



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORTA VE DOĞU KARADENİZ KIYI ŞERİDİNDEN İZOLE
EDİLEN BAZI ALG TÜRLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU**

ATILA HAŞİMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

ORDU 2018

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ORTA VE DOĞU KARADENİZ KIYI ŞERİDİNDEN İZOLE EDİLEN
BAZI ALG TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
KARAKTERİZASYONU

ATILA HAŞİMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2018

TEZ ONAY

Atila HAŞİMOĞLU tarafından hazırlanan “ORTA VE DOĞU KARADENİZ KIYI ŞERİDİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI ALG TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.06.2018 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

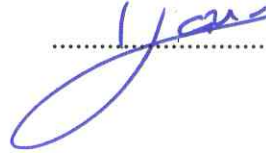
Jüri Üyeleri

Danışman
Dr.Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI

Üye
Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
19 Mayıs Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ
Ordu Üniversitesi

İmza



12./07/2018 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12 / 07 / 2018 tarih ve 218... / 342... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



ATILA HAŞİMOĞLU

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZET

ORTA VE DOĞU KARADENİZ KIYI ŞERİDİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI ALG TÜRLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU

Atila HAŞİMOĞLU

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ 55 S

(TEZ DANIŞMANI: Dr. Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI)

Bu çalışmada Türkiyenin Orta ve Doğu Karadeniz kıyılarında elde edilen 8 alg izolatının teşhisi amaçlanmıştır. Mikroskopik incelemeler tüm izolatların *Chlorophyceae* divisiosuna ait olduklarını ortaya koymuştur. Tür teşhisleri filogenetik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan markörlerden birisi olan 18S rDNA'nın nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizler kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik analizler AT-2 izolatının *Chlorella vulgaris* ile AT-5, AT-6 and AT-7 izolatlarının *Coccomyxa parasitica*, AT-8 izolatının *Stichococcus deasonii* ve AT-9, AT-11 izolatlarının *Nannochloropsis oceanica* türleri ile ilişkili olduklarını ortaya koymuştur. Diğer taraftan AT-10 izolatı *Tetraselmis convolutae*-*T. striata* soyhattı ile ilişkili çıkmıştır. *C. vulgaris* dışındaki bütün bu türler Türkiye için ilk kayıttır. Ek olarak *C. vulgaris* izolatımız bu türün Türkiyedeki denizel çevreden ilk kayıttır.

Anahtar Kelimeler: *Chlorophyta*, Filogeni, Karadeniz, 18S rDNA,

ABSTRACT

IDENTIFICATION WITH MOLECULAR TECHNIQUES OF SOME ALGAE SPECIES ISOLATED FROM THE COASTS OF MIDDLE AND EASTERN PART OF THE BLACK SEA

Atila HAŞİMOĞLU

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

FISHERIES TECHNOLOGY ENGINEERING

MSC THESIS, 55p

(SUPERVISOR: Assist. Prof. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI

In this study, we aimed to identify 8 algae isolates collected from Middle and East coasts of the Blacksea in Turkey. Microscopic observations revealed that all isolates are belonging to the *Chlorophyceae* divisio. Species identifications of the isolates were performed using molecular phylogenetic methods depending on the nucleotide sequences of 18S rDNA, which is one of the most common markers used in phylogenetic studies. Phylogenetic analyses revealed that isolate AT-2 is related to *Chlorella vulgaris*, where isolates AT-5, AT-6 and AT-7 to *Coccomyxa parasitica*, AT-8 to *Stichococcus deasonii* and AT-9, AT-11 to *Nannochloropsis oceanica* species. On the other hand AT-10 appeared as related to *Tetraselmis convolutae*-*T. striata* lineage. All of these species except *C. vulgaris* are first records for Turkey. Additionally our *C. vulgaris* isolate is the first record of this species from Marine environment in Turkey.

Keywords: Blacksea, *Chlorophyta*, 18S rDNA, Phylogeny

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince uzmanlığı ve tavsiyeleriyle çalışmaya yön veren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cem Tolga GÜRKANLI'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın moleküler analizlerine özveriyle destek veren Sayın Dr. Nihal ÇALIŞKAN'a sonsuz minnettarlığımı sunmak isterim. Aynı şekilde Sayın Dr. Mustafa TÜRE'ye, sekans analizlerini gerçekleştiren Sayın Uzman Kimyager İlyas KUTLU'ya da çok teşekkür ederim. Ayrıca hem bu akademik süreçte hem de diğer zamanlarda bilgi ve tecrübesiyle desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ'ye şükranlarımı sunarım.

Bu zorlu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen değerli eşim Sayın Hülya HAŞİMOĞLU'na ve canım kızım Sayın Bahar HAŞİMOĞLU ile canım oğlum Sayın Barış HAŞİMOĞLU'na sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
EKLER LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1 Materyal.....	12
3.1.1 Çalışma Alanının Yeri.....	12
3.2 Yöntem.....	12
3.2.1 Alginin Çoğaltılması, İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	13
3.2.2 Morfolojik İnceleme.....	14
3.2.3 Moleküler Analizler.....	15
3.2.3.1 Toplam DNA İzolasyonu.....	15
3.2.3.2 18S rDNA Bölgesinin Çoğaltılması (Amplifikasyonu).....	17
3.2.3.3 PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi.....	20
3.2.3.4 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	21
3.2.3.5 PZR Ürünlerinin Sekansı.....	22
3.2.3.6 DNA Dizilerinin İşlenmesi.....	22
3.2.3.7 Sekans Profilinin Çıkartılması.....	23
3.2.3.8 Filogenetik Analizler.....	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
6. KAYNAKLAR	41
EKLER	50
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1** Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde örnekleme yapılan lokasyonlar 12
- Şekil 3.2** Steril kabin içerisinde öze ile ekim (a), ekimi yapılan alg kültürlerinin laboratuvar ortamında gelişimi (b) 13
- Şekil 3.3** DNA'yı içeren sulu tampon..... 15
- Şekil 3.4** Çoğaltılan 18S rRNA gen bölgesinin şematik gösterimi A) Çeşitli 18S rDNA bölgesinin tamamı, çeşitli primerler çifti kullanılarak nispeten kısa alt fragmanlara bölünür. NS, nükleer küçük-altbirim rDNA; NS'yi takip eden küçük harfler, ilgili alt parçaları gösterir. (B) 18S rRNA geninin yeri. NTS, transkripsiyona tabi olmayan spacer; ITSa, küçük-altbirim genleri ile bağlantılı olan ITS kısmı 17
- Şekil 3.5** PZR işleminin gerçekleştirildiği termal cyclus 19
- Şekil 3.6** Jel görüntüleme ünitesi ve Elektroforez cihazı..... 21
- Şekil 4.1** İzole edilen *Chlorella vulgaris* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a)10x40 büyütme,(b)10x100büyütme)24
- Şekil 4.2** 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç TrN+I+G (I: 0.479; G: 0.521) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Oocystis marssonii* türü ile köklendirilmiştir 26
- Şekil 4.3** İzole edilen *Coccomyxa parasitica* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a) 10x40 büyütme, (b)10x100 büyütme 28
- Şekil 4.4** İzole edilen *Stichococcus deasonii* izolatına ait mikroskop görüntüsü (10x100 büyütme) 29
- Şekil 4.5** 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç TrNef +G (G: 0.016) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Chlorella vulgaris* türü ile köklendirilmiştir.....31
- Şekil 4.6** İzole edilen *Nannochloropsis oceanica* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a) 10x40 büyütme, (b) 10x100 büyütme 32
- Şekil 4.7** rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç K80 evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Nannochloropsis salina* ve *N. gaditana* türleri ile köklendirilmiştir 34
- Şekil 4.8** İzole edilen *Tetraselmis* sp. izolatına ait mikroskop görüntüsü 10x40 büyütme. (a, b)..... 36
- Şekil 4.9** T18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç HKY+I+G (I: 0.704; G: 0.571) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, MP, ML analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Chlorella vulgaris* türü ile köklendirilmiştir 38

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	DNA elde etme protokolü.....	16
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan DNA segmenti ve primer sekansları.....	18
Çizelge 3.3	18S rDNA bölgesinin çoğaltılması için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları	18
Çizelge 3.4	Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PZR programları	19
Çizelge 3.5	PZR ürünün saflaştırılması işleminin şematik gösterimi (INVITROGEN PureLink™PZR Saflaştırma Kiti (Cat.No.K310001) ürün protokolünden alınmıştır.)	22
Çizelge 4.1	İzolatlara ait lokasyonlar ve örneklenme tarihleri	24
Çizelge 4.2	Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler	25
Çizelge 4.3.	Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler	30
Çizelge 4.4	Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler	33
Çizelge 4.5	Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler	36

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

DDS	: Doğal deniz suyu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FASTA	Metin tabanlı nükleotit dizi formatı
KBY	: Kati besi yeri
g	: Gram
mf	: Membrane filitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm³	: Milimetre küp
NCBI	: GenBank(Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
NFW	: Nükleazsız su
NJ	: Neighbour Joining
pH	: Asit ve baz durumunu ifade eder
Pi	: Nükleotit çeşitliliği
pmol	: Pikomol
rpm	: Devir/dakika
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik asit
TBE	: Tris, EDTA
TE	: Tris, Borik Asit, EDTA
TEN	: Tris, EDTA, NAACL
µl	: Mikrolitre

EKLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
EK 1: Walne Besin Ortamının Hazırlanma Protokolü	51
EK 2: Katı Besi Yeri (Agarplate) Hazırlanma Prosedürü	52
EK 3: Sıvı Besi Yeri Hazırlama Prosedürü	53

1. GİRİŞ

Plankton kavramı ilk kez Hensen tarafından ortaya atıldığında denizlerde pasif olarak yüzen tüm cisimleri ifade etmekteydi. Kavram zaman içerisinde sınırlandırılmış ve ‘Hareket organelleri olsa bile bu organelleri yer değiştirmelerinde etkin olmayan ve dolayısıyla denizlerdeki su hareketlerinin etkisinde pasif olarak yer değiştirebilen bitkisel ve hayvansal organizmaların oluşturduğu topluluk şekline’ dönüşmüştür (Geldiay ve Kocataş, 1998). Planktonik organizmalar bitkisel (fitoplankton) ve hayvansal (zooplankton) olmak üzere biyolojik olarak iki gruba ayrılırlar. Bu iki ana gruptan biri olan fitoplanktonik organizmalar sucul ekosistemlerin vazgeçilmez bir unsurudur ve bitkiler tarafından üretilen oksijenin %50’den fazlasının kaynağıdır. Ayrıca, besin zincirinin ilk basamağını oluşturması itibarı ile çoğu deniz canlıları için temel besin kaynağıdır (Anonim, 2017). Kara bitkilerinin fitoplanktonik organizmalardan (yeşil algler) evrimi neticesinde yerküre üzerinde canlılığın oluşmasında kilit rol oynayan algler bu sayede tüm karasal ekosistemin gelişimini başlatmış ve Dünya ekosistemi üzerinde çarpıcı değişimlere sebep olmuştur (Kenrick ve Crane, 1997). Bolluk bakımından mikroalgler diatomlar (*Bacillariophyceae*), Altın algler (*Chrysophyceae*) ve Yeşil algler (*Chlorophyceae*) olarak üç önemli sınıfa ayrılırken, yapısal olarak ise ökaryotik ve prokaryotik algler olarak ikiye ayrılmıştır. Prokaryotik algler *Cyanophyceae* içerisinde, ökaryotik algler ise chlorophyta, euglenophyta, chrysophyta, pyrrophyta, rhodophyta, phaeophyta içerisinde sınıflandırılırken, Mavi-yeşil algler (*Cyanophyceae*)’de mikro alg olarak refere edilmektedir. Tek hücreli olan ve hücre büyüklükleri birkaç mikrondan birkaç yüz mikron arasında değişen mikroalgler, morfolojik olarak bir hücreli ve kolonial formda, iplik ve şerit şeklinde, yaprak ve ağaçımsı şekiller gibi dış görünüşleri büyük farklılıklar gösterebilmekte birlikte, yaygın olarak deniz ve tatlı sularda bulunmaktadır. Mikroalglerin varolan tür sayısının ise 2×10^5 ile 8×10^5 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Cirik ve Gökpinar, 1993; Norton, 1996; Cardazo, 2007; Versihin ve ark., 2008). Alglerin Morfolojik çeşitlilikleri bilinen en küçük serbest yaşayan ökaryot *Ostreococcus tauri*’den başlar ve çok hücreli formlara kadar devam eder. Algler, hem sucul hem de bazı karasal habitatlarda var olup dünya ekosistemi üzerinde yüzlerce milyon yıldan beri hayati rol oynamaktadırlar. Birleştirici bir çok özelliklerine rağmen yeşil algler, morfolojik ve ekolojik olarak evrimsel çeşitliliğini

yansıtan çok önemli varyasyonlar sergilemektedirler. Bununla birlikte, yeşil algler birçoğu kara bitkilerinde de belirgin olan çok sayıda özellikleriyle karakterize edilmektedir (Graham, 2009). Yeşil algler özellikle tatlı sularda bol ve çeşitli olup iki alg grubu denizel ortamda çok iyi şekilde temsil edilmektedir (John, 2002). Yeşil alglerin yaygın bir grubu *olan* chlorophyta üyeleri de hem tatlı su ve karasal ekosistemlerde hem de çeşitli deniz habitatlarında bulunmaktadır (Leliaert ve ark., 2012).

Karadeniz, Dünya'nın en büyük kapalı iç denizidir. Diğer denizlerle olan bağlantısını İstanbul boğazı gibi dar bir koridor vasıtasıyla sağlar. Kuzeye doğru ise, Kerch boğazı yoluyla Azak denizi ile birleşir. Karadeniz'in yüzey alanı 423.000 km² olup en derin yeri 2212 m'dir. Karadenizin kimyasal kompozisyonu incelendiğinde yüzey tabakasında yüksek oksijen seviyesi olmasına rağmen bu tabakanın hemen altında oksijen seviyesi hızla azalmaktadır ve genel olarak Karadeniz'in % 87'si anoksik olarak kabul edilmektedir. Karadeniz'in dip kısımları yüksek oranda hidrojen sülfür (H₂S) içerir. Bu tabakanın başlangıç sınırı, farklı derinliklerde birbirinden farklılık göstermesine karşın, aynı su yoğunluğunda başlamaktadır. Karadeniz besin içeriği açısından heterojen bir yapıya sahip olup kıyusal suları ve kıta sahanlığının büyük bölümü ötrofik yapıda orta kısmı ise mesotrofik (orta düzeyde besin seviyesi), buna karşın kalın büyük bir kısmı ise hipertrofik (Besin seviyesi yüksek). Çevresindeki ülkelerden Karadeniz'e çok sayıda nehir girdisi olmaktadır (Ataç, 1997; Petronu, 1999; Anonim 2001; Yılmaz, 2002). Ötrofikasyonun ana nedeni nehirlerle denize taşınan besinlerdeki artıştır. Bu besin artışı sonucu ortamdaki fitoplankton türlerinin sayısında bir stres belirtisi olarak bir azalma ve taksonomik gruplar arasında oransal farklılaşmalar meydana gelmekte, özellikle mikroflagellatlar ve kokkoid formları içine alan pico ve nannoplankton türleri, diyatom grubuna ait türlerin aleyhine hızla çoğalarak, ortamda kalitatif ve kantitatif yapı bakımından üstünlük sağlamaktadır (Türkoğlu, 1999). Ortamda meydana gelen ötrofikasyon durumunu değerlendirebilmek için besinsel zincirin temeli olan fitoplanktonik organizmalar en iyi indikatörler arasındadır. Sucul ortamdaki besin miktarının artmasıyla (ötrofikasyon) fitoplankton tür kompozisyonlarının, miktarı, zamanı ve süresi değişmektedir. Karadeniz de yaşanan alg patlamaları çoğunlukla ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde meydana gelmektedir (Alexandrov ve Zaitsev, 1998;

Nesterova ve ark., 2008). Karadeniz'de yapılan taksonomik çalışmalarda, 7 sınıfa dâhil 185 cins ve 756 alg türü tespit edilmiştir ve bunların büyük bir kısmını (> % 80) diatomlar oluşturmaktadır. Bununla beraber Karadeniz'in kıyısal alanlarında özellikle nehir girişlerinin olduğu lokalitelerde tatlı su türleride sıklıkla tespit edilmektedir (Ataç, 1997; Baytut, 2010).

Geleneksel olarak ışık mikroskobu ile yapılan alg teşhisleri zamanla sıradanlaşırken bazı sınırlanmalara da sebep olmaktadır. Mikroskopla yapılan incelemerde yaşam döngüsü nedeniyle ilk bakışta göze çarpmayan taksonlar veya morfolojik varyasyonlar arasında farklılıkları ayırt edebilmek için uzman taksonomistlere ihtiyaç duyulmaktadır (Rowan ve Powes, 1991). Bu uygulamaların karakteristik morfolojik özelliklerinin tanımlamalarında yetersiz kalmasından dolayı küresel yeşil algler gibi morfolojileri birbirine çok yakın olan mikro organizmaların daha yüksek taksonomik seviyelerde sınıflandırılabilmesi için ekstra verilere gereksinim duyulmaktadır (Krienitz ve Bock, 2012). Dolayısıyla, bu gruplarda belirtilen birçok taksonun sistematik olarak doğal olmadığı ve morfolojik özellikleri bütünüyle filogenetik pozisyonlarını ifade etmekte yetersiz kalmaktadır (Krienitz ve Bock, 2012). Son yıllarda yaygınlaşan moleküler genetik metotlar kullanılarak bu gibi olumsuzlukların birçoğunun önüne geçilebilmesine olanak sağlamakta, özellikle çok yakın ilişkili olan ve farklılaşan organizmaların morfolojik karşılaştırmasını da sağlamaktadır. Bununla birlikte, nadir türlerin ya da kültürü yapılmayan türlerin nitelendirilmesi açısından da moleküler genetik metotlar çok uygundur (Forney, 2004; Dorigo, 2005; Tringe, 2008).

Moleküler genetik çalışmalarda ribozomun küçük alt birimi kodlayan gen, arke ve bakteriler için 16S ve ökaryotlar için 18S en yaygın olarak kullanılan markörlerdir. Bununla beraber, ribozomun büyük alt birimi kodlayan 23S (bakteri ve arkeae için) ve 28S (ökaryotlar için) rDNA gen bölgeleride mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin kurulması için kullanılmaktadır (Pereira, 2009). Bu konuda yapılan genetik araştırmaların artmasıyla moleküler filogeninin yakın akrabalık dereceleri olan türlerin sınıflandırılmasında gerekli bir işlem olduğu da giderek artan oranda kabul görmektedir. Artık günümüzde mikrobiyal populasyonun çeşitliliği ve yapısını ortaya konulmasında ribozomal RNA (rRNA) genlerin nükleotid dizisi mikrobiyal ekoloji alanında da standart bir uygulama haline gelmiştir. (Komarek ve

ark., 2014). Bu alışmada Orta ve Doğu karadeniz sahillerinden izole edilen bazı mikroalg türlerinin 18S rDNA gen bölgesinin nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizleri ile karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Karadeniz de alg çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik gerek ülkemizde gerekse Karadeniz'e kıyısı bulunan diğer ülkelerde yapılmış çok sayıda kapsamlı çalışmalar mevcuttur.

Sorokin, (1983) çalışmasında Karadeniz'de ilkbahar mevsiminde diyatome ve sonbahar mevsiminde de kokkolitoforlar tarafından oluşturulan iki birincil üretimin olduğunu, zaman zaman kıyısız bölgede kokkolitoforlar ve dinoflagellatlar tarafından oluşturulan aşırı alg üremeleri gözlemlendiğini belirtmiştir.

Uysal, (1987) plankton kompozisyonu ile ilgili İstanbul Boğazı çevresinde yaptığı çalışmada, bölgelere göre tür kompozisyonunun farklılık gösterdiğini, en fazla alg türünün Marmara Denizi ve İstanbul Boğazında tespit edildiğini, belirlenen sentrik diyatomelerin toplam diyatome yoğunluğuna katkısının ilkbahar ve yaz mevsimlerinde en çok, kış mevsiminde ise en az olduğunu rapor etmiştir.

Feyzioğlu, (1990) Karadenizin Güney'inde Mart 1989 ile Şubat 1990 tarihleri arasında gerçekleştirdiği çalışmada, Karadeniz de fitoplankton yoğunluğunun yaz aylarında en yüksek seviyelere ulaştığını, kış aylarında ise en düşük seviyeye indiğini, ilkbahara doğru ise bir artış (peak) gösterdiğini kaydetmiştir.

Karaçam ve Düzgüneş, (1990) 1987-1988 yıllarında Trabzon kıyılarında yürüttükleri çalışmada, *Rhizosolenia* ve *Ceratium* cinslerine ait türlerin tüm yıl boyunca dominant olduğunu ve fitoplankton bolluğunun Aralık ayında en düşük, Mayıs ve Ekim aylarında ise en yüksek seviyede olduğunu rapor etmiştir.

Zaitsev, (1992) Karadeniz de geçmiş 20-40 yıllık süreç içerisinde meydana gelen temel ekolojik değişimleri ve olası nedenlerini ele aldığı çalışmada, insan faaliyetlerinden dolayı sucul ortamdaki besin artışın ötrofikasyona sebep olduğunu belirterek, bu durumun fitoplankton patlamalarına ve ortamdaki alg tür kompozisyonlarını etkileyerek küçük boyutlu ve jelatinimsi zooplanktonik organizmaların daha yaygınlaşmasına sebep olduğunu, buna karşın herbivor kopepod miktarının ise azalmasına ya da yok olmasına sebep olabileceğini ifade etmiştir.

Bologa, (1995) Karadeniz de yaptığı çalışmasında, insan kaynaklı sebeplerle artan besin girdisinin, özellikle Kuzeybatı Karadeniz olmak üzere son 30 yıldır Karadeniz kıyı ekosisteminin çeşitliliğini önemli ölçüde etkilediğini ifade etmiştir. Bu durumun bentik ve planktonik toplulukların kalitatif ve kantitatif özelliklerini değiştirdiğini, özellikle kıyusal ekosistemin yapısında çarpıcı sonuçların ortaya çıktığını, bölgede görülen fitoplankton patlamalarının artışına neden olduğunu, bunun sonucu olarak da diatomlar dışındaki fitoplanktonik organizmaların sayısal yoğunluğunun hızlı bir şekilde artarak 1960'lı yıllarda %8' seviyesinden 1980'li yıllarda % 62 seviyesine ulaştığını ifade etmiştir.

Feyzioğlu, (1996) Güneydoğu Karadeniz kıyılarında yaptığı çalışmasında, fitoplanktonun mevsimsel değişiminin besinlerle olan ilişkilerinin incelendiğini, toplam 102 adet fitoplankton türünün belirlendiğini ve bunların 56'sının diatom ve 35'inin ise dinoflagellat türlerine ait olduğunu rapor etmiştir.

Eker, (1998) 1995 yılı Mart, Nisan ve Ekim aylarında Kuzeybatı ve Güney Karadeniz'de alg türleri ve alg yoğunluğu ile ilgili çalışmasında, dinoflagellatlar ve diatomelerin tür sayıları ve yoğunluklarının çalışma yapılan aylarda bol olduğunu, Ekim döneminde diatomelerin biyokütlenin toplam yoğunluğun %85'ini, kokkolitoforların ise %69'unu içerdiğini rapor etmiştir.

Zaitsev, (1998) Kuzey Karadeniz'de yaptığı çalışmasında Karadeniz'in ötrofikasyona maruz kalan en büyük deniz olduğunu belirterek, Karadeniz'in Kuzey-Batı alanının diğer bölgelere oranla ötrofikasyondan en çok etkilendiğini ve etkilenen alanın son yıllarda on kattan daha fazla arttığını rapor etmiştir.

Uysal, (2000) 1994 yılında Batı ve Güneybatı Karadeniz'deki öfotik zon bölgesinde siyanobakteri *Synecococcus* spp., türünün pigmentlerini, boyutlarını ve bu zon içindeki dağılımının ilk kez incelendiğini belirttiği çalışmasında, bu türe ait hücrelerin Tuna Nehri'nin etkisi altında olan açık deniz bölgesinde, kıyusal bölgelere oranla daha bol ve derinlik artıkça organizmanın hücre çapının azaldığını tespit edildiğini rapor tespit etmiştir.

Moncheva, (2001) 1980 ile 1990'lı yıllarda ve Karadeniz ve Ege denizi gibi iki farklı ortamın kıyaslandığı çalışmasında, insan kaynaklı besin girdisinin fitoplankton türleri üzerindeki benzerlik ve farklılıklarını bölgesel olarak incelenmiştir. Çalışmada her

iki bölgenin benzer özellikler taşıdığını, Batı Karadeniz bölgesinde alg patlamalarına neden olan 44 türün, Ege denizinde ise 30 türün tespit edildiğini belirterek, bu türlerden 14 âdetinin her iki bölgede de bulunduğunu ve bunların yaygın olarak alg patlamalarına sebep olan türler arasında olduğunu ifade etmiştir.

Bargu ve ark., (2002) Karadeniz'in Türkiye kıyılarında yaptıkları araştırmada, toksik olma potansiyeli olan *P. calliantha*, türünü elektron mikroskobu ile teşhis ettiklerini ve bu türün Karadeniz için ilk kayıt olduğunu rapor etmiştir.

Develi, (2003) Haziran-Temmuz 1996 ile Mart-Nisan ve Eylül 1998 tarihlerinde Güney Karadeniz'de mikro ($>15\mu\text{m}$) ve nano ($<15\mu\text{m}$) fitoplanktonların tür kompozisyonu, bolluğu ve biokütlesiyle ilgili yaptığı çalışmasında, toplam 150 türün tespit edildiğini, bu türlerin %50'sinin dinoflagellatlara ait olduğunu belirterek, ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde daha çok diatom bolluğunun, yaz mevsiminde ise dinoflagellat bolluğunun daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, Haziran ve Temmuz 1996 aylarında fitoplankton Bio-kütle kompozisyonunun kayda değer şekilde benzer ve homojen olduğunu da belirtmektedir.

Belkıs, (2003) Nisan 1998 ile Mart 1999 yılları arasında Marmara denizi'nde fitoplankton türleri dağılımı ve besinlerin mevsimsel değişimlerinin araştırıldığı çalışmasında, bölgenin oligotropik yapıda olduğunu, tür kompozisyonunun ise 7 sınıfa ait toplam 125 fitoplankton türünün tespit edildiğini, bu türlerden 3 tanesinin ise Türkiye denizleri için yeni tür ve çalışılan bölgedeki fitoplanktonik organizmaların toplam hücre sayısının maksimum değerine (292×10^3 hücre/L) 0,5m derinlikte mart ayında ulaşıldığını da rapor etmektedir.

Nesterova, (2003) Karadeniz'in ve fitoplanktonik türlerin jeolojik geçmişi, dağılımı ile nehirlerin etkisinin ilk kez incelendiği belirttiği çalışmasında, Bacillariophyta ve Silicoflagellata'nın üçüncü çağda, Dinophyta, Chrysophyta ve muhtemelen Cyanophyta ve Chlorophyta'nın ise dördüncü çağda form oluşturduğunu belirterek, Karadeniz'in jeolojik geçmişinden bugüne 710 tür ve tür içi taksonların tespit edildiğini ve Kuzey kutup, çift kutuplu, Kuzey-tropikal, tropikal orjinli kozmopolit ve endemik bu türlerin korunmuş olduğunu, ifade etmektedir.

Gomez ve Boicenco, (2004) Karadeniz'deki serbest yaşayan dinoflagellatların Akdeniz ve Dünya denizleriyle karşılaştırmasının literatür kayıtlarına dayalı olarak

yaptıkları bu derleme çalışmasında, endemik olmayan ve aralarında zararlı alg aşırı üremelerine neden olan taksonların da bulunduğu 54 cinse ait toplam 267 kozmopolit tür tespit ettiklerini belirterek, Akdeniz de rastlanmayan bazı kutupsal-boral türlerin de Karadeniz’den rapor edildiği ifade etmektedir.

Türkoğlu ve Koray, (2004) 1995 ve 1996 yıllarında Güney Karadeniz’in kıyısız alanında (Sinop körfezi) örneklenen fitoplankton türlerinin süksesyonu, yıllık döngüleri, çeşitliliği ve besinlerin mevsimsel değişimlerinin araştırıldığı çalışmasında, yıllık fitoplankton dağılımını içeren bir tür listesi hazırlandığını ve tespit edilen türlerin ise; cyanophyceae sınıfına ait 1 tür, *Dinophyceae* sınıfına ait 83 takson, *Prymnesiophyceae* sınıfına ait 1 takson, *Dictyochophyceae* sınıfına ait 5 takson, *Bacillariophyceae* sınıfına ait 88 takson ve *Euglenophyceae* sınıfına ait 1 takson olmak üzere toplam 179 takson tespit ettiklerini rapor etmiştir.

Baytut ve ark., (2005) Ekim 2002 ile Ekim 2003 arasında Güney Karadeniz bölgesinde Kızılırmak ve Yeşilirmak deltalarının bulunduğu Samsun ili kıyısız alanında yaptıkları çalışmada, Türkiye karasularından teşhis ettikleri denizel fitoplankton taksonlarından birinin *Zygnematophyceae*, dördünün *Bacillariophyceae* ve diğerinin ise *Fragilariophyceae*’ye ait olan toplam 6 türün ilk kayıtlarını rapor etmiştir.

Mikaelyan, (2005) 21-26 Haziran 2004 de Karadeniz’in Kuzeydoğu bölgesinde yaptığı çalışmasında sahilden 70 mile kadar olan alanda, *Coccolithophorid* alg patlaması tespit ettiklerini belirterek, *Emiliana huxleyi* türünün dominant olduğunu ve bu alg patlamasının nedeninin ise fosfor konsantrasyonunun artmasından kaynaklanabileceğini ifade etmiştir.

Vershinin ve ark., (2005) Doğu Karadeniz kıyılarında yaptıkları çalışmada fitoplankton çoğalmasının Şubat ayında *Cerataulina pelagica*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Pseudodelicatissima*, *Hemiaulus hauckii*, *Skeletonema costatum*, *Pseudonitzschia* ve *Chaetoceros* gibi türlerle başladığını ve devam eden süreçte ise diğer flagellat türlerinin çoğalmalarının meydana geldiğini belirtmiştir.

Feyzioğlu ve Ögüt, (2006) Doğu Karadeniz kıyılarında (Trabzon) alg patlamalarına neden olan baskın alg türlerin tespit etmek amacıyla red tide olaylarını 1991 ve 2001 tarihleri arasında düzenli bir şekilde gözlemlediği çalışmasında, red tide’a sebep olan

türleri *Scrippsiella trochoidea*, *Eutreptia lanowii*, *Pyramimonas orientalis*, *Euglena acusformis*, *Gymnodinium sanguineum* ve *Diplopsalis lenticula* olarak rapor etmiştir.

Fevzioğlu ve Seyhan, (2007) GÜnedoğu Karadeniz kıyısında 1993, 1994 ve 2001, 2002 yıllarında yaptıkları iki örnekleme sonucu tespit edilen fitoplankton kompozisyonlarının karşılaştırıldığı çalışmada, 5 sınıfa ait toplam 115 tür tespit edildiğini, diatom ve dinoflagellat türlerinin dominant olduklarını, bu dönemler arasında dinoflagellat oranının artarak %35 den %41'e yükseldiğini rapor etmiştir.

Taş ve Okuş, (2006) Eylül 2004 ve Ekim 2005 yılları arasında Karadeniz de kirliliğin incelenmesi projesi kapsamında yaptıkları çalışmada, Karadeniz'in Türkiye kıyılarında kalitatif fitoplankton dağılımının tespit edilerek 7 sınıfa ait toplam 129 takson'un belirlendiğini, diatom türlerinin oranının en yüksek (%52.7), dinoflagellat türlerinin ise daha az olduğunu (%36.4) ve nehir girişlerine yakın lokalitelerde ise 4 sınıfa ait toplam 12 tatlı su alginin de tespit edildiğini ifade etmiştir.

Baytut ve ark., (2008) Güney Karadeniz kıyılarında Ekim 2002 ve Eylül 2003 tarihleri arasında aylık fitoplankton değişimlerini ve çevresel faktörlerle olan ilişkilerinin aylık olarak izlediği çalışmasında, 5 divizyodan 14'ü potansiyel zararlı tür olmak üzere toplam 129 takson tespit edildiğini, toplam fitoplankton bolluğunda Ekim 2002 ile Mayıs ve Temmuz 2003 tarihlerinde üç artış olduğunun belirlendiğini rapor etmiştir.

Beşiktepe ve ark., (2008) Karadeniz'in Sivastopol körfezinde toksik *Pseudo-nitzschia* (*P. calliantha*) izole ettiklerini ve bunun ilk kayıt olduğunu belirttiği çalışmasında, bu türün yığın kültüründen elde edilen örneğin analizinden ise hücresel domoik asit tespit edildiğini rapor etmektedir.

Morton ve ark., (2009) Karadeniz 'in Kafkasya bölgesinde kabuklu zehirlenmeleriyle ilişkilendirilen *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* türlerinin mevsimsel durumunun araştırıldığı çalışmasında, *Dinophysis* spp.'nin erken ilkbahar döneminde çoğalmaya başladığını ve yaz sonuna kadar bu artışın devam ettiğini, *Prorocentrum lima*'nın ise daha nadir bulunduğunu, buna karşın Haziran 2002 de meydana gelen şiddetli fırtınanın ardından ise bu türün maksimum hücre konsantrasyonuna ulaştığını rapor etmiştir.

Vershinin ve Orlava, (2008) Rusya'nın kıyusal alanlarında yaptığı çalışmasında, toksik ve aşırı alg üremesine sebep olan onlarca tür olduğunu belirterek, bu toksin üreten organizmaların yumuşakçalar tarafından absorbe edildiğini ve bunları tüketen insanların zehirlenmelerine neden olabileceğini belirtmiştir.

Develi ve Velikova, (2009) Kuzeybatı Karadeniz de yaptığı çalışmasında, dinoflagellat, *Lessardia elongata* türünü tespit ettiklerini ve bu türün hücre bolluğunun Eylül ayında 18.400hücre/L, Haziran ayında ise 87.400hücre/L konsantrasyonlarına ulaştığını rapor etmiştir.

Baytut, (2010), Temmuz 2007 ile Aralık 2008 tarihleri arasında Karadeniz'in Kızılırmak nehir ağzı fitoplanktonu ve nutrientlerle etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmasında, *Cyanobacteria* (24), *Bacillariophyta* (213), *Chlorophyta* (32), *Cryptophyta* (10), *Dinophyta* (120), *Euglenophyta* (14), *Haptophyta* (13), *Heterokontophyta* (14), *Incertae Sedis* (2) ve *Streptophyta* (11) divizyonlarına ait toplam 451 taksonun tespit edildiğini, bu taksonlardan, 75 âdetinin Türkiye alg florası için yeni kayıt ve 41'inin potansiyel zararlı tür olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, araştırma bölgesinde belirlenen taksonların %52'si tatlı su türlerinden, % 48'inin ise denizel kökenli taksonlardan olduğunu, toplam fitoplankton tür sayısının % 40'ın acı sularda yaşayabilen tatlı su ve denizel kökenli örihalin türlerin oluşturduğu tespit edildiğini rapor etmiştir.

Baytut ve ark., (2010) Karadeniz'in Güney'inde, Samsun körfezinde oluşan besin artışının fitoplanktonik organizmalar üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmasında, 5 ordo'dan 14'ü olası toksik tür olmak üzere toplam 129 taksanın belirlendiğini, toplam fitoplankton biomass yoğunluğunun 2002 ve 2003 yıllarında üç pik yaptığını rapor etmektedir.

Bat ve ark., (2011) Karadeniz'in kapsamlı biyolojik çeşitlilik karakteristiğinin ortaya konulduğu bu derleme çalışmasında, Karadeniz kıyılarının insan kaynaklı etkilere şiddetli olarak maruz kaldığını belirterek bu durumun bölgedeki biyolojik kaynakların üreme kapasitesini ve miktarını azalttığını, biyo-çeşitlilikte ise değişimlerin meydana geldiğini ifade ederek bu durumun özellikle deniz tabanında yaşayan toplulukları hayati şekilde tehlike altına aldığını rapor etmiştir.

Yasakova, (2011) 1998-2009 yılları arasında Kuzeydoğu Karadeniz’de yapmış olduğu çalışmada, *Oxytoxum variabile*, *Lioloma pacificum*, *Asterionellopsis glacialis*, *Dinophysis odiosa*, *Alexandrium ostenfeldii*, (*Diatomyceae*) ve *Phaeocystis pouchetii* (Chrysophyta) türlerinin tespit edildiğini belirterek, bu türlerin bölgeye gemilerin balast sularıyla taşındığının tahmin edildiğini belirtmiştir.

Özdemir ve ark., (2012) Güneydoğu Karadeniz’in Trabzon ili/Yomra ilçesi kıyısız alanında Eylül 2007 ile Ağustos 2008 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, 6 sınıftan toplam 110 tür tespit ettiklerini, yıl boyunca *Dinophyceae* (%47,3) ve *Bacillariophyceae* (%46,4)’nın baskın gruplar olduğunu belirtmiştir.

Krakhmalny ve ark., (2012) dinoflagellat türlerinin Karadeniz’deki gelişim aşamalarının ele alındığı çalışmada, son 20 yılda rapor edilen 200 den fazla yeni tür ile birlikte toplam 456 tür 467 varyete ve form tespit edildiğini belirtilerek, bugüne kadar 10 order (takım), 37 familya ve 79 cinse ait dinoflagellatların Karadeniz’de bulunduğu rapor etmiştir.

Mousing, (2013) Güney Karadeniz de fitoplankton tür kompozisyonu ve total bolluğundaki değişimlerin son 150 yılı kapsayacak şekilde araştırdığı çalışmada, 1960 yılından sonra Karadeniz’in hem tür kompozisyonunun değişerek toplam bolluktaki silikatlı protistlerde artış görüldüğünün tespit edildiğini ve bu artışın nedenin Tuna nehrinden gelen besinlerin sebep olabileceğini belirtilmektedir. Ayrıca dinoflagellatların tür, bolluk ve çeşitliklerinde değiştiğini, *Lingulodinium polyedrum*, *Polykrikos schwartzii* ve *Spiniferites spp.* gibi türlerin dominant hale geldiğini rapor etmektedir.

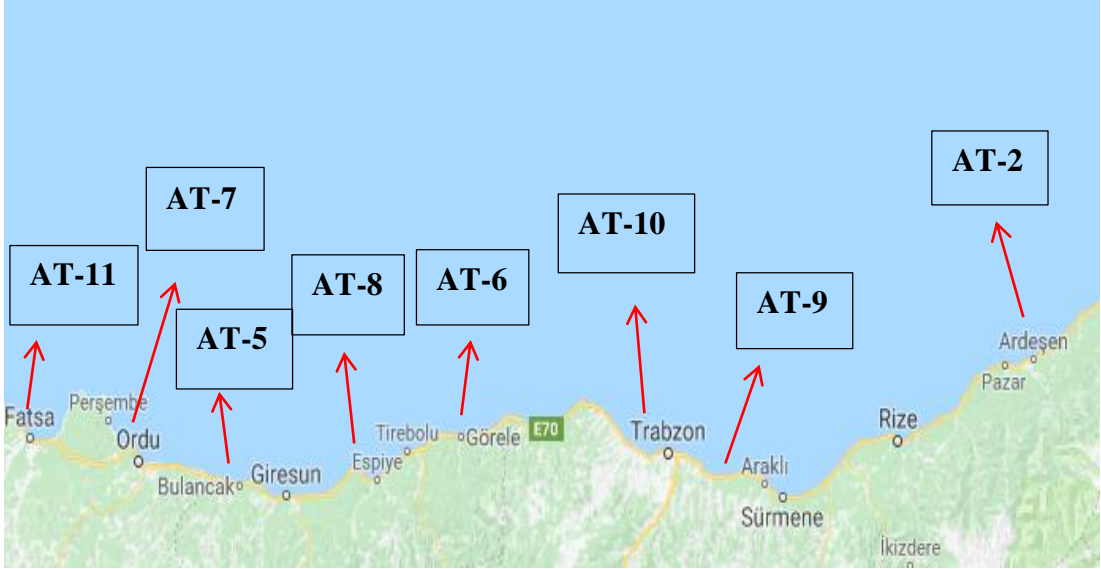
Petrova, (2015) Karadeniz’in Bulgaristan kıyısız alanında 2008-2010 yılları arasında yapmış olduğu çalışmada 204 türün tespit edildiğini, alglerin 14 sınıfa dağıtıldığını yüzde olarak ise en yüksek oranda dinoflagellatlar (%40,2) ve *bacillariophyceae* (%31,8) gruplarının olduğunu rapor etmektedir.

Ağırbaş, (2016) 2014 ve 2015 de Güneydoğu Karadeniz’in kıyısız alanında (Rize) fitoplanktonik organizmaların sezonsal değişimlerini incelediği çalışmada, toplam 71 türün tespit edildiğini ve bu türlerin 41’inin Dinoflagellatlara, 18’inin Diatomlara ve 12’sinin diğer gruplar (*Silikoflagellata*, *Oglenofita*, *Primnesiofitai*, *Chlorofita*, v.b.) olarak tespit ettiklerini belirtmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Alanının Yeri



Şekil 3.1 Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde örnekleme yapılan lokasyonlar

Deniz orjinli Yeşil Mikro alglerin (Chlorophyta) Güney orta ve Güneydoğu Karadeniz bölgesinde yüzey suyundaki çeşitliliğini belirlemek amacıyla, steril 5L hacmindeki borosilikat malzemeden yapılmış balon jodeler ile kıyısız limanlık alanlardan nitel örnekleme ile deniz suyu örnekleri alınmıştır. Örnekleme yapılan lokaliteler Şekil 3.1’de gösterilmektedir.

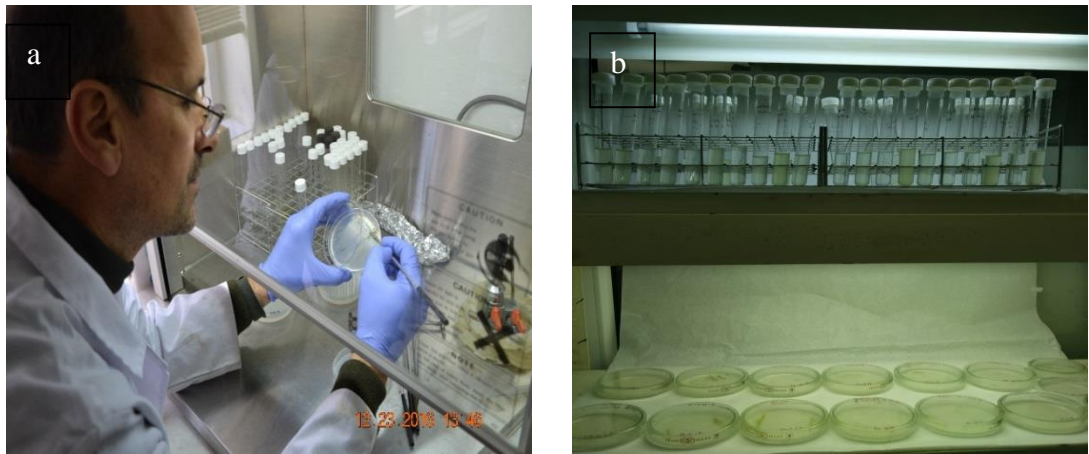
3.2. Yöntem

Örnekleme çalışmaları sonrası laboratuara getirilen örneklerden sırasıyla

- Alg hücrelerinin çoğaltılması, izolasyonu ve saflaştırması
- Toplam DNA’nın eldesi
- Jel elektroforezi ile DNA kalite kontrolü
- PZR ile amplifikasyon
- PZR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü
- Sekans analizi ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi işlemleri uygulanmıştır.

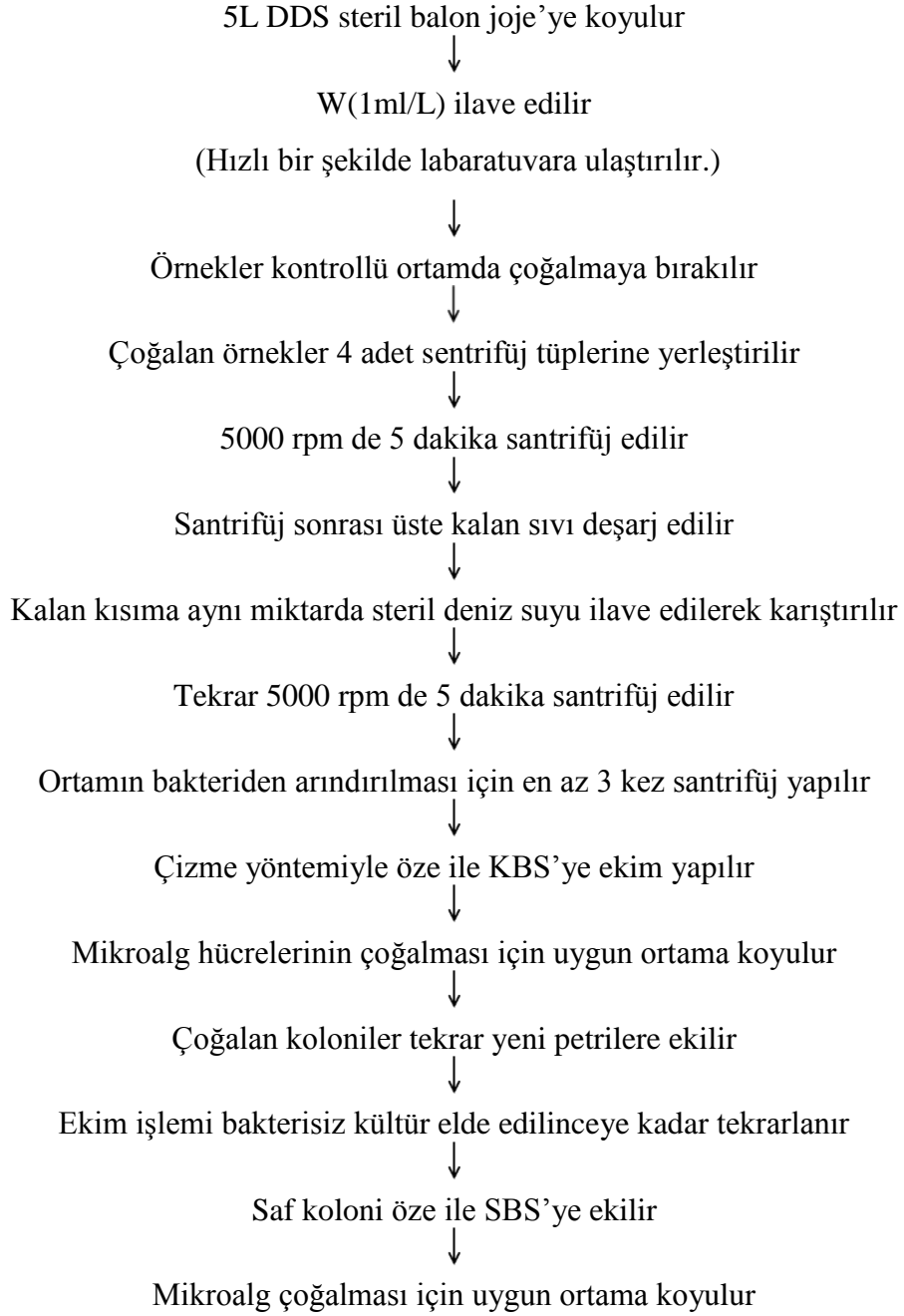
3.2.1. Alglerin oğaltılması, İzolasyonu ve Saflaştırılması

Labaratuvara uygun şartlarda getirilen deniz suyu örnekleri (DDS) farklı deniz suyu ortamlarında (Kıatı ve sıvı) kùltür edilerek türler izole edilmiştir. Farklı lokaitelerden alınan ve 5L'lik steril balon joje içerisine konan DDS örneklemleri labaratuvarda ağız açıklığı 0,45 μm olan membran filitre (MF) ile süzöldü. DDS içerisinde bulunması muhtemel mikroalglerin çoğalabilmesi için Walne besin solüsyonu(W) ilave edildi (1ml/L). Walne medyumunu hazırlama prosedürü Ek-1'dedir. 1000–2000 Lux ışık ve 18 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklığı ayarlanmış kontrollü ortamda 5-10 gün süreyle mikroalgler çoğaltıldı. ođalan örnek saflaştırma için dört adet 10 ml test tüplere konularak santrifüj edildi (3000 rpm). Santrifüj sonrası dibe çöken alg dışındaki sıvı kısım tamamen deşarj edilerek yerine 10ml steril DDS ilave edildi. Bu işlem en az üç kez tekrarlandı. Santrifüj işlemi ile bakteri yükü azaltılan kùltür kıatı besini yerine (KBS) öze ile ekimi yapıldı. Ekim için çizme yöntemi kullanıldı. Kıatı besini hazırlama prosedürü Ek-2'dedir. Ekimi yapılan petri kabları mikroalg hücrelerinin çoğalması için 1-2 hafta süre uygun ortamda muhafaza edildi (şekil 3.2). Kıatı besini yerine yapılan ekimlerden temiz alg kolonisini elde edinceye kadar ekimler sürdüröldü. Petri içerisinde çoğalan kùltürün mikroskop altında kontrolü yapılarak temiz koloniler belirlendi. İşaretlenen koloniler öze ile sıvı besini yerine (test tüp) ekildi. Sıvı besini hazırlama prosedürü Ek-3'dedir. Saflaştırılan türler hem test tüp ve hem de petri içerisinde 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza altına alındı.



şekil 3.2 Aseptik şartlarda mikroalg ekimi işlemi (a), Kıatı ve sıvı ortam içerisine ekilen saf mikroalg kùltürlerinin iklimik ortamda çoğalması (b)

Yukarıdaki prosedürü takip ederek, mikroalg türleri izole edildi. Bu işlemin daha kolay anlaşılabilmesi için grafik ile aşağıda açıklanmıştır.



3.2.2 Morfolojik inceleme

Morfolojik inceleme izolasyonların basit düzeyde teşhisi için yapıldı. İzolatlar Nikon Eclipse E 800 mikroskop (Nikon inc. Tokyo Japan) ile incelendi. İncelenen her bir izolat etiketlendi ve fotoğraflandı. Bu işlem için Dxm1200 digital kamera ACT software program kullanıldı.

3.2.3 Moleküler Analizler

3.2.3.1 Toplam DNA İzolasyonu

20 mg liyofilize veya 100 mg yaş haldeki plankton örneklerinden DNA eldesi ticari kit prosedürlerine göre yapılmıştır. Toz haline getirilmiş liyofilize örnekler önce mekanik olarak ezilmiş ve daha sonra lizis tamponu eklendi ve inkübasyon yoluyla parçalanmıştır. Lizis tamponundaki RNase A, numunedeki RNA'yı sindirir. Lizisasyondan sonra proteinler ve polisakkaritler tuzla çökelir. Kit prosedürlerinde, hücre döküntüleri ve çökeltileri, benzersiz bir filtrasyon ve homojenleştirme ünitesi olan mini spin kolonu boyunca kısa bir santrifüjleme ile tek bir adımla uzaklaştırılır.

DNA'nın membrana bağlanmasını hızlandırmak için temizlenmiş lizata bağlayıcı tampon ve etanol eklenir. Homojenize olmuş örnek mini spin kolon içine konularak ve kısa süreli santrifüj edilerek DNA'nın seçici membrana yapışması sağlanmıştır. DNA membrana bağlanırken, proteinler ve polisakkaritler gibi kirleticiler yıkama adımlarıyla verimli bir şekilde uzaklaştırılır. Son olarak TE (pH 8.0) tampon ile santrifüj işlemi yapılarak DNA'yı içeren sulu solüsyon elde edilmiştir (Şekil 3.3). Pelet halindeki DNA çözüldükten sonra agaroz jelde bütünlüğü kontrol edilmiştir.




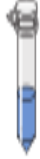
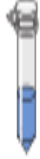
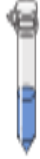





Şekil 3.3 DNA'yı içeren sulu solüsyon

Spektrofotometre ile yapılan kontrolde ise saflaştırılmış DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans oranları 1.7-1.9'dur ve absorbans taramalarının, 260 nm'de simetrik bir pik göstermesi yüksek oranda saflığın göstergesidir. Miktarı ve kalitesi kontrol edilmiş DNA örnekleri -20 °C'de saklanmaktadır.






Bu çalışmada analizi yapılacak olan genomik DNA izolasyonu QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. 69104) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon için üretici

firmanın aşağıda açıklanan “Bitki dokularından total DNA Saflaştırma Mini Protokolü” yöntemleri izlenmiştir (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1 DNA elde etme protokolü

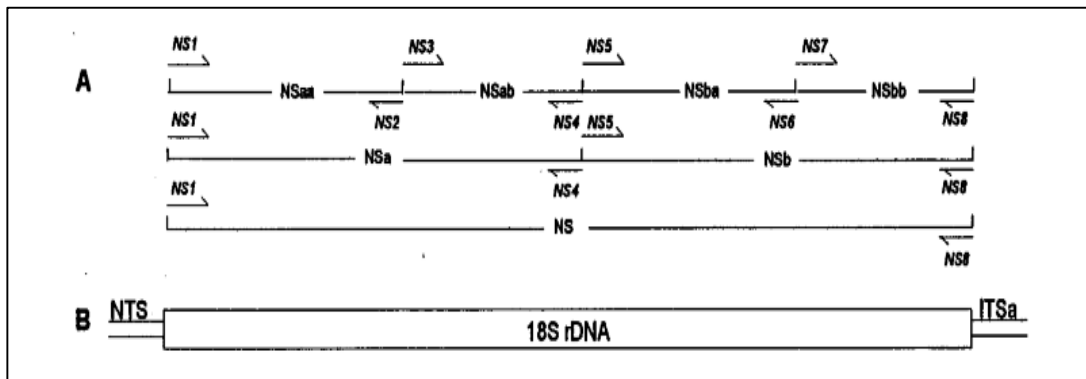
Öğütme, parçalama ve çökelti oluşturma	Liyofilize haldeki yaklaşık 20 mg plankton dokusu, sıvı azot kullanılarak havan yardımıyla ince bir toz haline getirilir ve 1.5 ml’lik tüplere transfer edilir.	
	Her bir tüpe maksimuma 400 ul Tampon AP1 ve 4µl RNaz A stok solüsyonu (100 mg / ml) eklenmiştir.	
	Örnek tüpleri 65C°’de sıcak blokta ya da su banyosunda 10 dk inkübe edilerek dokular parçalanır. İnkübasyon sırasında tüpler 2 veya 3 kez ters çevirerek karıştırılmıştır.	
	Lizata 130µl P3 tamponu eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.	
QIAshredder ile santrifüjleme	Parçacıklı maddeleri çıkarmak üzere, ilk olarak lizat oda sıcaklığında 20.000xg (14.000 rpm)’de 5 dakika santrifüj yapılır.	
	Lizat, 2 ml’lik bir toplama tüpüne yerleştirilen QIA shredder Mini spin kolonuna pipetlenir ve 20.000 xg’de (14.000 rpm) 2 dakika boyunca santrifüjlenir.	
	QIA shredder Mini spin kolonundan geçen sıvı hücre çöküntüleri ve pelete zarar verilmeden yeni bir tüp içine aktarılır. Bazı bitki türleri için daha az lizat geri kazanılsa da genellikle 450µl lizat geri kazanılır. Bu durumda, bir sonraki adımın hacmi belirlenir.	
Etanol ekle ve DNA’yı bağla	Temizlenmiş lisata 1.5 hacim %96-100’lük etanol ilavesi yapılmış tampon AW1 ilave edilir ve pipetleme ile karıştırılır.	
	Bir önceki adımdaki karışımdan oluşmuş olabilecek herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 650µl pipetlenir ve 2 ml’lik bir toplama tüpüne (verilen) yerleştirilen DNeasy mini spin kolonuna transfer edilir. 1 dakika boyunca ≥6000 xg (çoğu mikrosantrifüj için ≥8000 rpm’e karşılık gelir) ile santrifüjlenir ve toplama tüpündeki sıvı dökülür. Bu adım bir kez daha tekrar edilir ve toplama tüpü biriken sıvıyla birlikte atılır.	

Çizelge 3.1 DNA elde etme protokolü (devamı)

Yıkama	Her bir örneğe 500µl AW2 yıkama çözeltisi (95% etanol ilave edilmiş) ilave edilir ve oda sıcaklığında $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm)'de 1 dk. santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı dökülür. Minikolon Toplama tüpüne yeniden takılır ve bir sonraki adımda tekrar kullanılır.	
	DNeasy Mini spin kolonuna 500 µl Tampon AW2 eklenir ve membranı kurutmak için 20.000 xg'de (14.000 dev / dak) 2 dakika santrifüjlenir.	
Elüsyon	DNeasy Mini spin kolonlar yeni bir 1,5 ml'lik tüpe transfer edilir ve 100 µl AE genomik elüsyon tamponu DNeasy membranına eklenmiştir. Oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dakika inkübe edilir ve sonra elute etmek için $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm)'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Tüp saflaştırılmış genomik DNA içerir ve tüpte toplanan sıvı dökülmez.	 
DNA kullanıma hazırdır	Minikolonlar atılır ve saflaştırılmış DNA alınarak yakın zamanda kullanılacaksa +4°C° veya uzun zaman sonra kullanılacaksa -20 C° de saklanır.	 Ready-to-use DNA

3.2.3.2 18S rDNA Bölgesinin Çoğaltılması (Amplifikasyonu)

Mikroalg örneklerinden elde edilen toplam DNA içerisinde 18S rDNA bölgesi çoğaltılmak için seçilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Çoğaltılan 18S rRNA gen bölgesinin şematik gösterimi (Liu ve ark., 1995)
A) Çeşitli 18S rDNA bölgesinin tamamı, çeşitli primerler çifti kullanılarak nispeten kısa alt fragmanlara bölünür. NS, nükleer küçük-altbirim rDNA; NS'yi takip eden küçük harfler, ilgili alt parçaları gösterir. (B) 18S rRNA geninin yeri. NTS, transkripsiyona tabi olmayan spacer; ITSa, küçük-altbirim genleri ile bağlantılı olan ITS kısmı

18S'i kodlayan gen bölgesi için başka araştırıcılar tarafından geliştirilen primer setleri (NS1, NS3, NS4 ve NS8) (White ve ark., 1990) ileri ve geri yönlü kullanılarak, gen bölgesinin yaklaşık 2000bp'lik kısmı çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan DNA segmenti ve primer sekansları

Gen Segmenti	Primer Dizisi	Kaynaklar
18S rDNA	NSa NS1: 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	White ve ark. (1990)
	NS4: 5'- CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	
	NSb NS3: 5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'	
	NS8: 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'	

18S rDNA bölgesinin çoğaltılması için iki ayrı reaksiyon programı (NSa (NS1-NS4) ve NSb (NS3-NS8)) oluşturulmuştur. Çift iplikçikli DNA'nın yükseltgeme işlemi her örnek DNA'sı ile birlikte toplam 50 µl'lik PZR hacminde yürütüldü (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.3. 18S rDNA bölgesinin çoğaltılması için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Reaksiyon Tüpü (1 örnek için)	Negatif kontrol
2X Reaksiyon Buffer		
50u/ml Tag DNA Polimeraz	25µl	25µl
3mM MgCl ₂		
400µM dNTPs (dGTP, dCTP, dATP ve dTTP)		
İleri yönlü Primer (10pmol)		
Geri yönlü Primer (10pmol)	5µl	5µl
Kalıp DNA (40ng/ml)	10µl	-
Nucleaz içermeyen saf su	5µl	5µl
Toplam	50µl	50µl

Bu karışım içerisinde sırasıyla; DNA, ileri ve geri yönlü primerler, PZR Master Mix, 2X (PROMEGA) Reaksiyon bufferı (pH 8.5) ve ddH₂O bulunmaktadır. 2X Reaksiyon Buffer ise, 50 ünite/ml TaqDNA Polimeraz enzimi, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂'dan oluşmaktadır. Hazırlanan karışım 0.5 ml'lik PZR tüplerine dağıtılmıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.5. PZR işleminin gerçekleştirildiği termal cycler

Örneklerin spesifik gen bölgesinin çoğaltılmasında Thermal cycler (BIORAT, Şekil 3.5) yardımıyla yapılmış ve Çizelge 3.4’de verilen PZR programları, tatmin edici sonuçlar vermiştir.

İlk adımda 95 °C’de 2 dk.’lık bir denaturasyon işlemi yapılarak döngülere geçilmiştir. Döngü içerisinde tekrar 95°C de 45 sn’lik denaturasyon, 52°C de 55 sn hibridizasyon, ve 72°C de 1,5 dk. polimerizasyon işlemi için uygulanmıştır. 30 döngü sonrasında 72°C de 5 dk. son polimerizasyon işlemi tamamlanmış ve 4 °C de örneklerin tutulması için program yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerler için belirlenen PZR programları

PZR Kondisyonu	18S rDNA Segmenti					
	Sıcaklık (°C)	NSa Süre	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	NSb Süre	Döngü Sayısı
Birinci denatürasyon	95	3 dk	1	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	60 sn	}	95	60 sn	}
Bağlanma	52	51 sn		40	60	
Yeni zincir sentezi	72	120 sn	1	72	120 sn	1
Final zincir sentezi	72	5 dk		72	10 dk	
Saklama	4	∞		4	∞	

3.2.3.3 PZR Ürünlerinin Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

PZR yükseltgemesi sonrası 5 µl PZR ürünü + 1 µl 6X yükleme boyası (Loading dye) ve 50 ya da 100 bp'lik DNA boy belirteci (3 µl boy belirteci + 1 µl 6X yükleme boyası), ethidium bromid yoğunluğu 0.01 mg (1mg/100µl) olacak şekilde hazırlanan %1.2'lik agaroz jel üzerinde 1xTBE tampon sisteminde koşturulmuştur (Şekil 3.6b). Jeller her bir fragment modeli için istenilen ayrıştırma ve jel konsantrasyonuna bağlı olarak yaklaşık olarak 10V/cm'de 40-50 dk. koşturulmuştur. Ethidium bromidle boyanan DNA parçaları UV illüminatörle görüntülenmiştir. Jel görüntüleri jel dökümantasyon sistemi (Biostep, Darkhood DH-30/32) ve termal yazıcı (Mitsubishi, P91D) kullanılarak kayıt edilmiştir (Şekil 3.6a).

Bu görüntüler üzerinden PZR çoğaltmasının etkinliği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. Aynı zaman da PZR ürün boyu beklenen ürün boyu ile karşılaştırarak kontrol edilmiştir. 18S rDNA gen bölgesinin çoğaltılan yaklaşık ürün boyu 2000 bp büyüklükte olduğu bulunmuştur.

Ayrıca ekstraksiyonu yapılan total DNA'nın ve PZR ürünlerinin saflık ve kalite tayini UV/visible spektrofotometre (BIO-RAD, The SmartSpec Plus) kullanılarak, 260 ve 280 nm dalga boyunda optik densitesinin okunmasıyla tahmin edilmiştir. 260 nm dalga boyundaki optik densite (OD) değeri nükleik asitlerin her ikisinin (DNA ve RNA) hesaplanmasını sağlamaktadır. 280nm dalga boyu ise örnekteki protein miktarını belirler. 260 nm ve 280 nm okumaları arasındaki oran izole edilen nükleik asitin saflığının tahminini verir. Saf olan DNA için OD260/OD oranı 1.8–2.0 arasındadır. Eğer protein ve/veya fenol kontaminasyonu varsa bu oran 1,8'den küçüktür. Eğer saflık kontrolünde oran 2.0'ın üstünde çıkarsa örnekte RNA bulunduğunun göstergesidir.



Şekil 3.6 Jel görüntüleme ünitesi (a) ve Elektroforez cihazı (b)

Genel olarak, 10 µl izole edilmiş DNA 490 µl TE tampon ile karıştırılmış ve 65°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kör solusyonu olarak 500 µl TE tampon kuvars küvete konulup okuma yapıldıktan sonra, DNA örneği spektrofotometreye yerleştirilmiş ve örneğin sulandırma oranı dikkate alınarak, orijinal örnek konsantrasyonu aşağıda verildiği gibi hesaplanmıştır:

$$DNAK = \left(\frac{500\mu l}{\chi\mu l} \right) \left(\frac{50\mu g}{ml} \right) OD_{260} \quad (1.1)$$

şeklinde olup burada,

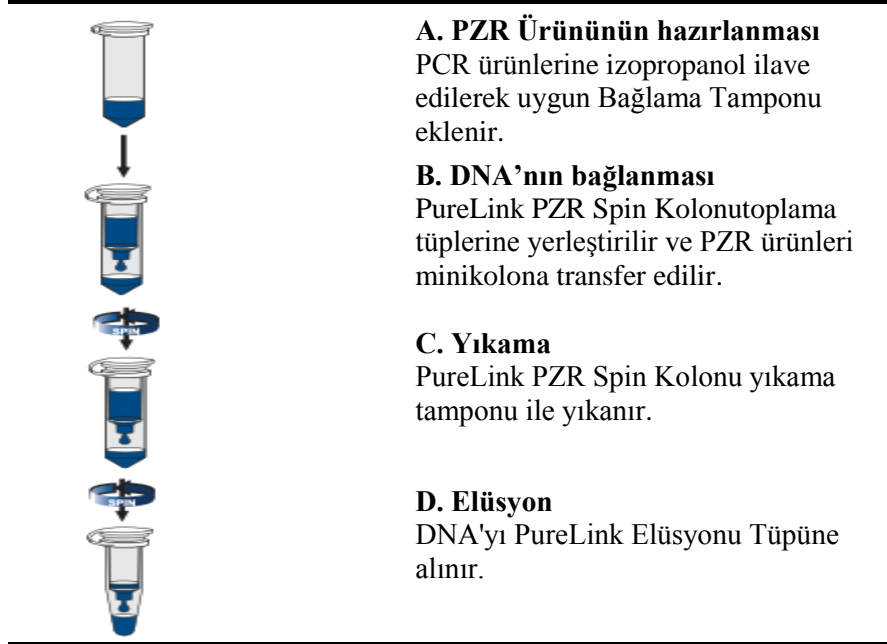
DNAK	:	DNA konsantrasyonu (µg/ml)
X	:	Kullanılan DNA hacimi
OD	:	Optik yoğunluk (density) ifade eder

Kontrol sonrası başarılı bulunan PZR ürünleri kullanılmak üzere 4°C’de tutulmuş veya daha uzun süreli kullanım için derin dondurucuya (-20 °C) konulmuştur.

3.2.3.4 PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürününün saflaştırma işleminde INVITROGEN PureLink™PZR Saflaştırma Kiti (Cat.No.K310001) kullanılmıştır. Kit içerisinde 3 adet tampon bulunmaktadır: Bağlama tamponu (B2), bağlama tamponu (B3), yıkama tamponu (W1). 4 aşamada gerçekleştirilen saflaştırma işlemi Çizelge 3.5’ de verilmiştir.

Çizelge 3.5 PZR ürünün saflaştırılması işleminin şematik gösterimi (INVITROGEN PureLink™PZR Saflaştırma Kiti (Cat.No.K310001) ürün protokolünden alınmıştır



3.2.3.5 PZR Ürünlerinin Sekansı

Saflaştırılan 100 µl'lik PZR ürünleri 50 µl hacim içerisinde sulandırılarak her iki gen bölgesi için ileri ve geri yönlü primerleri ile birlikte iki yönlü okuma yapılmıştır. PZR ürününün sekanslarının alınmasında 18S rDNA segmenti için de yer alan NSa ve NSb bölgeleri için ileri ve geri yönlü primerler ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu şekilde her bir iplikçik diğeri ile tamamlayıcı olarak karşılaştırılarak iki defa kontrol edilmiştir. BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, dizi ürünleri ABI 3730XL kapillar otomatik sekans aletinde yürütülmüş ve elde edilen ham veriler alınmıştır.

3.2.3.6 DNA Dizilerinin İşlenmesi

Moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan çoklu hizalamalar; protein ailelerini karakterize eden sekans motiflerini bulmak, bilinen veya bilinmeyen sekans aileleri arasındaki benzerlikleri (homoloji) ortaya çıkarmak, ikincil veya üçüncül yapıların ön tahminlerini desteklemek, gerekirse PZR primerlerinin dizaynını desteklemek ve oluşturulacak filogenetik analizlere yardımcı olmak için kullanılmıştır. Filogenetik analizler için veri seti oluşturulması amacıyla, farklı türlere ait 18S rDNA gen dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından

bulunarak indirilmiştir. NCBI'den alınan örneklerin seçiminde, özellikle dağılım gösterdiği havzalarından çalışılan türler ile birlikte bu türlere yakın diğer türler göz önüne alınmıştır. Dış grup seçerken ise türün çalışılan taksa ile ilişkili olmasına ve bu taksa sınıflanmaya başlamadan daha önceki zamanda ortak bir ataya sahip olmasına dikkat edilmiştir. Veri setindeki homolog bazların hizalanması için ClustalX (Thompson ve ark., 1997) programı kullanılmıştır. Program tarafından hizalamaları yapılan veri setleri BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak tekrar kontrol edilmiş, gerek görülen bölgeler düzeltilmiş ve nükleotid eklenme-silme (insertion-deletion) bölgeleri içeren kolonlar uzaklaştırılmıştır.

3.2.3.7 Sekans Profilinin Çıkarılması

Sekans profilinin oluşturulması genellikle çoklu homolog sekansların hizalanmasıyla başlar ve çoklu sekans hizalamasından elde edilen bilgilerin özetinin çıkarılması için yapılır. Çıkarılan profilin analizinde iki ana adım izlenmiştir. Bunlardan birincisi profilin oluşturulması, ikincisi ise sekansların ait olduğu veri tabanı veya tek sekans ile profilin karşılaştırılması şeklinde olmuştur.

3.2.3.8 Filogenetik Analizler

Filogenetik analizler öncesinde veri seti için en uygun baz değişim modelinin belirlenmesi için jModelTest v. 0.1 (Posada, 2008) programı kullanılarak Akaike Information Criterion (AIC: Akaike, 1974) ve Basian Information Criterion (BIC) analizleri yapılmıştır. ModelTest analizinin bir veri seti için birden fazla tipte baz değişim modeli önermesi durumunda önerilen her model için filo genetik ağaçlar oluşturulmuş ve en yüksek Bootstrap değerini veren ağaç bu çalışmada gösterilmiştir.

İzolatlar arasındaki evrimsel ilişkilerin belirlenmesi için Neighbor-Joining(NJ), Maksimum-Parsimony (MP) ve Maksimum-Likelihood (ML) olmak üzere üç farklı algoritma kullanılmıştır. NJ ve MP analizleri PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) programı kullanılarak ML analizleri ise PYHML v. 3.0 (Guindon ve Gascuel, 2003) programı kullanılarak yapılmıştır. Oluşturulan filo genetik ağaçların güvenilirliklerini belirlemek amacıyla Bootstrap analizleri her algoritma için 1000 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır.

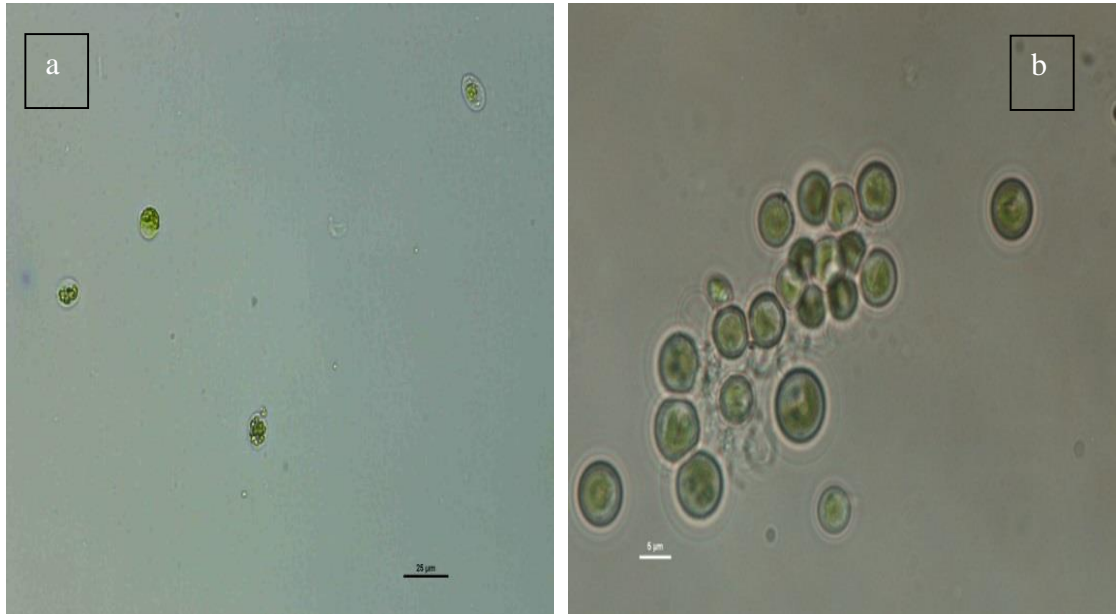
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde bulunan Ordu, Giresun, Trabzon ve Rize illerinden Chlorophyta diviziyosuna ait toplam 8 adet mikroalg örneği izole edilmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca bu izolatların moleküler filogenetik yöntemler kullanılarak türleri teşhis edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda izolatların Chlorophyta diviziyosundan 5 farklı cinse ait olduğu belirlendi.

Çizelge 4.1 İzolatlara ait lokasyonlar ve örneklenme tarihleri

İzolat	Lokasyon	İzolasyon Tarihi
AT-2	Ardeşen/Rize	09 Kasım 2015
AT-5	Bulancak/Ordu	11 Kasım 2015
AT-6	Görece/Giresun	05 Haziran 2015
AT-7	Bolaman/Ordu	15 Mayıs 2015
AT-8	Espiye/Giresun	05 Haziran 2015
AT-9	Yomra/Trabzon	07 Nisan/2015
AT-10	Ortahisar/Trabzon	14 Ekim 2015
AT-11	Fatsa/Giresun	12 Ekim/2015

Bu izolatlardan AT-2 Rize ili Ardeşen ilçesinde kıyısız alandan 09 Kasım 2015 tarihinde alınan örnekten izole edilmiştir. İzolat mikroskop altında yeşil renkli, ortalama 12-17 µm çaplı küresel hücreler olarak görülmüştür (Şekil 4.1a, b).



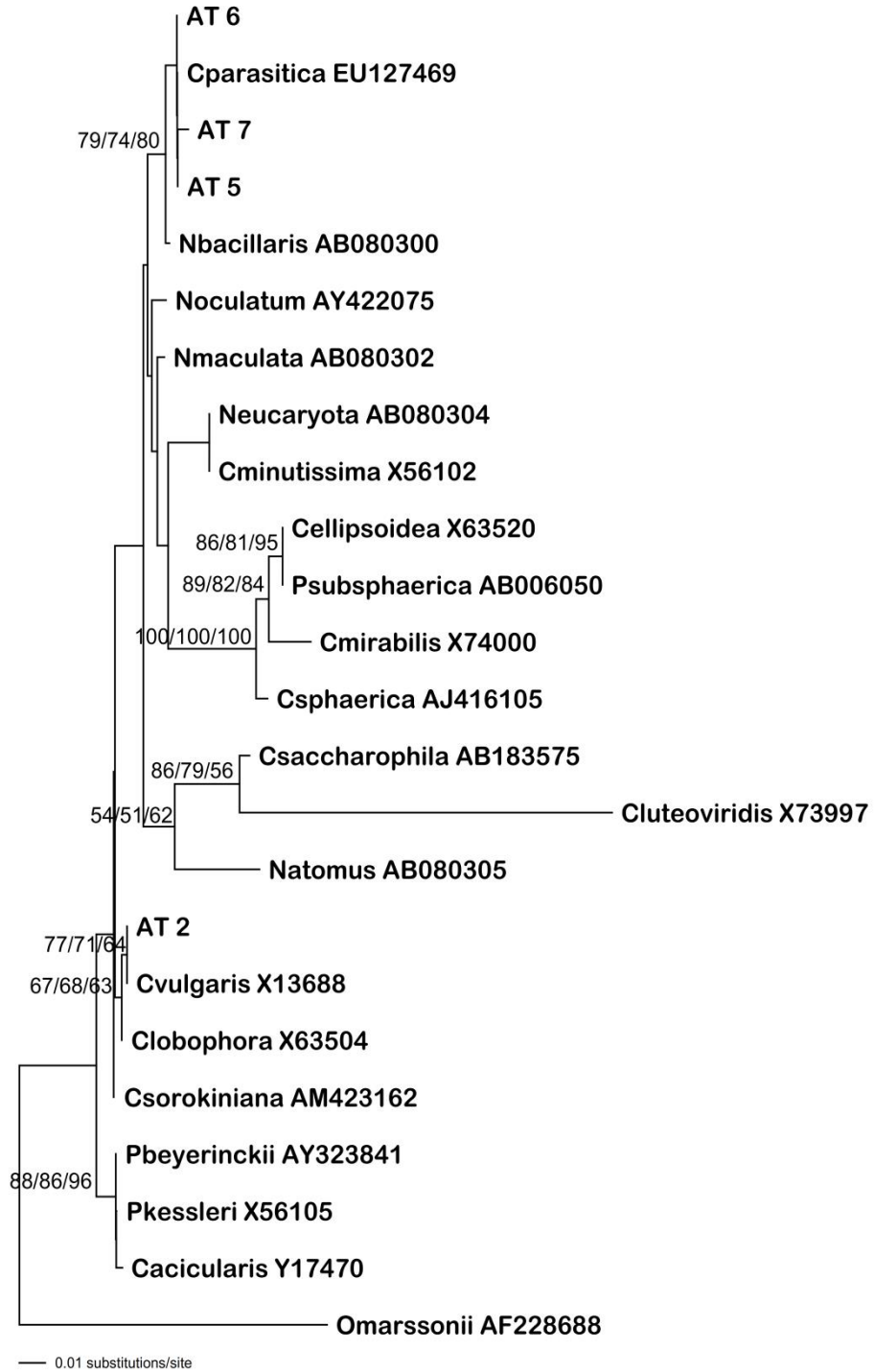
Şekil 4.1. İzole edilen *Chlorella vulgaris* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a)10x40, (b)10x100 büyütme

Yapılan PZR amplifikasyonları ve aynı primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleotid dizilemeleri sonucunda izolatanın 18S rDNA genine ait 546 bp'lik kısmı elde edilmiştir. Yapılan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi sonucunda izolatanın *Chlorella* cinsi ile ilişki olduğu görülmüştür. Bu cinsin izolatomuz ile yakın türlerine ait 18S rDNA nükleotid dizileri GenBank'tan indirilmiş ve bir veri seti oluşturulmuştur (Çizelge 4.2). Analizler 112 adet polimorfik bölge içeren 526 adet hizalanmış nükleotid üzerinden yürütülmüştür. AIC ve BIC testleri sırasıyla; TrN+I+G (I: 0.479; G: 0.521) ve TrNef+I+G (I: 0.479; G: 0.52) evrimsel modellerini önermiştir. Bu modellerden TrN+I+G modeli daha yüksek Bootstrap değerleri verdiği için bu çalışmada bu model ile oluşturulan ağaç gösterilmiştir (Şekil 4.2). MP analizleri 58 adet türemiş ortak karakter üzerinden yürütülmüştür. Analizler sonucunda 187 basamak uzunluğunda 1 adet (CI: 0.721925; RI: 0.771930; HI: 0.278075) en kısa ağaç elde edilmiştir. ML ve MP analizlerinde elde edilen Bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler

Tür	GenBank Erişim No	Kaynak
<i>Coccomyxa parasitica</i>	EU127469	Rodriguez ve ark. yayınlanmamış
<i>N. bacillaris</i>	AB080300	Yakamoto ve ark., 2003
<i>N. oculatum</i>	AY422075.1	Henley ve ark., 2004
<i>N. maculata</i>	AB080302.1	Yamamoto ve ark., 2003
<i>N. eucaryota</i>	AB080304	Yamamoto ve ark, 2002
<i>C. minutissima</i>	X56102.1	Huss, 1990
<i>C. ellipsoidea</i>	X63520	Krienitz, 1996
<i>P. subsphaerica</i>	AB006050	Hanagata, 1997
<i>C. mirabilis</i>	X74000.1	Krienitz, 1996
<i>C. sphaerica</i>	AJ416105	Friedl, 2001
<i>C. saccharophila</i>	AB183575.1	Sekiguchi ve ark. yayınlanmamış
<i>N. atomus</i>	AB080305.1	Yamamoto, 2003
<i>C. vulgaris</i>	X13688.1	Huss, 1989
<i>C. lobophora</i>	X63504.1	Huss, 1993
<i>C. sorokiniana</i>	AM423162.1	De-Bashan, 2008
<i>P. beyerinckii</i>	AY323841.1	Krienitz, 2004
<i>P. kessleri</i>	X56105	Huss, 1990
<i>C. acicularis</i>	Y17470	Ustinova, 2001
<i>O. marssonii</i>	AF228688	Hepperle, 2000

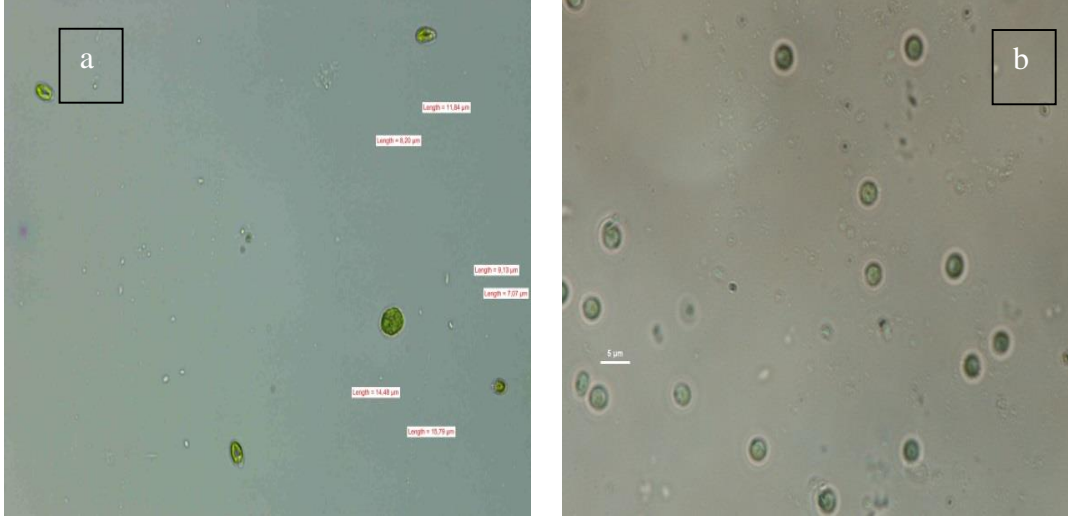
NJ tree



Şekil 4.2 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç TrN+I+G (I: 0.479; G: 0.521) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Oocystis marssonii* türü ile köklendirilmiştir

18S rDNA nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizler neticesinde (Şekil 4.2) izolatın *Chlorella* cinsi içerisinde *C. vulgaris* türü ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. İzolatımız AT-2, *C. vulgaris* SAG 211-11b izolatı ile aynı 18S rDNA haplotipini göstermiştir bu ilişki NJ, ML ve MP ağaçlarında sırasıyla %77, %71 ve %64'lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Ayrıca *C. loboehora* bu soy hattına 99,8% nükleotid dizi benzerliği ile en yakın tür olarak belirlenmiştir ve bu ilişki NJ, ML ve MP ağaçlarında sırasıyla %67, %68 ve %63'lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Bu veriler ışığında AT-2 izolatının *C. vulgaris* türüne ait olduğunu söyleyebiliriz. *Chlorella* cinsi, *Chlorophyta* divizyonu, *Trebouxiophyceae* sınıfı, *Chlorellales* takımı, *Chlorellaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır. Cins ilk olarak Beijerinck (1890) tarafından tanımlanmıştır ve tip türü *C. vulgaris* Bayerinck'dir. Günümüzde bu cins içerisinde tanımlanmış 42 tür vardır (Anonim, 2018). *Chlorella* cinsi morfolojik olarak küre ya da elips şeklinde, 2-12µm çapındadır (Huss ve Sogin, 1990). İlk aksenik kültürü yaklaşık 120 yıl önce yapılmıştır ve günümüzde hala bitki fizyolojisi ve biyokimyasal araştırmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır (Burja, 2001). Bununla beraber akuakültürde yığın kültürü yapılan *Chlorella* hem insanlar ve hem de hayvanlar için değerli bir protein kaynağı, atıkların arıtılması ve biyodizel üretiminde mikro enerji üreticileri olarak biyoteknolojik amaçlar için kullanılmaktadır (Golueke ve Oswald, 1964; Abbolt ve Cheney, 1982). Bizim izolatımızın (AT-2) ait olduğunu düşündüğümüz tür, *C. vulgaris* diğer pek çok yeşil alg gibi genel olarak bir tatlı su türü olarak bilinir. Bu bağlamda Karadeniz bölgesi tatlı sularından da önceden rapor edilmiştir (Baytut ve ark., 2014). Buna karşın bu tür literatür de denizel ekosistemlerden de rapor edilmiştir. Ancak Türkiye denizlerinden böyle bir kayda rastlanmamıştır. Bu bağlamda izolatımız Türkiye denizlerinden izole edilip genetik tanımlaması yapılan ilk *C. vulgaris* izolatıdır.

AT-5 izolatı, 11 Kasım 2015 tarihinde Giresun ili Bulancak ilçesinden ve AT-7 izolatı ise 15 Mayıs 2015 tarihinde Ordu ili Bolaman ilçesi kıyısız alanından alınan DDS örneğinin çoğaltılmasıyla izole edilmişlerdir (Çizelge 4.2). İzolatlar mikroskop altında ortalama 7-12µm çaplı küresel yeşil renkli hücreler biçiminde görülmüştür (Şekil 4.3a, b).

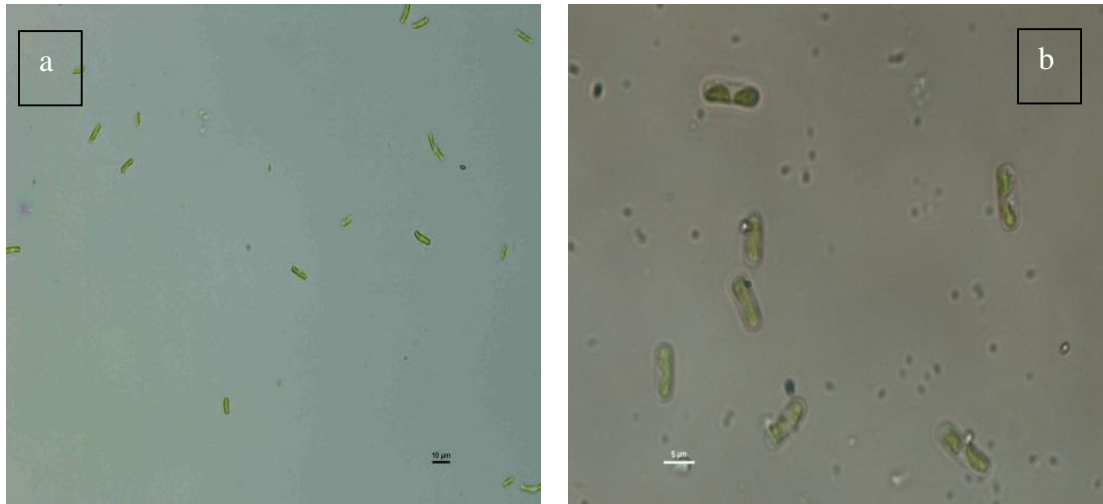


Şekil 4.3. İzole edilen *Coccomyxa parasitica* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a) 10x40, (b)10x100 büyütme

PZR amplifikasyonları ve aynı primer çiftleri kullanılarak yapılan nükleotid dizilemeleri sonucunda izolatların 18S rDNA genine ait ortalama 540 bp'lik kısmı elde edilmiştir. BLAST analizi neticesinde her üç izolatında *Coccomyxa* cinsi ile ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu cinsin izolatımız ile yakın türlerine ait 18S rDNA nükleotid dizileri Gen Bank'tan indirilmiş ve bir veri seti oluşturulmuştur (Çizelge 4.2). Filogenetik analizler 526 adet hizalanmış nükleotid üzerinden yürütülmüştür ve veri seti 112 adet polimorfik bölge içermektedir. AIC ve BIC testleri sırasıyla; TrN+I+G (I: 0.479; G: 0.521) ve TrNef+I+G (I: 0.479; G: 0.52) evrimsel modellerini önermiştir. Bootstrap değeri daha yüksek olduğunda TrN+I+G modeli ile çizilen NJ ağacı bu çalışmada tercih edilmiştir (Şekil 4.2). MP analizleri 58 adet türemiş ortak karakter üzerinden yürütülmüş olup sonuçta 187 basamak uzunluğunda 1 adet (CI: 0.721925; RI: 0.771930; HI: 0.278075) en kısa ağaç elde edilmiştir. Her üç algoritma kullanılarak çizilen ağaçlara ait Bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.2). 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde (Şekil 4.2) her iki izolatında *Coccomyxa* cinsi *C. parasitica* türü ile yakın ilişkili oldukları belirlenmiştir. İzolatlarımız, AT-5 ve AT-7, *C. parasitica* (EU127469) izolatı ile sırasıyla 100%, 100% ve 99,6%'lık nükleotid dizi benzerlikleri göstermiş ve bir soy hattı oluşturmuştur. *Nannochloris bacillaris* türü bu soy hattına en yakın tür olarak belirlenmiştir, bu ilişki NJ, ML ve MP ağaçlarında sırasıyla %79 ve %80'lik Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Bu bilgilere dayanılarak AT-5 ve AT-7 izolatlarının *Coccomyxa parasitica* türüne ait olduğunu

söyleyebiliriz. *Coccomyxa* cinsi; *Chlorophyta* divizyonu, *Trebouxiophyceae* sınıfı, *Trebouxiophyceae* takımı, *Coccomyxaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır ve tip türü *Coccomyxa dispar* Schmidle'dir. Cins ilk olarak Schmidle tarafından tanımlanmıştır ve günümüzde tanımlanmış 30 türü vardır (Schmidle, 1901; Anonim, 2018). *Coccomyxa* cinsi serbest yaşayan planktonik deniz ve tatlı su türleri yanı sıra epifitik ve likenlerle birlikte simbiyotik yaşayan türleri kapsamaktadır (Lamenti, 2000; Lohtander, 2003; Guiry, 2005; Hoshina ve Imamura, 2008). Bizim izolatlarımız ile ilişkili olan *C. parasitica* ilk olarak 1970 yılında Kanada'dan tanımlanmıştır (Naidu ve South, 1970). Daha sonra Baltık denizi ve Arjantin'den de rapor edilmiştir (Nielsen, 1995; Borasso, 2004; Kontula ve Fürhapter, 2012). Yapılan literatür taramasında Türkiye denizlerinden bu türe ait herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Bu surette izolatlarımız Türkiye denizlerinden izole edilip genetik tanımlaması yapılan ilk *Coccomyxa parasitica* izolatlarıdır.

05 Haziran 2015 tarihinde Giresun ili Espiye ilçesi kıyısız alanından alınan DDS örneğinden izole ettiğimiz AT-8 izolatu mikroskop altında yeşil renkli çomak şekilli yaklaşık 6.01 x 14.63 µm boyutunda hücreler olarak görülmüştür (Şekil 4.4a,b).



Şekil 4.4 İzole edilen *Stichococcus deasoni* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a) 10x40, (b) 10x100 büyütme

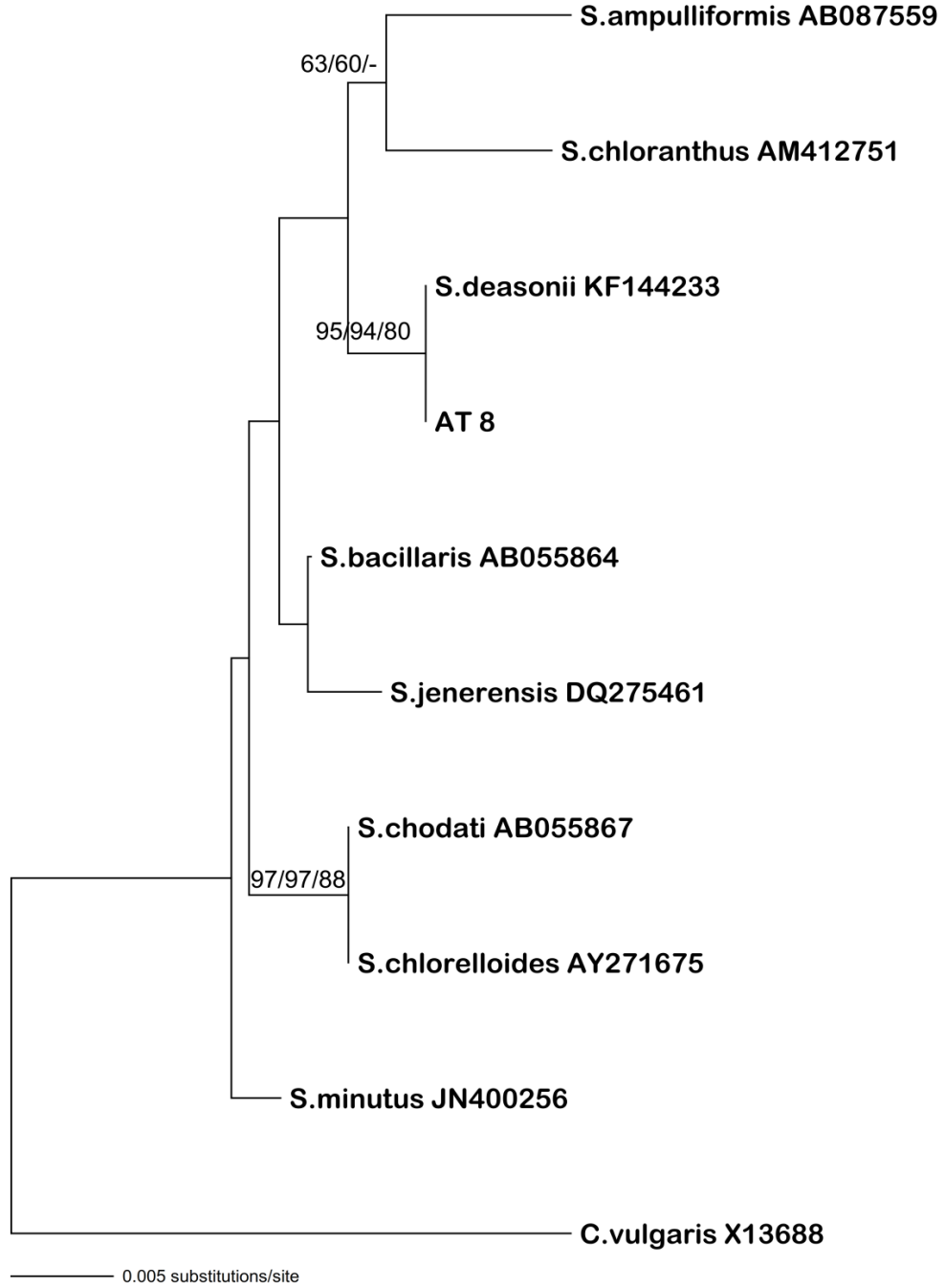
Yapılan PZR amplifikasyonları ve aynı primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleotid dizilemeleri sonucunda izolatuın 18S rDNA genine ait 533 bp'lik kısmı elde edilmiştir. BLAST analizi izolatuın *Stichococcus* cinsine ait olduğunu göstermiştir.

Bu cinsin tüm türlerine ait 18S rDNA nükleotid dizileri GenBank'tan indirilmek suretiyle veri seti oluşturulmuştur (Çizelge 4.3). Filogenetik analizler 37 adet polimorfik bölge içeren 530 adet hizalanmış nükleotid üzerinden yürütülmüştür. AIC ve BIC testlerinin her ikisinde TrNef +G (G: 0.016) evrimsel modelini önermiştir. Şekil 4.4'de bu model kullanılarak çizilen NJ ağacı görülmektedir, ML ve MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri de bu ağaçta ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. MP analizleri 10 adet türemiş ortak karakter üzerinden yürütülmüştür ve sonuçta 44 basamak uzunluğunda 35 adet (CI: 0.863636; RI: 0.739130; HI: 0.136364) en kısa ağaç elde edilmiştir. Her üç algoritma ile çizilen ağaçlarında topolojileri aynı olup izolatomuz ile ilgili aynı filogenetik ilişkileri işaret etmiştir.

Çizelge 4.3 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler

Tür	GenBank Erişim No	Kaynak
<i>Stichococcus ampulliformis</i>	AB087559	Handa ve ark. (2003)
<i>S. chloranthus</i>	AM412751.1	Sluiman ve ark., 2008
<i>S. deasonii</i>	KF144233	Hodac ve ark., Yayınlanmamış
<i>S. bacillaris</i>	AB055864	Hanagata, 2001
<i>S. jenerensis</i>	DQ275461	Neustupa, 2007
<i>S. chodati</i>	AB055867.1	Hanagata, 2001
<i>S. chlorelloides</i>	AY271675.1	Lewis ve Levis, 2005
<i>S. minutus</i>	JN400256	Chen ve ark.,2011, basımda
<i>C. vulgaris</i>	X13688	Huss ve Sogin,1989

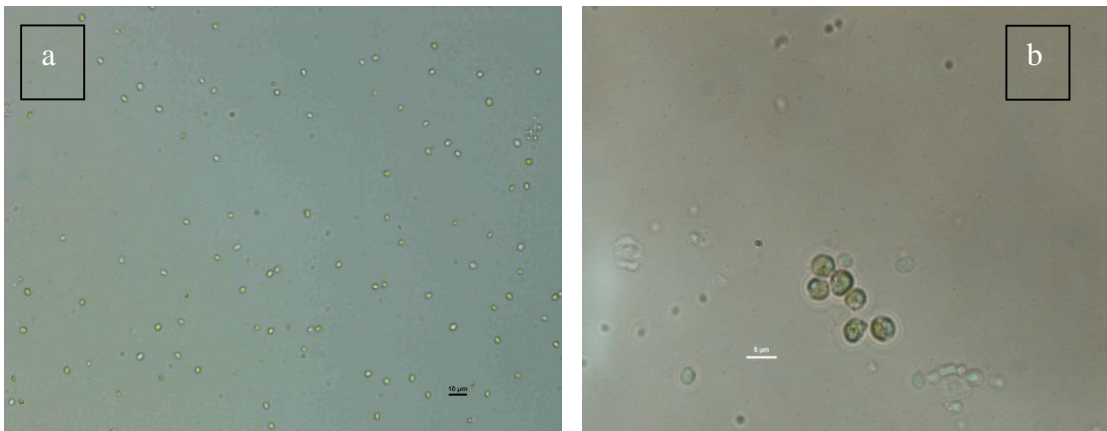
İzolatomuz AT-8'in 18S rDNA nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizleri neticesinde *Stichococcus* Nægeli cinsi içerisinde, *S. deasonii* türü ile ilişkil olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). İzolatomuz AT-8, Almanya'dan tatlı su stramatolitlerinden izole edilmiş WB38 (KF144233; Hodac ve ark., 2015) *S. deasonii* suşu ile aynı 18S rDNA haplotipini göstermiş, ayrıca türün tip suşu olan UTEX 1706 (DQ275460, Neustupa ve ark., 2007) suşu ile de aynı soy hattı içerisinde yer almıştır. Bu ilişki NJ, MP ve ML algoritmaları ile oluşturulan filogenetik ağaçların tümünde gözlenmiş olup hepsinde de yüksek (≥ 80) Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Ayrıca *S. ampulliformis* ve *S. chloranthus* türleri ile birlikte *S. deasonii* ortak bir soy hattı oluşturmuştur. Bu verilere dayanarak AT-8 izolatının *Stichococcus deasonii* türüne ait olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.5 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç TrNef +G (G: 0.016) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Chlorella vulgaris* türü ile köklendirilmiştir

Stichococcus cinsi; Chlorophyta divizyonu, *Trebouxiophyceae* sınıfı, *Prasiolales* takımı, *Prasiolaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır. Cins ilk olarak Nægeli (1849) tarafından tanımlanmıştır ve tip türü *S. bacillaris* Nægeli dir. Günümüzde bu cins içerisinde tanımlanmış 27 tür vardır (Anonim, 2018). *Stichococcus* aynı zamanda *Prasiola* kladı içerisinde yer alan çomak şekilli türlere verilen genel bir isimdir. Bu klad *Trebouxiophyceae* soy hattı içerisinde yer alan ve *Chlorella*, *Pseudochlorella*, *Prasiola*, *Stichococcus* gibi morfolojik açıdan farklı cinslerin içerisinde yer aldığı bir kladdır (Handa ve ark., 2003; Hodac ve ark., 2016). *Stichococcus* türleri tatlı su, deniz, hemen her tipte toprak ve havanın da içerisinde bulunduğu farklı habitatlardan izole edilmiş bir yeşil alg cinsidir. Bu cinsin bazı izolatları arctic koşullar ve hatta Dünya orbitalindeki uzay şartlarında kapsayan multistres şartlarına dahi dayanıklı olabilmektedirler (George, 1957; Handa ve ark., 2003; Scalzi ve ark., 2012). *S. deasonii* ilk olarak Neustupa ve ark., (2007) de tanımlanmıştır. Türkiye de farklı *Stichococcus* türlerine (*S. flaccidus*; *S. subtilis*, *S. bacillaris*) ait raporlar olmasına karşın *S. deasonii* için bir kayda rastlanmamıştır (Ersanlı ve Gönülol, 2003; Aysel, 2005; Ersanlı ve ark., 2006). Bu bağlamda izolatımız AT-8 Türkiye denizlerinden izole edilip genetik tanımlaması yapılan ilk *Stichococcus deasonii* izolatıdır.

AT-9 izolatı, 09 Kasım 2015 tarihinde Trabzon ili Yomra ilçesinden ve AT-11 izolatı ise, 12 Ekim 2015 tarihinde Ordu ili Fatsa ilçesi kıyısal alanlarından alınan DDS örneğinden izole edilmiş ve izolatları mikroskop altında yeşil renkli, küre şeklinde yaklaşık 3-5µm çapında hücreler formunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.6a,b).



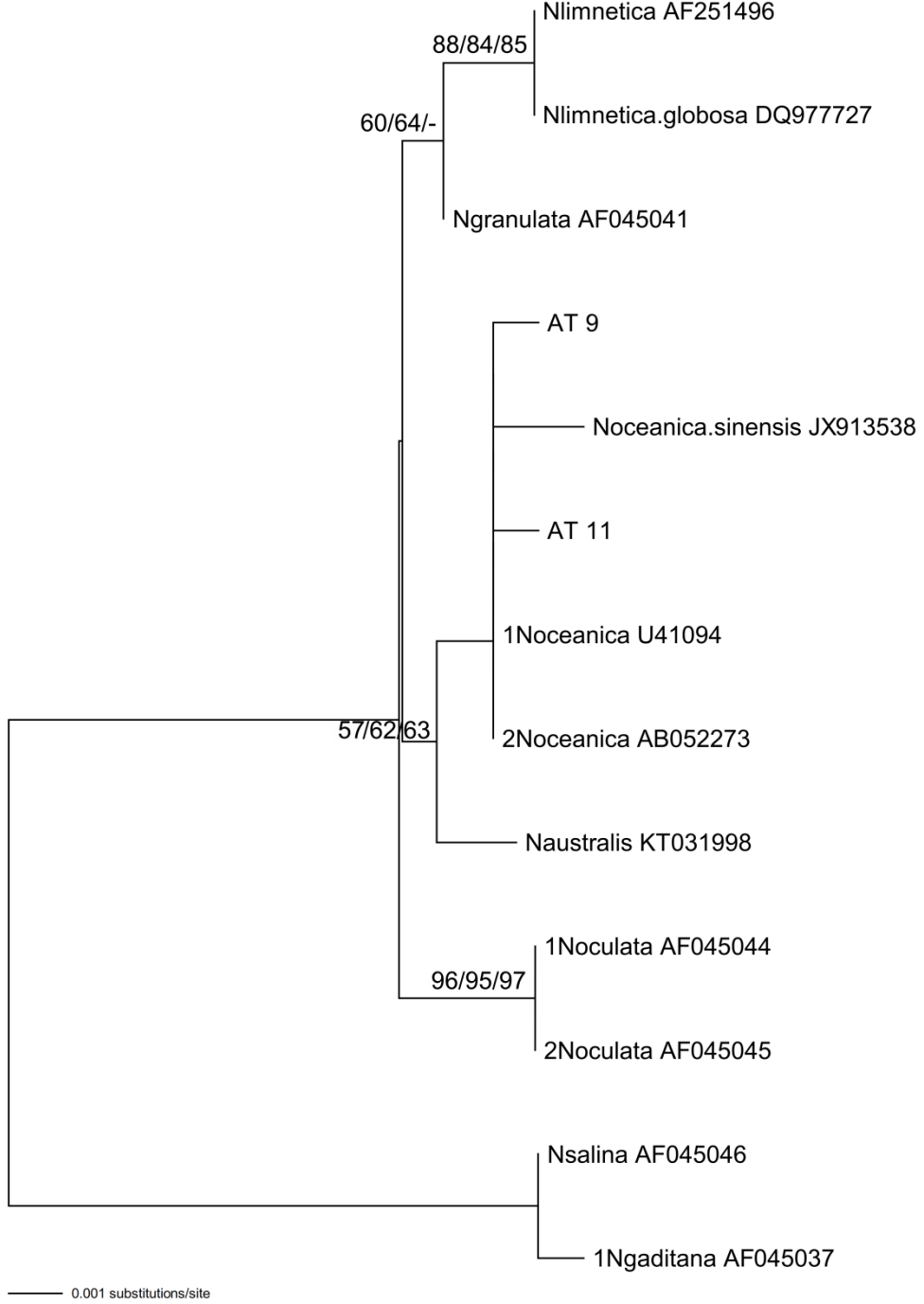
Şekil 4.6 İzole edilen *Nannochloropsis oceanica* izolatına ait mikroskop görüntüsü (a) 10x40 büyütme, (b) 10x100 büyütme

PZR amplifikasyonları ve aynı primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleotid dizilemeleri sonucunda izolatın 18S rDNA genine ait yaklaşık 1180 bp'lik kısmı elde edilmiştir. BLAST sonuçları izolatların *Nannochloropsis* cinsi ile ilişkili olduklarını göstermiştir. *Nannochloropsis* cinsi içerisinde yer alan farklı türlerden bizim izolatlarımıza en yakın türlerin 18S rDNA haplotipleri Gen Bank'tan indirilmiş ve bir veri seti oluşturulmuştur (Çizelge 4.4). Filogenetik analizler 36 adet polimorfik bölge içeren 1147 adet hizalanmış nükleotid üzerinden yürütülmüştür. AIC ve BIC testleri sırasıyla; HKY ve K80 evrimsel modellerini önermiştir. Bu çalışmada K80 modeli ile oluşturulan filogenetik ağaç daha yüksek Bootstrap değerleri verdiği için bu evrimsel model tercih edilmiştir. Şekil 4.7'de K80 evrimsel modeli ile çizilen NJ ağacı verilmiştir. MP analizleri 29 adet türemiş ortak karakter üzerinden ve sonuçta 37 basamak uzunluğunda 1 adet (CI: 0.1; RI: 0.1; HI: 0.0) en kısa ağaç elde edilmiştir. NJ, ML ve MP algoritmaları ile çizilen ağaçların tümünde benzer filogenetik ilişkiler gözlenmiştir. ML ve MP analizlerinde elde edilen Bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.7).

Çizelge 4.4 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere Gen Bank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler.

Tür	GenBank Erişim No	Kaynak
<i>Nannochloropsis limnetica</i>	AF251496	Krienitz ve ark., 2000
<i>N.limnetica globosa</i>	DQ977727	Fawley ve Fawley., 2007
<i>N.granulata</i>	AF045041	Andersen ve ark., 1998
<i>N.maritima</i>	AY680703	Hu ve Xu, yayınlanmamış
<i>N.oceanica sinensis</i>	JX913538	Cao, 2012
<i>N.oceanica</i>	U41094	Andersen ve ark., 1998
<i>N.oceanica</i>	AB052273	Suda ve Miyashita., 2002
<i>N.australis</i>	KT031998	Fawley ve Fawley., 2015
<i>N.oculata</i>	AF045044	Andersen ve sexton., 1998
<i>N.oculata</i>	AF045045	Andersen ve ark., 1998
<i>N.salina</i>	AF045046	Andersen ve ark., 1998
<i>N.gaditana</i>	AF045037	Andersen ve ark., 1998

18S rDNA nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizler neticesinde AT-9 ve AT-11 izolatları *Nannochloropsis* cinsi içerisinde *N. oceanica* türü ile ilişkili çıkmıştır. İzolatlarımız AT-9 ve AT-11 *N. oceanica* izolatları (JX913538, U41094, AB052273) ile %99,7 ve üzerinde nükleotit dizi benzerliği göstermiştir ve ortak bir soy hattı oluşturmuştur. *N. australis* bu soy hattına en yakın tür olarak gözlemlenmiştir.

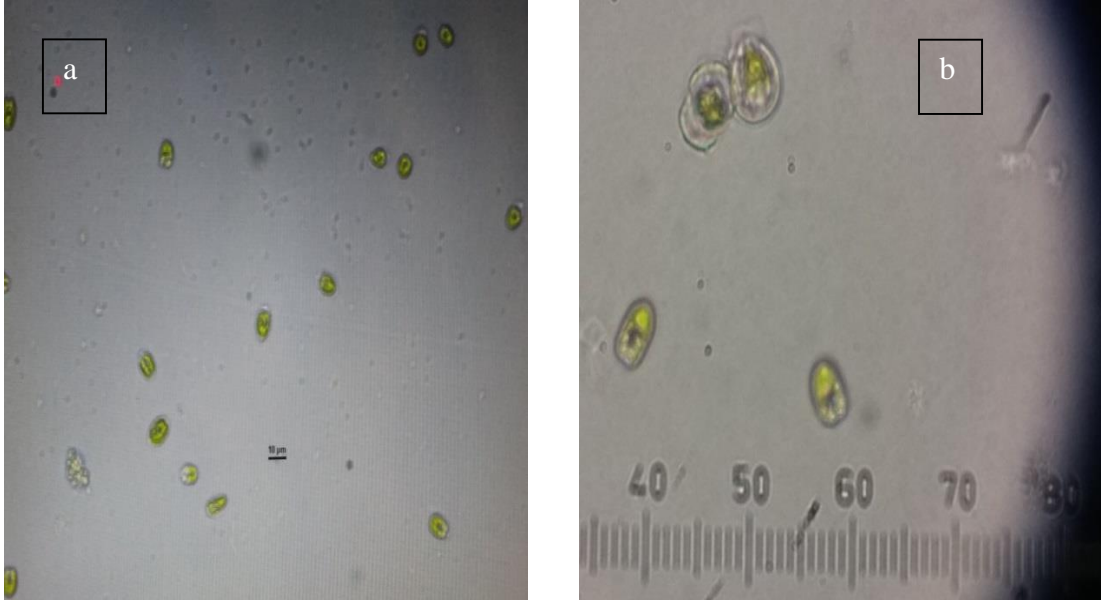


Şekil 4.7 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç K80 evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, ML, MP analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Nannochloropsis salina* ve *N. gaditana* türleri ile köklendirilmiştir

Bu ilişki NJ, ML ve MP ağaçlarında sırasıyla %57, %62 ve %63'lük Bootstrap değerleri ile desteklenmiştir. Bu filogenetik ilişkiler AT-9 ve AT-11 izolatlarının *Nannochloropsis oceanica* türü ile ilişkili olduklarını göstermektedir. *Nannochloropsis* cinsi; Chlorophyta divizyonu, *Eustigmatophyceae* sınıfı, *Eustigmatales* takımı, *Monodopsidaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır. Cins ilk olarak Hibberd ve Leedale, (1970) tarafından olarak tanımlanmıştır ve tip türü *N. oceanica* Suda ve Miyashita, (2002)'dir. Günümüzde bu cins içerisinde tanımlanmış 5 türü vardır (Anonim, 2018). Cins içerisindeki türler tek hücrelidirler, hücre büyüklükleri 2-3 mikrometre olup küresel morfoloji göstermektedir ve kloroplast çeperi sarı-yeşil renktedir (Anita ve Cheng, 1982; Kandilian ve Pilon, 2013). Ülkemizde *Nannochloropsis* cinsi ile çeşitli çalışmalar yapılmasına karşın bu çalışmalar genelde endüstriyel suşların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesine yöneliktir. Bilinen türleri denizel ortamda olmasına rağmen tatlı ve acı sularda da bulunabilmektedir (Fawley, 2007). *Nannochloropsis* türleri hücrelerinde doğal olarak kaliteli ve yüksek miktarlarda yağ biriktirmektedirler. Bu özelliğinden dolayı günümüzde gen manipülasyonlarında yapılarak biyoteknolojide kullanılmaktadır (Vieler ve ark., 2017). *Nannochloropsis* halen akuakültürde hem rotifer kültürleri hemde larva yetiştiriciliğinde ortam düzenleyici ve besin olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca kültürü yapılabilen bu tür fotosentetik organizmalar biodizel üretimi araştırmalarında gün geçtikçe artan bir ilgi görülmektedir. Bunlara ek olarak, *Nannochloropsis* sp., türleri halen insan gıdasına katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Lubian, 1982). Ekonomik önemine karşın bu cinsin ülkemiz denizlerinden kaydına rastlanmamıştır. Bu nedenle izolatlarımız (AT-9 ve AT-11) *Nannochloropsis* cinsi ve *N. oceanica* türü için Türkiye'den ilk kayıtlardır.

05 Haziran 2015 tarihinde Giresun ili Görele ilçesi kıyısal alanından alınan DDS örneğinden izole edilen AT-6 izolatu mikroskop altında yeşil renkli, hareketli, küre şeklinde, yaklaşık 8-16µm çapında hücreler biçiminde gözlemlenmiştir (Şekil 4.8a, b).

Yapılan PZR amplifikasyonları ve aynı primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleotid dizilemeleri sonucunda izolatu 18S rDNA genine ait 1180 bp'lik kısmı elde edilmiştir. BLAST analizi izolatu *Tetraselmis* sp. cinsine ait olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.8 İzole edilen *Tetraselmis* sp. izolatına ait mikroskop görüntüsü 10x40 (a, b)

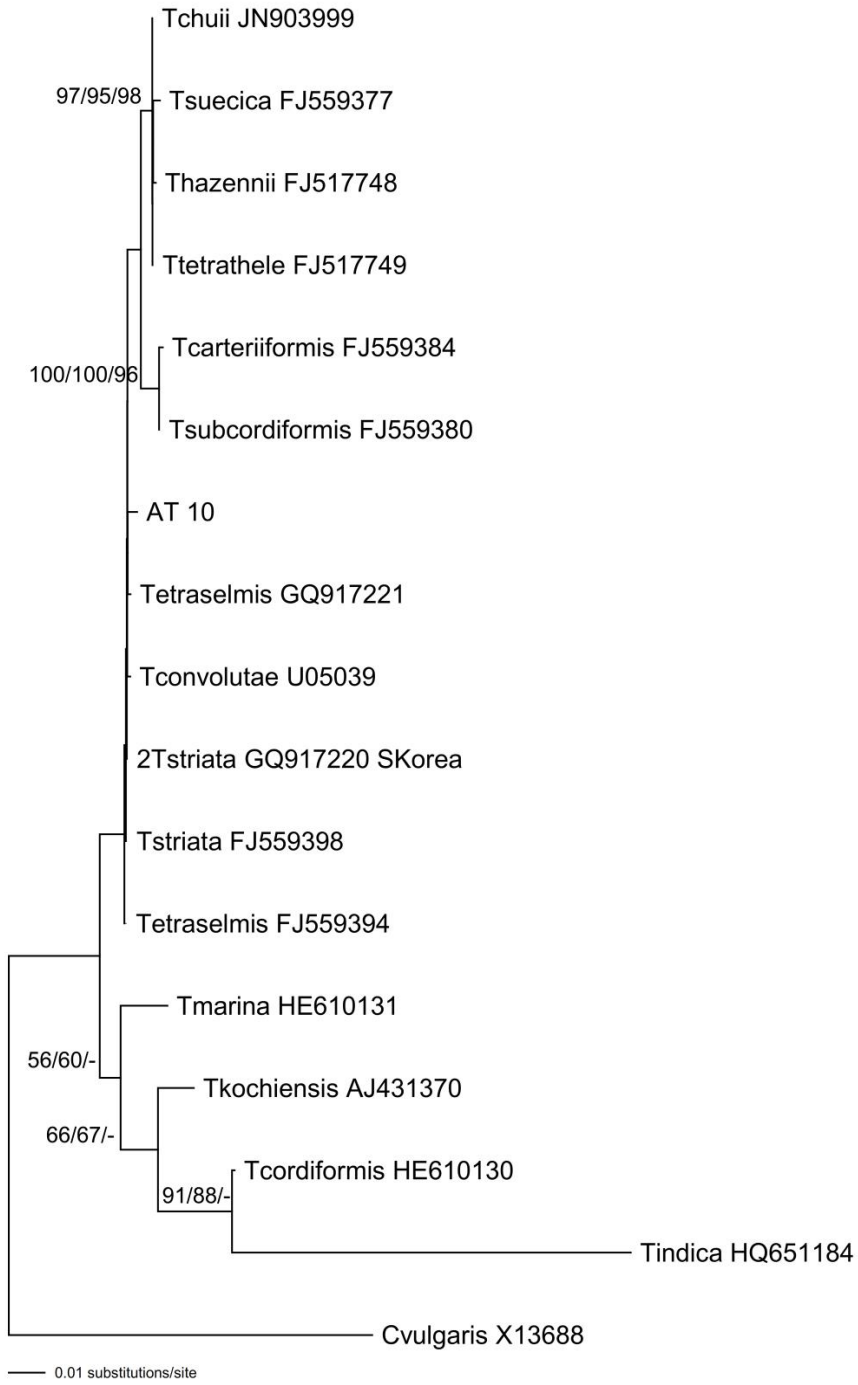
Filogenetik analizler için bu cinsin izolatımız ile ilişkili türlerine ait 18S rDNA nükleotid dizileri Gen Bank'tan indirilmiş ve veri seti oluşturulmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBank'tan indirilen nükleotid dizilerine ait bilgiler

Tür	GenBank Erişim No	Kaynak
<i>Tetraselmis chuii</i>	JN903999	Fulneckova ve ark. 2012
<i>T. suecica</i>	FJ559377	Lee ve Hur, 2008
<i>T. hazennii</i>	FJ517748	Lee ve Hur, 2008
<i>T. tetrathele</i>	FJ517749	Lee ve Hur, 2008
<i>T. carteriiformis</i>	FJ559384	Lee ve Hur, 2008
<i>T. subcordiformis</i>	FJ559380	Lee ve Hur, 2008
<i>Tetraselmis</i> sp.	GQ917221	Lee ve Hur, 2009
<i>T. convolutae</i>	U05039	SKorea
<i>T. striata</i>	GQ917220	De Jesus ve ark.,1994
<i>T. striata</i>	GQ917220	Lee ve Hur, 2009 yayınlanmamış
<i>Tetraselmis</i> sp.	FJ559394	Lee ve Hur, 2008 yayınlanmamış
<i>T. marina</i>	HE610131	Marin, 2012
<i>T. kochienseis</i>	AJ431370	Nasare, 2002, yayınlanmamış
<i>T. cordiformis</i>	HE610130	Arora, 2012. yayınlanmamış
<i>T. indica</i>	HQ651184	Arora,2010.Yayınlanmamış
<i>C. vulgaris</i>	X13688	Huss ve Sogin, 1989

Filogenetik analizler 153 adet polimorfik bölge içeren 1162 adet hizalanmış nükleotid üzerinden yürütülmüştür. AIC ve BIC testleri sırasıyla; HKY+I+G (I: 0.704; G: 0.571) ve K80+I+G (I: 0.707; G: 0.564) evrimsel modellerini önermiştir. Bu çalışmada daha yüksek Bootstrap değerleri verdiği için HKY+I+G modeli ile çizilmiş NJ ağacı tercih edilmiştir (Şekil 4.9). MP analizleri 58 adet türemiş ortak

karakter üzerinden yürütülmüştür. Analizler sonucunda 228 basamak uzunluğunda 1 adet (CI: 0,820175; RI: 0,702899; HI: 0,179825) en kısa ağaç elde edilmiştir. NJ, ML ve MP analizleri neticesinde benzer filogenetik ilişkiler gözlenmiş olup ML ve MP analizlerinde elde edilen Bootstrap değerleri NJ ağacı üzerinde ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. 18S rDNA nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizler neticesinde izolatanın *Tetraselmis* cinsi içerisinde *T. convolutae*, *T. striata* soy hattı içerisinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). İzolatımız AT-10, *T. striata* izolatları ile %99,7 ve *T. convolutae* izolatları ile %99,6 oranında nükleotit dizi benzerlikleri göstermiştir. Bu sonuçlara dayanılarak AT-10 izolatanın *T. convolutae*, *T. striata* türlerinden birisine ait olduğunu söyleyebiliriz. *Tetraselmis* cinsi, Chlorophyta divizyonu, *Chlorodendrophyceae* sınıfı, *Chlorodendrales* takımı, *Chlorodendraceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır. Cins ilk olarak F. von Stein tarafından tanımlanmıştır (Stein, 1878). Cinsin tip türü *T. cordiformis stein*'dir ve günümüzde 33 tür ile temsil edilmektedir (Anonim, 2018). Bu cinsin türleri yüksek protein ve lipid içeriği nedeni ile endüstriyel amaçlı olarak yaygın biçimde kullanılmaktadırlar (Alonso ve ark., 2012). Bu cinsin türleri ile ilgi olarak yurdumuzda ticari bazı suşların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Buna karşın Türkiye denizlerinden bu cinse ait herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Bu nedenle AT-10 izolatu Türkiye denizlerinden izole edilip genetik tanımlaması yapılan ilk *Tetraselmis* sp. izolatıdır.



Şekil 4.9 18S rDNA nükleotid dizileri kullanılarak çizilen NJ filogenetik ağacı. Ağaç HKY+I+G (I: 0.704; G: 0.571) evrimsel modeli kullanılarak çizilmiştir. NJ, MP, ML analizlerinden elde edilen Bootstrap değerleri aynı sıra ile ilgili düğüm üzerinde gösterilmiştir. Ağaç *Chlorella vulgaris* türü ile köklendirilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında Trabzon, Giresun, Rize ve Ordu illeri kıyılarından izole edilen toplam 8 adet alg izolatının moleküler yöntemler kullanılarak teşhisleri amaçlanmıştır. Örneklerin biri tanesi hariç tümü ışık mikroskobu altında küresel ve yeşil pigmentli hücreler olarak gözlemlenmiştir, buna karşın bir tanesi ise çubuk formunda ve yeşil pigmentli hücreler olarak görülmüştür. Morfolojik veriler ışığında bu örneklerin tümünün *Chlorophyta* divisiosuna ait algler oldukları sonucuna varılmıştır. Mikroskobik yeşil algler birkaç mikrometre çapında ve genellikle tek hücreli canlılar olduklarından sınıflandırılmaları sadece birkaç morfolojik karaktere dayanmaktadır. Bu nedenle sınıflandırılmaları genel olarak doğal akrabalık ilişkilerini yansıtmayabilir. Son yıllarda pek çok organizma grubunda olduğu gibi belirli gen bölgelerinin nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizler alglerde de uygulanmaktadır. Bu yaklaşım alglerin teşhislerinde, sınıflandırılmalarında ve alg grupları arasındaki doğal akrabalık ilişkilerinin ortaya konulmasında önemli yenilikler getirmiştir. Bizde bu nedenle çalışmamızda moleküler genetik yaklaşımları kullandık ve genetik markör olarak yaygın biçimde kullanılan bölgelerden birisi olan 18S rDNA bölgesini seçtik. Bu bölge hem taksonları belirli bir hiyerarşik düzende gruplayacak kadar benzer yani korunmuş bölgeler, hem de yakın türleri ayıracak kadar varyasyon içerdiğinden filogenetik çalışmalar için çok uygundur. Ayrıca Gen Bank içerisinde pek çok alg türüne ait 18S rDNA haplotipi hali hazırda bulunmaktadır, bu durum bir genetik markör için çok önemlidir. Zira elde edilen yeni 18S rDNA haplotipleri mevcut haplotipler ile karşılaştırılabilir. Bu yolla teşhisler ve filocoğrafik çıkarımlar yapılabilir. 18S rDNA bölgesinin nükleotid dizilerine dayalı olarak yapılan filogenetik analizler sonucunda AT-2 izolatımız *Chlorella vulgaris* türü ile ilişkili çıkmıştır. Bu tür her ne kadar bölgemizden daha önceki çalışmalarda rapor edilmişse de denizel ekosistemden ilk kez izole edilmiş ve moleküler olarak teşhis edilmiştir. İlerleyen aşamalarda bu izolatın kloroplast 16S rDNA'sı gibi ekstra gen bölgeleri çalışılarak elde edilen sonuçlar doğrulanacaktır. Ayrıca bu tür ekonomik olarak önem arz etmektedir bu nedenle bölgemizden izole edilmiş ve moleküler olarak tanımlanmış bu örneğin endüstriyel olarak kullanım potansiyeli araştırılmalıdır. Örneklerimizden iki tanesi AT-5, ve AT-7 *Coccomyxa parasitica* türü ile ilişkili çıkmıştır. Bu üç izolat

denizlerimizden bu türe ait ilk kayıtlardır. Bu tür deniz omurgasızları ve balıklarda parazitik bir tür olması nedeni ile oldukça önemlidir. İlerleyen aşamada farklı gen bölgeleri kullanılarak türün filocoğrafik dağılımı ve kökeni ile ilgili araştırmalar yapılmalıdır. Bu şekilde ekolojisi daha detaylı biçimde ortaya konmalıdır. Diğer bir örneğimiz AT-8, *Stichococcus deasonii* türü ile ilişkili çıkmıştır. İzolat Türkiye denizlerinden izole edilip genetik tanımlaması yapılan ilk *S. deasonii* örneğidir. Bu cinse ait bazı izolatlar ekstrem şartlara karşı dayanıklı olmaları nedeni ile oldukça ilginçtir. Elde ettiğimiz izolat ilerleyen aşamalarda stres şartlarına karşı dayanıklılığı bakımından fizyolojik olarak incelenmeli ve bu özelliklerin kullanım olanakları yönünden potansiyeli araştırılmalıdır. Diğer iki izolatımız AT-9 ve AT-11 *Nannochloropsis oceanica* türü içerisinde yer almıştır. Bu iki izolat bu cinsin ve türün Türkiye'den ilk kayıtlardır. Bu tür biyodizel üretimi, akuakültür ve gıda sektörlerinde kullanıldığından ekonomik olarak çok önemlidir. İlerleyen aşamalarda bu izolatlar belirtilen sektörlerdeki kullanım potansiyelleri açısından araştırılmalıdır. AT-10 izolatı *Tetraselmis* cinsi içerisinde *T. convolutae*-*T. striata* soy hattında yer almıştır. İzolat bu cinsin Türkiye'den ilk kayıtdır. 18S rDNA gen bölgesi izolatın bu iki türden hangisine ait olduğu bilgisini vermekte yetersiz kaldığından ilerleyen aşamalarda ekstra gen bölgeleri kullanılarak daha detaylı araştırmalar yapılmalı ve izolatın hangi türe ait olduğu belirlenmelidir.

Bu çalışmada denizlerimizden 4 farklı türe ait ilk kayıtlar verilmiştir. Bu türlerden bazıları endüstriyel olarak önemli olan türler olduğundan ekonomik potansiyelleri araştırılmak suretiyle ülke ekonomisi için katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbott, I. A. & Cheney, D. P. (1982). Commercial uses of algal products: introduction and bibliography. *Phycological Society of America*, 5, 779–787.
- Alonso, M. Lago, F. C., Vieites, J. M., & Espiñeira, M. (2012). Molecular characterization of microalgae used in aquaculture with biotechnology potential. *Aquaculture International*. 20, 847-857.
- Andersen, R. A. & Brett, R. W. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18s rDNA, with emphasis on Nannochloropsis. *Protist*, 149(1), 61–74.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier science press, San Diego, Kaliforniya, U.S.A, 596 p.
- Ağırbaş, E. (2016). Fitoplankton pigment konsantrasyonunun ve boy gruplarının HPLC tekniği ile belirlenmesi (Güneydoğu Karadeniz, Rize). *Yunus Araştırma Bülteni*, (2), 81-90.
- Alexandrov, B. G., & Zaitsev, Yu. P. (2003). Black Sea biodiversity in eutrophication conditions, in Conservation of the biological diversity as a prerequisite for sustainable development in the Black Sea region. Electronic conference on Marine biodiversity in the Mediterranean and the Black Sea, 7-20 April, Oostende, Belgium.
- Anonim, (2001). The Black Sea environment. <http://www.blacksea-environment.org> (Erişim tarihi:11.03.2017).
- Anonim, (2017). Zooplankton Vs. Phytoplankton. <https://biologywise.com/zooplankton-vs-phytoplankton> (Erişim tarihi: 24.04.2018).
- Anonim,(2018).Algaebase.http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=gd1326c15cc1d6202&sk=0&from=results (Erşim Tarihi: 04.03.2018).
- Ataç, Ü., Aktaş, M., Yıldırım, C., Alemdağ, N., Zengin, B. & Alkan, A. (1997). Karadeniz bölgesinde su kirliliğine sebep olan faktörlerin belirlenmesi ve su ürünlerine etkilerinin araştırılması. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, TAGEM/IV/96/12/02/00 nolu Proje Kesin Raporu, Trabzon, Türkiye.
- Aysel., V. (2005). Check-List of The Freshwater Algae of Turkey Türkiye Tatlı Su Alglerinin Kontrol Listesi. *Journal of the Black Sea/ Mediterranean Environment*, 11(1),124-127.
- Baker, T. T. & Timmons, L. S. (1991). Precision of ages estimated from five bony structures of arctic char (*Salvelinus alpinus*) from the wood river system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1007-1014.
- Balkıs, N. (2003). Seasonal variations in the phytoplankton and nutrient dynamics in the neritic water of Büyük çekmece Bay, Sea of Marmara. *Journal of Plankton research*, 25(7), 703-717.
- Bargu, S., Koray, T. & Lundholm, N. (2002). First Report of Pseudo-nitzschia calliantha Lundholm, Moestrup & Hasle 2003, a New Potentially Toxic

- Species from Turkish Coasts. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(3-4), 479-483.
- Bat, L., Sahin, F., Ustun, F., Kideys, A. E., & Satilmis, H. H. (2007). The qualitative and quantitative distribution in phytoplankton and zooplankton of southern Black Sea of cape Sinop, Turkey in 1999-2000. Conference on OCEANS 2007-Europa, 18-21 June, Aberdeen, England.
- Bat, L., Sahin, F., Satılmış, H. H., Üstün, F., Özdemir, Z. B., Kıdeyş, A. E., & Shulman, G. E. (2007). Karadeniz'in değişen ekosistemi ve hamsi balıkçılığına etkisi. *Journal of Fisheries and Sciences*, 1(4), 191-227.
- Bat, L., Sezgin, M., Hasan H. Satilmis, H. H., Sahin, F., Üstün, F., Özdemir, B. Z., & Baki, O. G. (2011). Biological diversity of the Turkish Black Sea coast. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 683-692.
- Baytut, Ö. (2010). Kızılırmak Nehir ağzı Fitoplanktonu ve Nutrientlerle Etkileşimleri, Doktora tezi, 19 Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
- Baytut, O., Gonulol, A., & Koray, T. (2005). New records for marine phytoplankton of Turkish seas from southern Black Sea coasts. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22 (1-2), 229-231.
- Baytut, O., Gonulol, A., & Koray, T. (2007). Phytoplankton blooms in Samsun Bay of the southern Black Sea. *The Mediterranean Science Commission*, 24, 38-41.
- Baytut, O., Gonulol, A., & Moestrup, O. (2008). *Skeletonema costatum*-like diatoms from the Black Sea Synthesys. Fp6-Eu-DK-5135 nolu proje Kesin Raporu, Denmark.
- Baytut, O., Gonulol, A., & Koray, T. (2010). Temporal variation of phytoplankton in relation to eutrophication in Samsun bay, Southern Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10, 363-372.
- Baytut, O., Gürkanlı, C. T., Özkoç, İ., & Gönülol, A. (2014). Molecular phylogeny of *Chlorella*-related chlorophytes (Chlorophyta) from Anatolian freshwaters of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 38, 600-607.
- Baytut, O., Gönülol, A., & Koray, T. (2010). Seasonal variations of phytoplankton in relation to eutrophication in Samsun Bay, Southern Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries Sciences*, 10, 3.
- Belkız, N. (2003). Seasonal variations in the phytoplankton and nutrient Dynamics in the neritic water of Büyükçekmece bay, Sea of Marmara. *Journal of Plankton Research*, 25(7), 703-717.
- Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V., & Lee, R. (2008). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (*bacillariophyta*) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae*, 7, 438-442.
- Bologa, A. S., Bodeanu, N., Petran, A., Tiganus, V., & Zaitsev, Y. P. (1995). Bulletin del'Institut oceanographique, Monaco [https://archive.org/details/bulletindumuseo01mongoog-\(Erişim_tarihi:02.11.2017\)](https://archive.org/details/bulletindumuseo01mongoog-(Erişim_tarihi:02.11.2017)).

- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., & Richmond, A. (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga, *Nannochloropsis salina*, *Elsevier*, 12(1), 37-47.
- Burja, A. M., Tamagnini, P., Bustard, M. T., & Wright, P. C. (2001). Identification of the green alga, *Chlorella vulgaris* (SDC1) Using *Cyanobacteria* derived 16S rDNA primers: targeting the chloroplast. *FEMS Microbiol Letters*, 202, 195–203.
- Cao, S, Zhang, X., Fan, X., Qiao, H., Liang, C., Xu, D., Mou, S., Wang, W., & Ye, N. (2013). Phylogeny and characterisation of *Nannochloropsis oceanica* var. (*Eustigmatophyceae*), a new oleaginous alga from China. *Phycologia*, 52(6), 573-577.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcao, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. *Toxicology and Pharmacology*, 146 (1-2), 60-78.
- Chenrick, P., & Crane, P. R. (1997) The origine and early diversitification of land plants. A cladistic study. *In Nature*, 389, 33-39.
- Chen, Z., He, C., & Hu, H. (2012). Temperature responses of growth, photosynthesis, fatty acid and nitrate reductase in Antarctic and temperate *Stichococcus Extremophiles*. *Springer*, 16(1), 127-133.
- Cirik, S. & Gökpinar, Ş. (1993). Plankton Bilgisi ve Kültürü, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir, 274 s.
- Çiftci, Y., Üstündağ, C., Erteken, A., Özongun, M., Ceylan, B., Haşimoğlu, A., Güneş, E., Yoseda, K., Sakamoto, F., Nezaki, G. & Hara, S. (2002). Karadeniz’de Kalkan Balığı (*Psetta maxima*) Yavru Üretim Tekniği. Kalkan Balığı Üretim El Kitabı, Trabzon, 80s.
- De-Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresour. Technology*, 99 (11), 4980-4989.
- Develi, E. E., & Kideys, E. A. (2003). Distribution of phytoplankton in the southern Black Sea in summer 1996, spring and autumn 1998. *Journal of Marine Systems*, 39, 203–211.
- Develi, E. E., & Velikova, V. (2009). New record of a dinoflagellate species, *Lessardia elongata* in the Black Sea. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2, 104.
- Dorigo, M., & Blom, C., (2005). Colony optimization theory: A survey. *Elsevier, theoretical computer Science*, 344, 243-278.
- Oguz, T. (2007). State of Phytoplankton. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Deniz bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin, Türkiye.

- Eker., E. (1998). Abundance and biomass of micro and nanophytoplankton in the Northwestern and Southern Black Sea. Yüksek Lisans Tezi, Deniz Bilimleri Enstitüsü, İçel, Türkiye.
- Eker, E., Georgieva, L., Senichkina, L., & Kideys, A. E. (1999). Phytoplankton distribution in the Western and Eastern Black Sea in spring and autumn, 1995. ICES. *Journal of Marine Science*, 56, 15-22.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305, 354-360.
- Fawley, A. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*), with descriptions of new taxa. *Protist*, 158, 325–336.
- Fawley, M. W., Jameson, I. & Fawley, K. P. (2015). The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (*Monodopsidaceae*, *Eustigmatophyceae*), with descriptions of *N. australis* sp. nov. And *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia*, 54 (5), 545-552.
- Feyzioğlu, A. M. (1990). Doğu karadeniz fitoplankton türlerinin kalitatif ve kantitatif araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon, Türkiye.
- Feyzioğlu, A. M. (1996). Doğu Karadeniz Kıyusal Ekosisteminde Fitoplankton Dinamiğindeki Mevsimsel Değişimler. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilimdalı, Trabzon, Türkiye.
- Feyzioğlu, A. M., & Seyhan, K. (2007). Güneydoğu Karadeniz sahillerinin fitoplankton Kompozisyonu. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 13, 61-71.
- Feyzioğlu, A. M., & Ögüt, H. (2006). Red tide observations along the eastern Black Sea coast of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 30, 375 -379.
- Forney, D. S. (2004) Introduction to entertainment media. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ss.137-\(Erişim tarihi: 02.05.2016\)](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ss.137-(Erişim tarihi: 02.05.2016)).
- Friedl, T., & O'Kelly, C. J. (2001). Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila*. *European. Journal of Phycology*, 37, 373-384.
- Geldiay, R., & Kocataş, A. (1998). Deniz Biyolojisi, Pelikan kitapevi, 9.baskı
- George., E. (1957) A note on *Stichococcus bacillaris* Neag and some species of *Chlorella* as marine algae. *Journal of the Marine Biological Asociacion of the United Kingdom*, 36(1), 111-114.
- Golueke, C. G., & Oswald, W. J. (1964). Role of plants in closed systems. *Plant sciences journal*, 15, 387–408.
- Gomez, F., & Boicenco, L. (2004). An annotated checklist of dinoflagellates in the Black Sea. *Hydrobiologia*, 517, 43-59.

- Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2009). *Algae* (2nd edition). San Francisco, Pearson Education.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2008). *Stichococcus*. Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48, 1057–1063.
- Hanagata, N. (2001). 18S rDNA gene of *Stichococcus*. *Phycologia*, 43(6), 641-652.
- Handa, S., Nakahara, M., & Tsubota, H. (2003). A new aerial alga, *Stichococcus ampulliformis* sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta) from Japan. *Phycology*, 51, 203–210.
- Hepperle, D., Hegewald, E. & Krienitz, L. (2000). Phylogenetic Position of *Oocystaceae* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36 (3), 590-595.
- Hibberd, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym *Xanthophyceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82, 93–119.
- Huss, V. A., & Sogin, M. L. (1989). Primary structure of the *Chlorella vulgaris* small subunit ribosomal RNA coding region. *Nucleic Acids Resources*, 17(3), 1255-1257.
- Huss, V. A. & Sogin, M. L. (1990). Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the *chlorococcales* based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 31 (5), 432-442.
- Huss, V. A. R., Holweg, C., Seidel, B., Reich, V., Rahat, M. & Kessler, E. (1993). There is an ecological basis for host/symbiont specificity in *Chlorella*/Hydra symbioses. *Endocytobiosis Cell Research*, 10, 35-46.
- John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J. (2002). *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Cambridge.UK.
- Kandilian, R. Lee, E. & Pilon, L. (2013). Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresource Technology*, 137, 63–73.
- Karaçam, H. & Düzgüneş, E. (1990). A study on the phytoplankton of Trabzon coasts. *Journal of Aquatic Products*, 4 (1), 95-102.
- Kenrick, P. & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389, 33-39.
- Keesoo, L., Megan, L., Eisterhold, F. R., Swaminathan, P., & Paul, K. N. (2014). Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the Midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural science, Biology and medicine*, 5 (2), 333–339.
- Komarek, J., Kastovsky, J., Mares, J., & Johansen, J. R. (2014) Taksonomik classification of cyanoprocaryotes (Cyanobacterial genera), using a polyhasis approach. *Preslia*, 86, 295-335.

- Koray, T. (2002). Güney Karadeniz' deki (Sinop Körfezi) Fitoplankton Tür Süksesyonu ve Nutrientler. *Turk Journal of Botanic*, 26, 235-252.
- Krakhmalny, A., Bryantseva, Y., Velikova, V., Sergeeva, O., Skuratova, K., & Dereziuk, N. (2012). Black Sea Dinoflagellata (History of the Research and Current Biodiversity). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 539-546.
- Krienitz, L., Huss, V. A. R. & Huemmer, C. (1996). Picoplanktonic Choricystis-species (*Chlorococcales*, Chlorophyta) and the misconception of 'Nannochloris-like algae. *Phycologia*. 35, 332-341.
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H. B. & Weiler, W. (2000). *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia*, 39, 219-227.
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T. & Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, b Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43 (5), 529-542.
- Krienitz, L., & Bock, C. (2012). Present state of the systematik of Planctonic coccoid green algae of inland waters, *Hydrobiologia*, 698, 295-326.
- Laing, I. (1991). Cultivation of marine unicellular algae, Ministry of Agriculture, Fisheries and food directorate of fisheries research, laboratory leaflet, Lawestoft, 6731p.
- Leliaert, F., D. R., Smith, H., Moreau, M. D., Herron, H., Verbruggen, C. F., Delwiche & Clerck, O. D. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews. in Plant Sciences*. 31, 1-46.
- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., & Nam P, K. (2014). Isolation and screening of microalgae from natural habitats in the midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *Journal of Natural science, Biology and medicine*, 5(2), 333-339.
- Lewis, L. A., & Lewis, P. O. (2005). Unearthing the Molecular Phylodiversity of Desert Soil Green Algae (Chlorophyta). *Syst. Biol.* 54 (6), 936-947.
- Lubian, L. M. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp., a new *Eustigmatophyceae* marina strain. *Journal of Applied Phycology*, 4, 287-293.
- Lubian, L. M. (2000). *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12, 249-255.
- Marin, B. (2012). Nested in the *Chlorellales* or independent class? Phylogeny and classification of the *Pedinophyceae* (*Viridiplantae*) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 163 (5), 778-805.
- Mikaelyan, A. S., Pautova, L. A., Pogosyan, S. I., & Sukhanova, I. N. (2005). Summer Bloom of *Coccolithophoridsin* in the Northeastern Black Sea. *Oceanology*, 45(1), 127-138.
- Moncheva, O. S., Skretasb, G., Pagoub, K., & Krasteva, A. (2001). Phytoplankton blooms in Black Sea and Mediterranean coastal ecosystems subjected to

- anthropogenic eutrophication: similarities and differences. *Coastal and Shelf Science*, 53, 281–295.
- Morton, S. L., Vershinin, A., Smith, L. L., Leighfield, T. A., Pankov, S., & Quilliam, M. A. (2009). Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity. *Elsevier*, 8, 629–636.
- Mousing, E. A., Andersen, T. J., & Ellegaard, M. (2013). Changes in the Abundance and species composition of phytoplankton in the Last 150 Years in the Southern Black Sea. *Coastal and Estuarine Research Federation*, 36, 1206–1218.
- Nesterova, D. A. (2003). Phytoplankton of the Black Sea, geological past, geographic distribution of species and influence of the river flow. *International Journal on Algae*, 5(3), 1-21.
- Nesterova, D. A. (2003). Results and prospects for studies phytoplankton in the northwestern Black Sea. *Ecologiya morya*, 63, 53–59.
- Nesterova, D., Moncheva, S., Mikaelyan, A., Vershinin, A., Akatov, V., Boicenco, L., Aktan, Y., Sahin, F., & Gvarishvili, T. (2008). State of Phytoplankton. In BSC, 2008. State of the Environment of the Black Sea (2001-2006/7). *Black Sea Commission Publications*, İstanbul, 3, 419 s,
- Neustupa, J., Eliaš, M., & Šejnohova, L., (2007). A taxonomic study of two *Stichococcus* (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta) species with a starch-enveloped pyrenoid. *Nova Hedwigia*, 84, 51-63.
- Norton, T.A., Melkonian, M., & Andersen, R. A., (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35 (4), 308-326.
- O'Kelly, C. J. (2007). The origin and early evolution of green plants, Evolution of primary producers in the sea, Ed. Falkowski, P. G., Knoll, A. H., Elsevier Boston, England, 287-309.
- Özdemir, G. P., & Ak, O. (2012). Güneydoğu Karadeniz'de (Trabzon Kıyıları) fitoplanktonun kalitatif ve kantitatif değişimi. *Yunus Araştırma Bülteni*, (4), 13-25.
- Parvin, M., Zannat, M. N., & Habib, M. A. B. (2007). Two important techniques for isolation of microalgae. *Asian Fisheries Science*, 20, 117-124.
- Pereira, J. (2009). Yap4 PKA-and GSK3-dependent phosphorylation affects its stability but not its nuclear localization. *Yeast*, 26(12), 641-53.
- Petranu, A., Apas, M., Bodeanu, N., Bologa, A. S., Dumitrache, C., Moldoveanu, M., Radu, G., & Tiganus, V. (1999). Status and evolution of the Romanian Black Sea coastal ecosystem, Environmental Degradation of the Black Sea: Challenges and Remedies, Ed. Beşiktepe, S., Unluata, U, Bologa, A. S. (Eds.), Environmental security-56, Kluwer, Netherlands, 175-195.
- Petrova, D., & Gerdzhikov, D. (2015). Phytoplankton taxonomy in the Bulgarian coastal waters (2008–2010). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 90–9

- Phang, S. M., & W. L. Chu. (1999). Algae culture collection, catalogue of strains. institute of post graduate studies and research, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia. 77 p.
- Rowan, R., & Powers, A. D., (1991). Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (*Zooxanthellae*). *Marine Ecology Progress Series*, 71, 65-73.
- Scalzi, G., Selbmann. L., & Zucconi, L., (2012). Isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Origins of Life Evolution*, 42, 253–262.
- Short, D. P., Double, M., Nuss, D. L., Stauder, C. M., MacDonald, W., & Kasson, M. T. (2015). Multilocus PCR Assays Elucidate Vegetative Incompatibility Gene Profiles of *Cryphonectria parasitica* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5736-42.
- Sorokin, Y. I. (1983). The Black Sea, In *Estuaries and Enclosed Seas, Ecosystems of the World*. Elsevier, 253-292.
- Sorokin, Y. I. (2002). *Black Sea Ecology and Oceanography*. Amsterdam: Backhuys Publishers, 621 p.
- Suda, S., Astumi, M. & Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N.oceanica* sp. nov. (*Eustigmatophyceae*) *Phycologia*, 41, 273-279.
- Sukenik, A. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology*. 25(4), 686–692.
- Sluiman, H. J., Guihal, C., & Mudimu, O. (2008). Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in klebsormidiales (streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and its secondary structure models in klebsormidium, hormidiella, and entransia(1). *Journal of Phycology*, 44 (1), 183-195.
- Taş, S., & Okuş, E, (2006). Karadeniz'in Türkiye kıyılarında fitoplanktonun kalitatif olarak incelenmesi ve tür listesi, *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 12, 181-191.
- Tringe S. G. (2008). A renaissance for the Pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 442-6.
- Türkoğlu, M. (1999). Some fluctuations in phytoplankton community structures of the Black Sea. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16 (1-2), 201-217.
- Türkoglu, M., & Koray, T. (2002). Species succession and diversity of phytoplankton in the neritic waters of southern black sea (The bay of Sinop, Turkey). *Turkish Journal Botany*, 26, 235-252.
- Türkoglu, M., & Koray, T. (2004). Algal blooms in surface waters of the sinop Bay in the Black sea, Turkey. *Pakistan Journal of Biological science*,7(9), 1577-1585.
- Ustinova, I., Krienitz, L., & Huss, V. A. R. (2001). *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri*

- Fott et Novakova (Chlorophyta, *Trebouxiophyceae*). *European Journal of Phycology*, 36, 341-351.
- Uysal, Z. (1987). Fate and distribution of plankton around the Bosphorus. South-westren Black Sea, Bosphorus, Golden Horn, North- Eastern Marmara and Bay of İzmit. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Temel Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.
- Uysal, Z. (2000). Pigments, size and distribution of *Synechococcus* spp. in the Black Sea. *Journal of Marine Systems*, 24(3), 313-326.
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2015). Marine microalgae biotechnology: present trends and future advances. *Elsevier*, 3, 1-9
- Vershinin, A., Moruchkov, A., Leighfield, T., Sukhanova, I., Morton, S., Pankov, S., & Ramsdell, J. (2005). Species composition and potentially toxic algae of Northeast Black Sea coastal phytoplankton in 2000-2002. *Oceanology*, 45, 224-232.
- Vershinin, A. O., & Orlova, T. Y. (2008). Toxic and Harmful Algae in the Coastal Waters of Russia. *Oceanology*, 48(4), 524–537.
- Vieler, A., Wu, G., Tsai, C. H., Bullard, B., & Cornish, A. J. (2012). Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of pgen*, 8(11), 65-69.
- Yamamoto, M., Nozaki, H. & Kawano, S. (2003). Relationship between presence of a mother cell wall and speciation in the unicellular microalga *Nannochloris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 39, 172-184.
- Yasakova, O. N. (2011). New Species of phytoplankton in the Northeastern part of the Black Sea. *Russian Journal of Biological Invasions*, 2(1), 63–67.
- Yuney, O., Carstensen, J., Moncheva, S., Khaliulin, A., Ertebjerg, G., & Nixon, S. (2007). Nutrient and phytoplankton trends on the western Black Sea shelf in response to cultural eutrophication and climate changes. *Elsevier*, 74, 63-76.
- Zaitsev, Y. (1992). Recent changes in the trophic structure of the Black Sea. *Fish Oceanography*, 1(2), 180-189.
- Zaitsev, Y. P., & Alexandrov, B. G. (1998). Recent man-made changes in the Black Sea ecosystem,. Black Sea biological diversity. *Black Sea Environmental Series*, Vol. 7. United Nations Publications, 351p, New York.

EKLER

EK 1.

Walne Medyumu Hazırlama Prosedürü

Stok solüsyon	1	<i>ml</i>
Vitamin solüsyon	1	<i>ml</i>
Sterilize edilmiş deniz suyu	1000	<i>ml</i>

(1 *ml* silicat solüsyonu diatom kültürü için ilave et)

Stok Solüsyon

FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.4	g	}	Isıtmalı manyetik karıştırıcı
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.2	g		
H ₃ BO ₃	16.8	g		
Na ₂ -EDTA	27.5	g		
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	10	g		
NaNO ₃	50	g		
Metal mix solüsyon	0.5	<i>ml</i>		
Distile su	500	<i>ml</i> 'ye tamamla		(balonjoje kullan)

Metal Mix Solüsyon

200 *ml* beher içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak aşağıdaki metalleri çöz:

ZnCl ₂ · 4H ₂ O	2.1	g		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.0	g		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.9	g		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.0	g		
Konsantre HCl	10.0	<i>ml</i>		
Distile su	100	<i>ml</i> 'ye tamamla		(balonjoje kullan)
Vitamin Solüsyon				
Vitamin B1	50	mg		
Distile Su	500	<i>ml</i> 'ye tamamla		(balonjoje kullan)

EK 2.

Katı Besi Yeri (KBS) Hazırlama Prosedürü

- DDS filitre edilir
- 1litre hacimli erlen içerisine 200ml DDS konur
- DDS hacminin % 1-1.5 oranında Mikrobiolojik agar (Merck) konulur.
- Agar erimesi için ortam ısıtılarak karıştırılır.
- Hazırlanan ortam otoklav ile 121⁰C de 20 dakika süreyle 2 atm basınç altında sterilize edilir.
- Çeker ocak içerisinde Steril edilen ortama zenginleştirici medyum (Walne stok solüsyon (1ml) ve Walne vitamin solüsyon(1ml) ilave edilir
- Hazırlanan agar her petri kabına 20ml olacak şekilde dağıtılır
- Katılaşmaya kadar beklenir
- Petrilerin kapakları kapatılarak parafilm ile fikse edilir.
- Bir gece Ultraviyole ye maruz bırakılır.

EK 3.


Sıvı Besi Yeri Hazırlama Prosedürü

- DDS Filtre edilir (45µm)
- DDS cam balon şişeye konarak ağzı pamuk yada plastik tapa ile kapatılır.
- Hazırlanan ortam otoklav ile 121⁰C de 20 dakika süreyle 2 atm basınç altında sterilize edilir.
- Steril edilen DDS içerisine 1ml Walne stok solüsyon ve 1ml vitamin solusyon ilave edilir.
- 1 gece stok odasında bekletilir.

Besi ortamı 1L su hacmine göre hazırlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Atila HAŞİMOĞLU
Doğum Yeri	TRABZON
Doğum Tarihi	01.12.1965
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05062049037
E-Posta Adresi	ahasimoglu@gmail.com



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fakülte	Sürmene Deniz Bilimleri
Bölümü	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	29.06.1990
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Fen Bilgisi Eğitimi Bilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	
Yayınlar	
<p>Hasimoglu, A. (2016). “Description of an alternative species culture project: a research on aquaculture performances of tub gurnard (<i>Chelidonichthys Lucerna</i> L., 1758)” International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences, Antalya, Turkey, FABA.</p> <p>Hasimoglu, A. & Erteken, A. (2016). “Enrichment of rotifer (<i>Brachionus Plicatilis</i>, L type) with different enrichment mediums, effects onTurbot (<i>P. maxima</i>) survival rate and body length performance in the first feeding of flat fish larvae” In ternational symposium on fisheries and aquatic sciences, Trabzon, Turkey, FABA.</p> <p>Haşimoğlu, A., Akpınar, Z., Guven, A., Beken, A. T., Parlak, R., Aydın, I., & Suzer, C. (2016). “Preliminary study on incubation of egg and early life development of tub gurnard <i>Chelidonichthys lucerna</i> (Pisces: Triglidæ) larvae under culture conditions” International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences, Antalya, Turkey, FABA.</p> <p>Ak, O., Hasimoglu, A., & Bayram, K. (2015). “Southeastward expansion of the blue crab, <i>Callinectes sapidus</i> (Rathbun, 1896) in the Black Sea. <i>Cahiers de Biology Marine</i>, (56), 397-399.</p> <p>Çiftci, Y., Üstündağ, C., Erteken, A., Özongun, M., Ceylan, B., Haşimoğlu, A., Güneş, E., Yoseda, K., Sakamoto, F., Nezaki, G. & Hara, S. (2002). “Manual for the seed production of turbot, <i>psetta maxima</i> in the black sea. Special publication No.2, Japan International Cooperation Agency and Central Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Trabzon, 80s.</p>	

- Goro, N., Erteken, A., & Haşimoğlu, A. (2001). “Kalkan Balığı (*Psetta maxima*) yetiştiriciliğinde canlı yem kullanımı”, *Yunus Araştırma Bülteni*, 1 (2),
- Haşimoğlu, A. (2002). “Su ürünleri sektörünün Japonya için önemi”, *Yunus Araştırma Bülteni*, 2 (2).
- Erteken, A., & Haşimoğlu, A. (2003). “Artemia üretim tekniği”, *Yunus Araştırma Bülteni*, 3 (3).
- Erteken, A. & Hasimoglu, A. (2007). “Sunı yem sanayinin ülkemizdeki durumu”, *Yunus Araştırma Bülteni*, 8 (3).
- Nezaki, G., Erteken, & A., Hasimoğlu, A. (2007). “Kalkan balığının (*Psetta maxima*) besin kompozisyonu, Kalkan Balığı Çalıştayı, Maçka/Trabzon
- Özdemir, G., & Haşimoğlu, A. (2007). “Kalkan balığı (*Psetta maxima*) larva yetiştiriciliğinde canlı yem. Kalkan Balığı Çalıştayı, Maçka/Trabzon.
- Sağlam, H., Özdemir, G., Ceylan, B., Haşimoğlu, A., & Özdemir A. (2009). “Doğu Karadeniz’de istilacı deniz salyangozunun, *Rapana venosa Valenciennes*, 1846, veliger larvalarının gelişimi” XV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Rize.
- Hasimoglu, A., Erteken, A., Kino, S., & Nakagawa, H. (2007). “Evaluation of anchovy meal as dietary protein sources for the Black Sea turbot, *Psetta maxima*”, *The Israeli Journal of Aquaculture*, 59 (2), 73-80.
- Hasimoğlu, A., Ak, O., Kasapoğlu, N., & Atılgan, E. (2016). “New maximum length report of *Chelidonichthys lucerna* (Linnaeus, 1758) in the Black Sea, Turkey”, *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 22 (2) 149-154.
- Aksungur, N., Ceylan, C., Özdemir, G., Polat, P., Haşimoğlu, A., Küçük, E., & Aydın, İ. (2007). “Effects of dietary protein and lipid levels on growth of black sea turbot, (*Psetta maxima*)” European Aquaculture Conference, İstanbul, Türkiye.
- Akpınar, Z., Akpınar, I., Ozel, O. T., & Hasimoglu, A., (2016) .“A study on natural reproduction behavior of European seabass (*Dicentrarchus labrax*, Lin. 1758) in The Black Sea, International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences Antalya, Turkey, FABA.
- Akpınar, Z., Ozel, O. T., & Hasimoglu, A. (2016). The egg production of european seabass (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758) “On Controlled Conditios In Black Sea” International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences, Antalya, Turkey, FABA