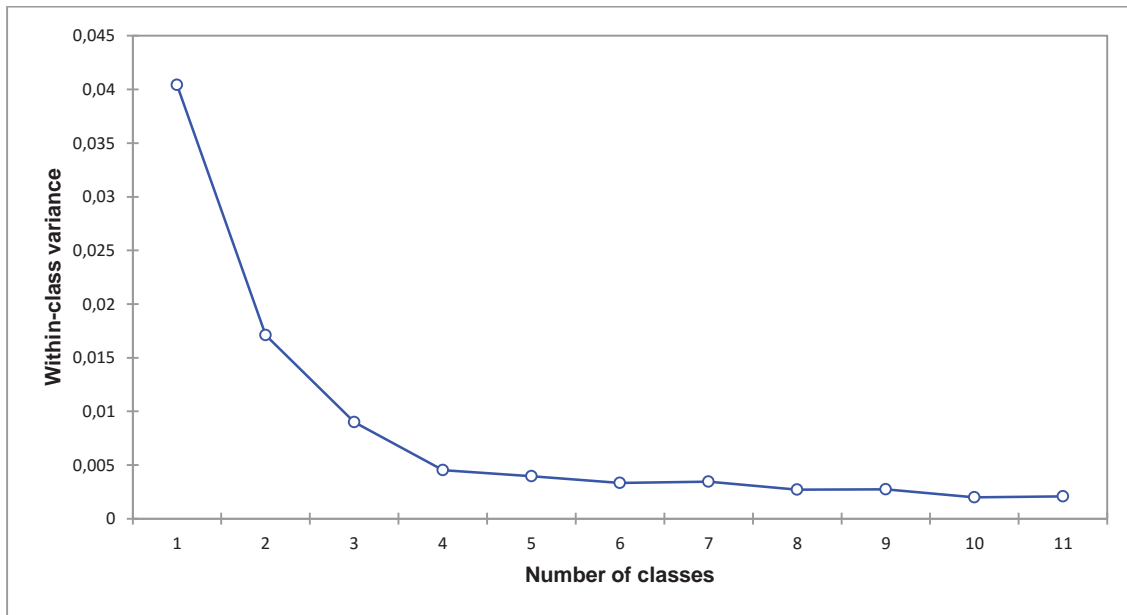
| Results by class: | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Objects | 13 | 12 | 13 | 7 | 3 | 16 |
| Sum of weights | 13 | 12 | 13 | 7 | 3 | 16 |
| Within-class variance | 0,012 | 0,010 | 0,012 | 0,015 | 0,001 | 0,006 |
| Minimum distance to centroid | 0,064 | 0,028 | 0,021 | 0,052 | 0,015 | 0,028 |
| Average distance to centroid | 0,101 | 0,090 | 0,091 | 0,108 | 0,028 | 0,066 |
| Maximum distance to centroid | 0,161 | 0,146 | 0,171 | 0,153 | 0,041 | 0,156 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 81 | 73 | 70 | 68 | 66 | 3 |
| | 80 | 72 | 49 | 5 | 87 | 2 |

| | | | | | | |
|--|-----|----|-----|----|----|----|
| | 74 | 64 | 56 | 48 | 88 | 1 |
| | 69 | 7 | 55 | 39 | | 8 |
| | 59 | 57 | 107 | 43 | | 6 |
| | 60 | 45 | 103 | 41 | | 10 |
| | 52 | 27 | 116 | 13 | | 9 |
| | 53 | 28 | 118 | | | 44 |
| | 54 | 19 | 85 | | | 22 |
| | 117 | 16 | 86 | | | 21 |
| | 97 | 17 | 89 | | | 25 |
| | 100 | 14 | 90 | | | 20 |
| | 82 | | 93 | | | 15 |
| | | | | | | 18 |
| | | | | | | 11 |
| | | | | | | 12 |

EKC- 2. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların ITS barkod gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,274 | 0,244 | 0,000 | 0,141 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,413 | 0,124 | 0,000 | 0,143 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,040 | 0,017 | 0,009 | 0,005 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,002 |
| Between-classes | ##### | 0,023 | 0,031 | 0,036 | 0,036 | 0,037 | 0,037 | 0,038 | 0,038 | 0,038 | 0,038 |
| Total | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 |



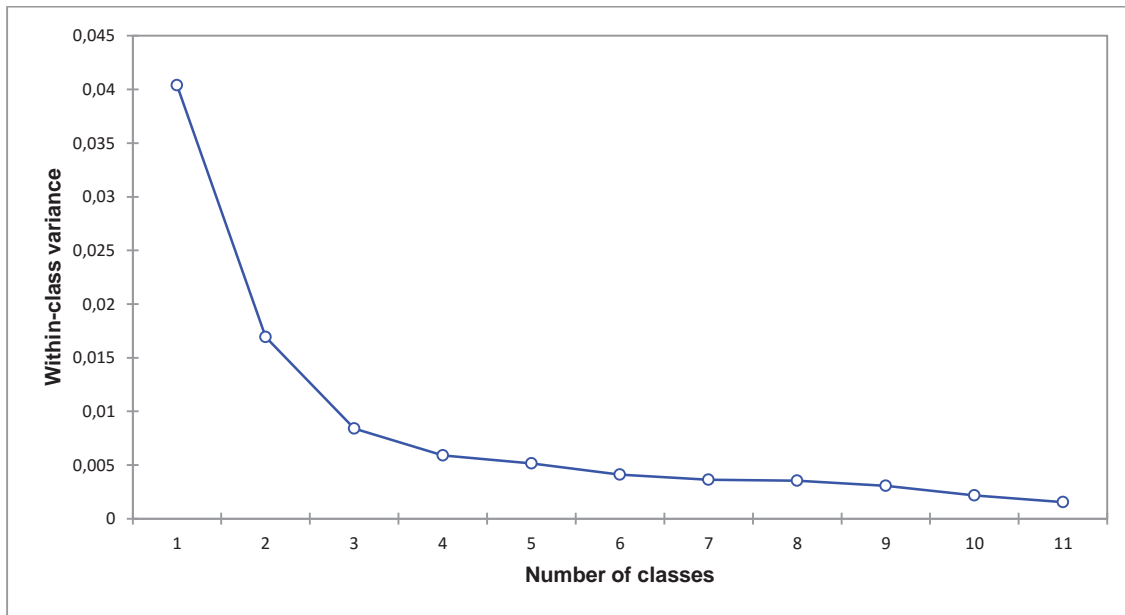
| Results by class: | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Objects | 36 | 13 | 8 | 4 | 3 |
| Sum of weights | 36 | 13 | 8 | 4 | 3 |
| Within-class variance | 0,001 | 0,005 | 0,008 | 0,018 | 0,006 |
| Minimum distance to centroid | 0,006 | 0,012 | 0,048 | 0,067 | 0,051 |
| Average distance to centroid | 0,022 | 0,058 | 0,082 | 0,113 | 0,060 |
| Maximum distance to centroid | 0,142 | 0,109 | 0,120 | 0,136 | 0,074 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 70 | 3 | 86 | 11 |
| | 81 | 66 | 2 | 16 | 13 |
| | 80 | 1 | 7 | 17 | 14 |
| | 73 | 8 | 6 | 18 | |
| | 72 | 5 | 10 | | |
| | 69 | 21 | 9 | | |
| | 68 | 27 | 22 | | |
| | 64 | 25 | 15 | | |
| | 59 | 39 | | | |
| | 60 | 28 | | | |
| | 52 | 19 | | | |
| | 53 | 20 | | | |
| | 48 | 12 | | | |
| | 49 | | | | |
| | 56 | | | | |
| | 57 | | | | |
| | 54 | | | | |
| | 55 | | | | |
| | 45 | | | | |
| | 44 | | | | |
| | 107 | | | | |

| | | | | | |
|--|-----|--|--|--|--|
| | 103 | | | | |
| | 117 | | | | |
| | 116 | | | | |
| | 43 | | | | |
| | 41 | | | | |
| | 118 | | | | |
| | 97 | | | | |
| | 100 | | | | |
| | 85 | | | | |
| | 87 | | | | |
| | 88 | | | | |
| | 89 | | | | |
| | 92 | | | | |
| | 93 | | | | |
| | 94 | | | | |

EKC- 3. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların LSU gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,350 | 0,477 | 0,000 | 0,120 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,199 | 0,348 | 0,000 | 0,162 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,040 | 0,017 | 0,008 | 0,006 | 0,005 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,003 | 0,002 | 0,002 |
| Between-classes | 0,000 | 0,023 | 0,032 | 0,035 | 0,035 | 0,036 | 0,037 | 0,037 | 0,037 | 0,038 | 0,039 |
| Total | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 |



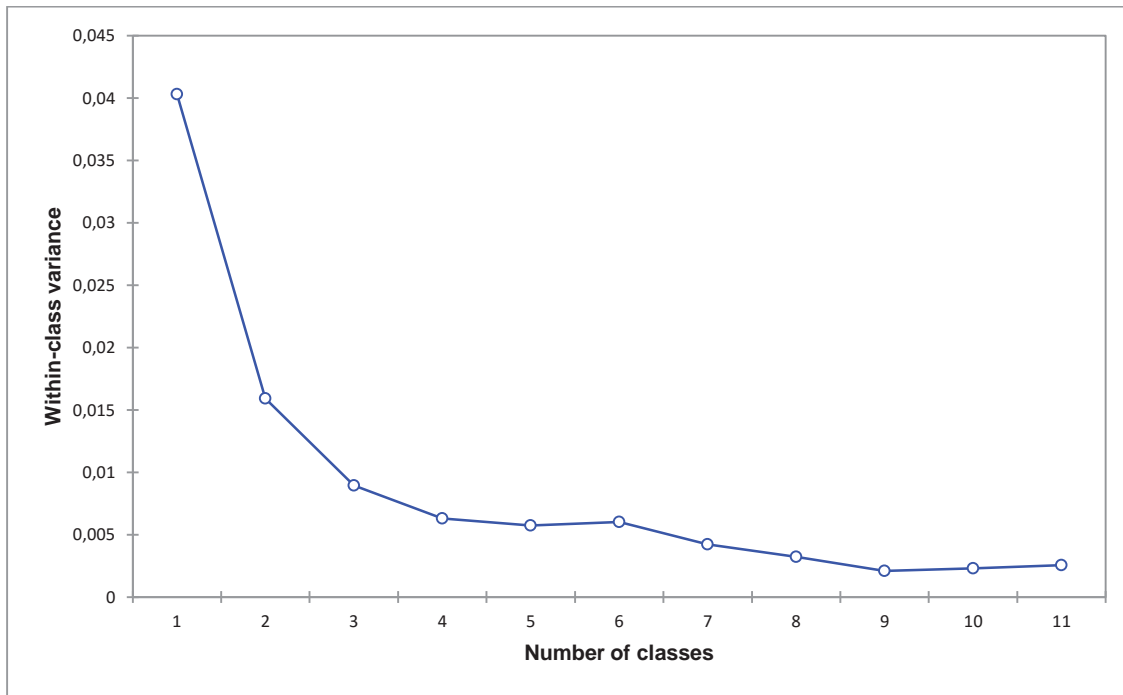
| Results by class: | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Objects | 36 | 12 | 11 | 4 | 1 |
| Sum of weights | 36 | 12 | 11 | 4 | 1 |
| Within-class variance | 0,001 | 0,009 | 0,009 | 0,023 | 0,000 |
| Minimum distance to centroid | 0,005 | 0,016 | 0,033 | 0,087 | 0,000 |
| Average distance to centroid | 0,022 | 0,066 | 0,082 | 0,128 | 0,000 |
| Maximum distance to centroid | 0,139 | 0,230 | 0,186 | 0,156 | 0,000 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 70 | 3 | 22 | 13 |
| | 81 | 66 | 2 | 86 | |
| | 80 | 1 | 7 | 17 | |
| | 73 | 8 | 6 | 18 | |
| | 72 | 5 | 10 | | |
| | 69 | 27 | 9 | | |
| | 68 | 25 | 21 | | |
| | 64 | 28 | 39 | | |
| | 59 | 19 | 15 | | |
| | 60 | 20 | 11 | | |
| | 52 | 16 | 14 | | |
| | 53 | 12 | | | |
| | 48 | | | | |
| | 49 | | | | |
| | 56 | | | | |
| | 57 | | | | |
| | 54 | | | | |
| | 55 | | | | |
| | 45 | | | | |
| | 44 | | | | |
| | 107 | | | | |

| | | | | | |
|--|-----|--|--|--|--|
| | 103 | | | | |
| | 117 | | | | |
| | 116 | | | | |
| | 43 | | | | |
| | 41 | | | | |
| | 118 | | | | |
| | 97 | | | | |
| | 100 | | | | |
| | 85 | | | | |
| | 87 | | | | |
| | 88 | | | | |
| | 89 | | | | |
| | 92 | | | | |
| | 93 | | | | |
| | 94 | | | | |

EKC- 4. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların ITS barkod gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,231 | 0,373 | 0,000 | 0,156 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,315 | 0,475 | 0,000 | 0,127 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,040 | 0,016 | 0,009 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,004 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,003 |
| Between-classes | 0,000 | 0,024 | 0,031 | 0,034 | 0,035 | 0,034 | 0,036 | 0,037 | 0,038 | 0,038 | 0,038 |
| Total | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 |



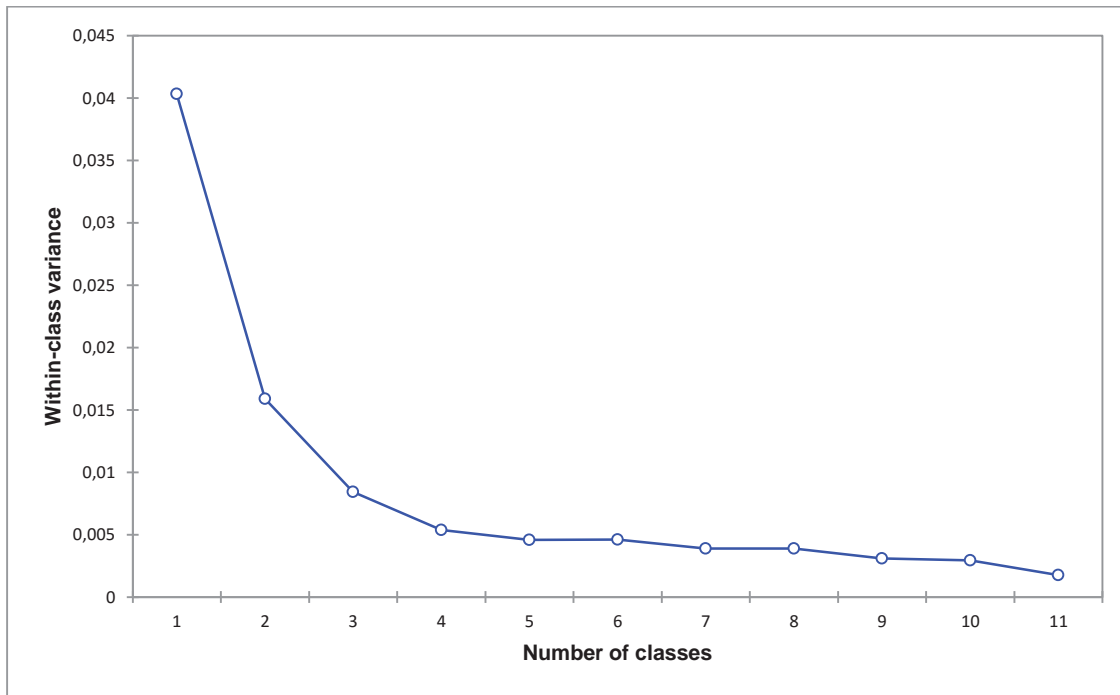
| Results by class: | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Objects | 36 | 3 | 12 | 7 | 2 | 2 | 2 |
| Sum of weights | 36 | 3 | 12 | 7 | 2 | 2 | 2 |
| Within-class variance | 0,001 | 0,026 | 0,006 | 0,006 | 0,014 | 0,002 | 0,019 |
| Minimum distance to centroid | 0,003 | 0,050 | 0,008 | 0,032 | 0,084 | 0,033 | 0,098 |
| Average distance to centroid | 0,021 | 0,121 | 0,061 | 0,068 | 0,084 | 0,033 | 0,098 |
| Maximum distance to centroid | 0,135 | 0,179 | 0,136 | 0,099 | 0,084 | 0,033 | 0,098 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 70 | 66 | 3 | 86 | 15 | 17 |
| | 81 | 19 | 2 | 9 | 16 | 12 | 18 |
| | 80 | 11 | 1 | 22 | | | |
| | 73 | | 8 | 21 | | | |
| | 72 | | 7 | 39 | | | |
| | 69 | | 6 | 13 | | | |
| | 68 | | 5 | 14 | | | |
| | 64 | | 10 | | | | |
| | 59 | | 27 | | | | |
| | 60 | | 25 | | | | |
| | 52 | | 28 | | | | |
| | 53 | | 20 | | | | |
| | 48 | | | | | | |
| | 49 | | | | | | |
| | 56 | | | | | | |
| | 57 | | | | | | |
| | 54 | | | | | | |
| | 55 | | | | | | |

| | | | | | | | |
|--|-----|--|--|--|--|--|--|
| | 45 | | | | | | |
| | 44 | | | | | | |
| | 107 | | | | | | |
| | 103 | | | | | | |
| | 117 | | | | | | |
| | 116 | | | | | | |
| | 43 | | | | | | |
| | 41 | | | | | | |
| | 118 | | | | | | |
| | 97 | | | | | | |
| | 100 | | | | | | |
| | 85 | | | | | | |
| | 87 | | | | | | |
| | 88 | | | | | | |
| | 89 | | | | | | |
| | 92 | | | | | | |
| | 93 | | | | | | |
| | 94 | | | | | | |

EKC- 5. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların RPB2 gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,269 | 0,469 | 0,000 | 0,117 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,171 | 0,368 | 0,000 | 0,163 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,040 | 0,016 | 0,008 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,004 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,002 |
| Between-classes | 0,000 | 0,024 | 0,032 | 0,035 | 0,036 | 0,036 | 0,036 | 0,036 | 0,037 | 0,037 | 0,039 |
| Total | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 |



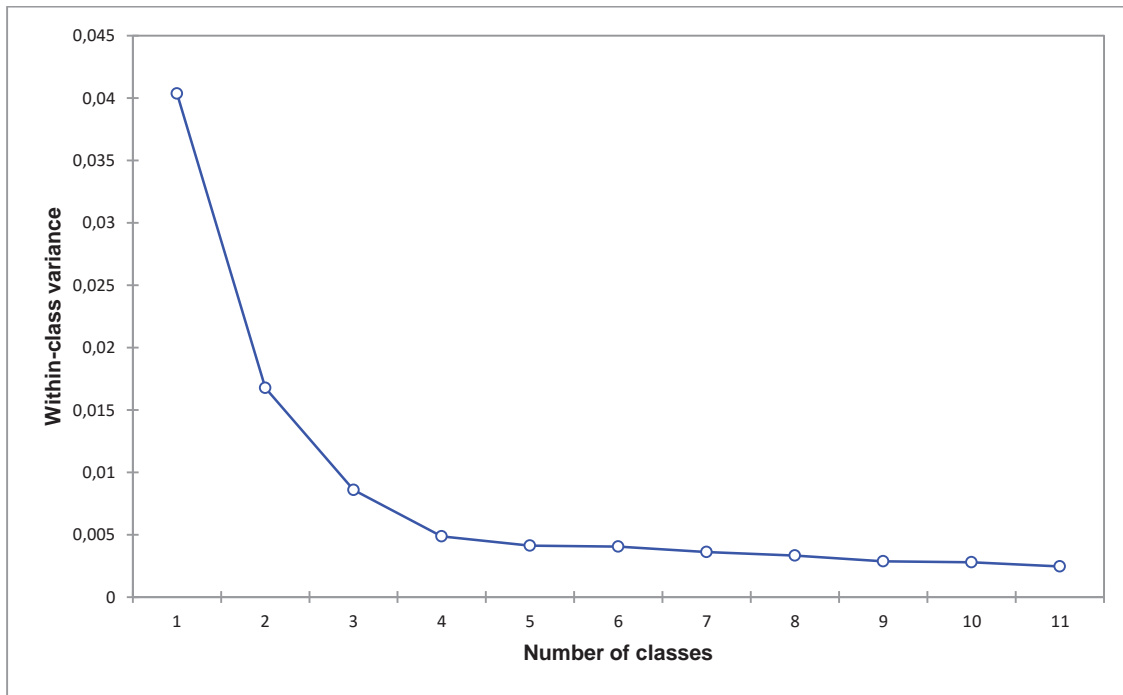
| Results by class: | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Objects | 36 | 14 | 9 | 2 | 3 |
| Sum of weights | 36 | 14 | 9 | 2 | 3 |
| Within-class variance | 0,001 | 0,009 | 0,008 | 0,022 | 0,012 |
| Minimum distance to centroid | 0,004 | 0,005 | 0,022 | 0,105 | 0,038 |
| Average distance to centroid | 0,022 | 0,068 | 0,074 | 0,105 | 0,085 |
| Maximum distance to centroid | 0,143 | 0,224 | 0,127 | 0,105 | 0,115 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 70 | 3 | 86 | 11 |
| | 81 | 66 | 2 | 18 | 13 |
| | 80 | 1 | 6 | | 14 |
| | 73 | 8 | 9 | | |
| | 72 | 7 | 22 | | |
| | 69 | 5 | 21 | | |
| | 68 | 10 | 39 | | |
| | 64 | 27 | 15 | | |
| | 59 | 25 | 17 | | |
| | 60 | 28 | | | |
| | 52 | 19 | | | |
| | 53 | 20 | | | |
| | 48 | 16 | | | |
| | 49 | 12 | | | |
| | 56 | | | | |
| | 57 | | | | |
| | 54 | | | | |
| | 55 | | | | |
| | 45 | | | | |

| | | | | | |
|--|-----|--|--|--|--|
| | 44 | | | | |
| | 107 | | | | |
| | 103 | | | | |
| | 117 | | | | |
| | 116 | | | | |
| | 43 | | | | |
| | 41 | | | | |
| | 118 | | | | |
| | 97 | | | | |
| | 100 | | | | |
| | 85 | | | | |
| | 87 | | | | |
| | 88 | | | | |
| | 89 | | | | |
| | 92 | | | | |
| | 93 | | | | |
| | 94 | | | | |

EKC- 6. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların RPB2 gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,393 | 0,141 | 0,000 | 0,146 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,321 | 0,276 | 0,000 | 0,138 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,040 | 0,017 | 0,009 | 0,005 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,002 |
| Between-classes | 0,000 | 0,024 | 0,032 | 0,036 | 0,036 | 0,036 | 0,037 | 0,037 | 0,038 | 0,038 | 0,038 |
| Total | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 | 0,040 |



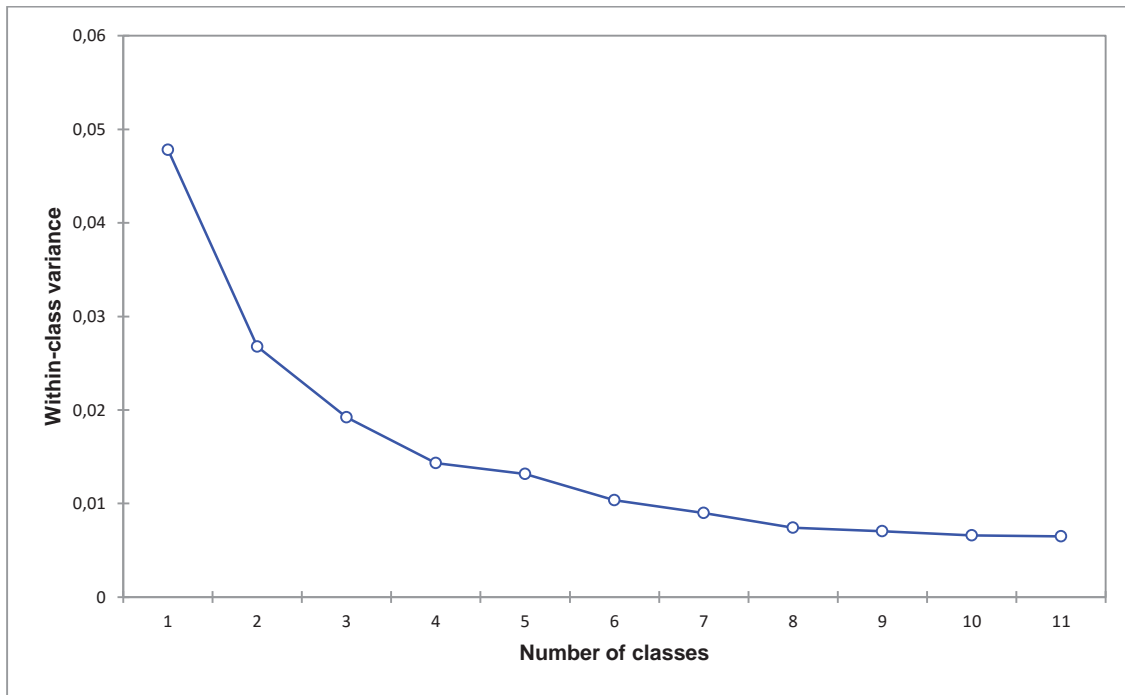
| Results by class: | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Objects | 36 | 11 | 11 | 3 | 3 |
| Sum of weights | 36 | 11 | 11 | 3 | 3 |
| Within-class variance | 0,001 | 0,005 | 0,008 | 0,017 | 0,012 |
| Minimum distance to centroid | 0,004 | 0,017 | 0,007 | 0,097 | 0,032 |
| Average distance to centroid | 0,022 | 0,056 | 0,075 | 0,106 | 0,083 |
| Maximum distance to centroid | 0,139 | 0,148 | 0,166 | 0,114 | 0,124 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 70 | 3 | 86 | 11 |
| | 81 | 66 | 2 | 16 | 13 |
| | 80 | 1 | 7 | 18 | 14 |
| | 73 | 8 | 6 | | |
| | 72 | 5 | 10 | | |
| | 69 | 27 | 9 | | |
| | 68 | 25 | 22 | | |
| | 64 | 28 | 21 | | |
| | 59 | 19 | 39 | | |
| | 60 | 20 | 15 | | |
| | 52 | 17 | 12 | | |
| | 53 | | | | |
| | 48 | | | | |
| | 49 | | | | |
| | 56 | | | | |
| | 57 | | | | |
| | 54 | | | | |
| | 55 | | | | |
| | 45 | | | | |

| | | | | | |
|--|-----|--|--|--|--|
| | 44 | | | | |
| | 107 | | | | |
| | 103 | | | | |
| | 117 | | | | |
| | 116 | | | | |
| | 43 | | | | |
| | 41 | | | | |
| | 118 | | | | |
| | 97 | | | | |
| | 100 | | | | |
| | 85 | | | | |
| | 87 | | | | |
| | 88 | | | | |
| | 89 | | | | |
| | 92 | | | | |
| | 93 | | | | |
| | 94 | | | | |

EKC- 7. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon kaynak ve zamanlarına göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,304 | 0,260 | 0,000 | 0,165 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,324 | 0,359 | 0,000 | 0,144 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,048 | 0,027 | 0,019 | 0,014 | 0,013 | 0,010 | 0,009 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,006 |
| Between-classes | 0,000 | 0,021 | 0,029 | 0,033 | 0,035 | 0,037 | 0,039 | 0,040 | 0,041 | 0,041 | 0,041 |
| Total | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 | 0,048 |

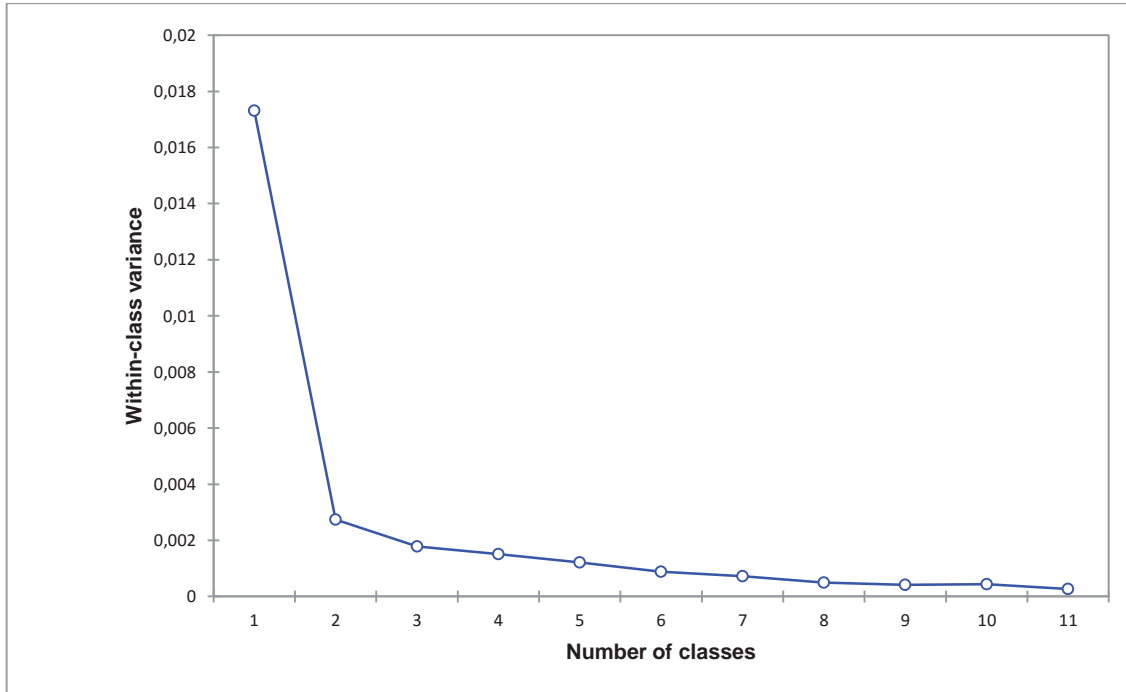


| Results by class: | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Objects | 7 | 13 | 9 | 15 | 5 | 8 | 7 |
| Sum of weights | 7 | 13 | 9 | 15 | 5 | 8 | 7 |
| Within-class variance | 0,007 | 0,013 | 0,010 | 0,004 | 0,007 | 0,017 | 0,004 |
| Minimum distance to centroid | 0,036 | 0,058 | 0,014 | 0,013 | 0,017 | 0,007 | 0,028 |
| Average distance to centroid | 0,074 | 0,106 | 0,083 | 0,058 | 0,068 | 0,107 | 0,056 |
| Maximum distance to centroid | 0,134 | 0,167 | 0,143 | 0,101 | 0,120 | 0,190 | 0,087 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 81 | 80 | 73 | 72 | 68 | 7 | 56 |
| | 70 | 74 | 66 | 3 | 20 | 5 | 55 |
| | 49 | 69 | 64 | 2 | 18 | 48 | 103 |
| | 107 | 59 | 57 | 1 | 11 | 44 | 85 |
| | 116 | 60 | 45 | 8 | 12 | 27 | 86 |
| | 118 | 52 | 39 | 6 | | 41 | 89 |
| | 93 | 53 | 28 | 10 | | 15 | 90 |
| | | 54 | 87 | 9 | | 13 | |
| | | 117 | 88 | 22 | | | |
| | | 43 | | 21 | | | |
| | | 97 | | 25 | | | |
| | | 100 | | 19 | | | |
| | | 82 | | 16 | | | |
| | | | | 17 | | | |
| | | | | 14 | | | |

EKC- 8. *S. cerevisiae* olarak tanımlanan izolasyonların birleştirilmiş (ITS_LSU_RPB2) gen bölgesi sekanslarının filogenetik ilişkilerinin izolasyon zamanlarına ve zamana göre XLSAT (k-means clustering) ile istatistiksel grup dağılımları

| Summary statistics: | | | | | | | |
|---------------------|--------------|------------------------|---------------------------|---------|---------|-------|----------------|
| Variable | Observations | Obs. with missing data | Obs. without missing data | Minimum | Maximum | Mean | Std. deviation |
| Y1 | 64 | 0 | 64 | -0,177 | 0,099 | 0,000 | 0,076 |
| Y2 | 64 | 0 | 64 | -0,195 | 0,165 | 0,000 | 0,107 |

| Evolution of variances: | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Variance\Classes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Within-class | 0,017 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Between-classes | 0,000 | 0,015 | 0,016 | 0,016 | 0,016 | 0,016 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 |
| Total | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 |



| Results by class: | | | |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Class | 1 | 2 | 3 |
| Objects | 37 | 25 | 2 |
| Sum of weights | 37 | 25 | 2 |
| Within-class variance | 0,002 | 0,002 | 0,010 |
| Minimum distance to centroid | 0,003 | 0,006 | 0,069 |
| Average distance to centroid | 0,024 | 0,036 | 0,069 |
| Maximum distance to centroid | 0,105 | 0,094 | 0,069 |
| | Izolation Source ID | Izolation Source ID | Izolation Source ID |
| | 82 | 66 | 86 |
| | 81 | 3 | 93 |
| | 80 | 2 | |
| | 73 | 1 | |

| | | | |
|--|-----|----|--|
| | 72 | 8 | |
| | 70 | 7 | |
| | 69 | 6 | |
| | 68 | 5 | |
| | 64 | 10 | |
| | 59 | 9 | |
| | 60 | 22 | |
| | 52 | 21 | |
| | 53 | 27 | |
| | 48 | 25 | |
| | 49 | 28 | |
| | 56 | 19 | |
| | 57 | 20 | |
| | 54 | 15 | |
| | 55 | 16 | |
| | 45 | 17 | |
| | 44 | 18 | |
| | 107 | 11 | |
| | 103 | 12 | |
| | 117 | 13 | |
| | 116 | 14 | |
| | 39 | | |
| | 43 | | |
| | 41 | | |
| | 118 | | |
| | 97 | | |
| | 100 | | |
| | 85 | | |
| | 87 | | |
| | 88 | | |
| | 89 | | |
| | 92 | | |
| | 94 | | |



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

~~YÜKSEK LİSANS~~/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 20/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: "Saccharomyces cerevisiae DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması"

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 221 sayfalık kısmına ilişkin, 12/06/2019 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dahil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

28.06.2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Mithat KURBAN
Öğrenci No: N13148155
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Doktora
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Remziye YILMAZ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Mithat KURBAN
Doğum Yeri : Pertek/TUNCELİ
Doğum Yılı : 1987
Medeni Hali : Bekar
E-posta : mithatkurban@gmail.com

Eğitim:

Lisans :Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü / 2005-2009
Yüksek Lisans:Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı / 2009-2013
Doktora:Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı / 2013- devam ediyor

Akademik Ünvanlar

Araştırma Görevlisi : Gıda Mühendisliği / Ege Üniversitesi / İZMİR / 2009-2013
Araştırma Görevlisi : Gıda Mühendisliği / Hacettepe Üniversitesi / ANKARA / 2013- devam ediyor

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : Araştırma Görevlisi

Projeler : *Saccharomyces cerevisiae* DNA barkodunun Elde Edilmesi / Hacettepe Üniversitesi BAP Hızlı Destek Projesi/ FHD-2017-14645/ Araştırmacı, (Tamamlandı)

Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

TMMOB Gıda Mühendisleri Odası