

# Barkodlama ve Metabarkodlama Tekniđi: Meyve ve Sebzeler için Nükleik Aside Dayanan Moleküler Tanımlama

**Prof. Dr. Remziye Yılmaz**

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,

## Özet

Meyve ve sebzeler, çoğunlukla işlem görmeden tüketime giren temel gıdadır, bu nedenle üretim, işleme ve dağıtımın tüm aşamalarında menşei ve izlenebilirlik gıda güvenliği alanında kilit unsurlardır. Dünyada meyve ve sebze üreticileri, kaynağına kadar kolayca izlenebilen ürünler sağlamak için önemli çaba sarf eder. Son 20 yılda, genombilim yaklaşımının kullanılması ile birlikte, bitkilerin botanik kökenini takip eden pek çok nükleik asit (DNA (Deoksiribo Nükleik Asit / RNA (Ribo Nükleik Asit)) bazlı barkodlama ve metabarkodlama yöntemi kullanılmıştır (Pasqualone ve diğerleri, 2003; Ren ve diğerleri, 2006; Salem ve diğerleri, 2007). Bu yöntemler hem ürünlerini korumak ve belgelendirmekle ilgilenen üreticiler hem de gıdalarının kalitesi ve menşei ile ilgilenen tüketiciler için faydalıdır (Galimberti ve diğerleri, 2013; Madesis ve diğerleri, 2014; Espineira ve Santaclara, 2016, Yılmaz, 2017). Ayrıca, nükleik asit barkodlamanın potansiyelini ortaya koymak ve özellikle meyve ve sebze örneklerinde metabarkodlama uygulamasını gerçekleştirmek için, veri elde etmek amacıyla



analiz standartlarına göre uygulanan nükleik asit barkod lokus seti kullanılarak referans koleksiyonlarının sistematik dizilimi gereklidir. Ülkemiz için bu referans koleksiyonlar, Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından muhafaza edilen Türkiye Arazi Gen Bankaları'dır. Birleşmiş Milletler tarafından 2021 yılının "Uluslararası Meyve ve Sebze Yılı" ilan edildiği bir zamanda, mevcut materyal kullanılarak bitki genetik kaynaklarının koordineli ve sistematik olarak barkodlama/metabarkodlama tekniği ile kapsamlı ve taksonomik açıdan güçlü bir referans veritabanı hazırlanabilmesi için çok önemli bir fırsat bulunmaktadır.

Burada, nükleik aside dayanan barkodlama ve metabarkodlamanın tanımı yapılarak; meyve ve sebzede kapsamlı bir sistem için gereksinimler ele alınmıştır. Amaç, meyve ve sebzelerin gıda izlenebilirliği için evrensel bir araç olarak barkodlama ve metabarkodlama tekniklerinin kullanımıyla ilgili en son durumu özetlemektir. Ayrıca, Türkiye'de barkod referans verileri içeren bir veri tabanı için kapsamlı bir metabarkodlama sistemi oluşturulması gerekliliğine değinilm-



iştir. Özellikle, meyve ve bağ genetik kaynakları için barkodlama ve metabarkodlama vaadini gerçekleştirmek üzere Türkiye Arazi Gen Bankaları koleksiyonlarının büyük ölçekli ve koordineli analizinin yapılması önerilmiştir.

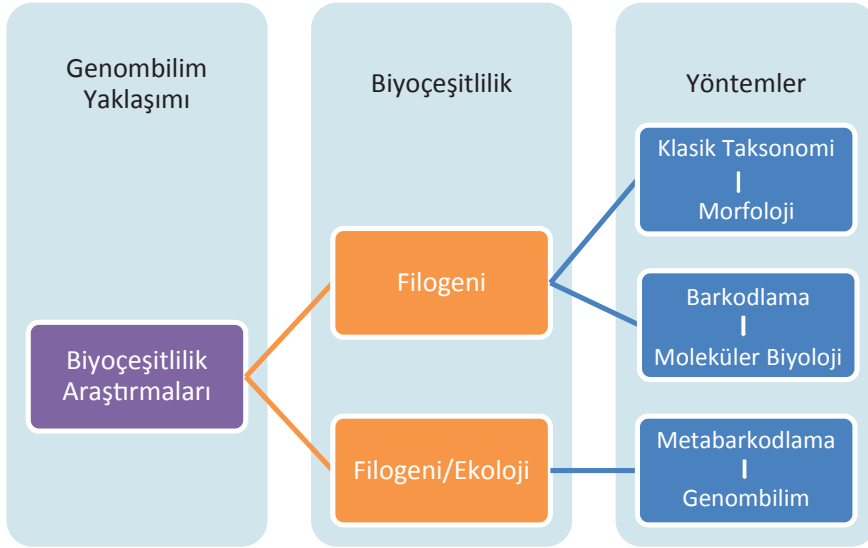
## Giriş

Son zamanda, genom bilim yaklaşımının da kullanılması ile birlikte, tür düzeyindeki tanımlama tartışmalarını çözen, güçlü taksonomik temele ve nükleik aside dayanan barkodlama sistemine duyulan ihtiyaç hem meyve, sebze hem de mikroorganizmalar için artmıştır (Şekil 1). Genel olarak, DNA/RNA tabanlı yöntemler, geleneksel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve dizileme, nicel gerçek zamanlı PCR ve yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi, kapiler elektroforez (CE), mikrodiziler ve yeni nesil DNA

dizileme (NGS) olarak sıralanabilir. PCR tabanlı yöntemler, spesifik veya rastgele primerler ve bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak hedef lokusların amplifikasyonunu içerir. Fragmanlar daha sonra elektroforetik olarak kontrol edilir ve elde edilen ürün nükleik asit dizilemeye tabi tutulur (Madesis ve diğerleri, 2014).

Son 20 yılda, yeni bir tanımlama sistemi olan önce DNA/RNA barkodu (barkodlama) ve daha sonra DNA/RNA metabarkodlama yöntemleri geliştirildi (Şekil 2). Barkodlama, genomun “nükleik asit barkodu” adı verilen kısa, standartlaştırılmış gen bölgelerine ait değişkenliğin analizi ile hızlı ve doğru tanımlamasına olanak tanır (Hebert ve diğerleri, 2003, Girme ve diğerleri, 2021). Bu yaklaşımın çeşitli teorik ve pratik uygulamalarda taksonomik problemlerin çözümünde

*Mesleğimiz ve  
Meslektaşlarımız  
için **GıdaMO***

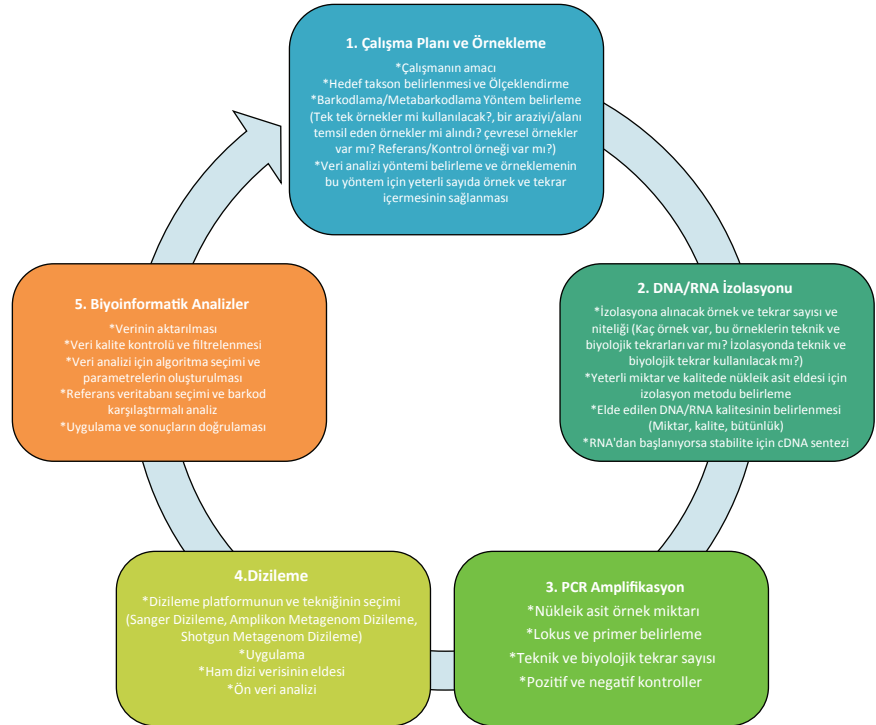


çıktıların analizine kadar prosedürün standardizasyonu ve verilerin dijitalleştirilmesi (Casiraghi ve diğerleri, 2010; 2012).

Şekil 1. Genomik çağda biyoçeşitlilik araştırmalarını ilerletmek için bütüncül bir yaklaşım.

faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Valentini ve diğerleri, 2009; Hollingsworth ve diğerleri, 2011). Metabarkodlama ise birden fazla organizma içeren örnekler uygulanan barkodlamanın adıdır (Dormontt ve diğerleri 2018).

Moleküler tanımlama yaklaşımı uzun zamandır kabul görmüştür ve barkodlama tamamen yenilikçi bir yöntem olmamakla birlikte üç önemli yeniliği birleştirme avantajına sahiptir: tanımlama sürecinde taksonlar arasında ayırım yapmak için nükleik asit değişkenliğinin araştırılması, örnekleme aşamasından



Şekil 2. DNA/RNA barkodlama/metabarkodlama analizi iş akışı.

## DNA Barkodlama

Herhangi bir örneği birkaç saat içinde tanımlamak için DNA barkodunu kullanmak ve biyoçeşitliliği aydınlatmak mümkündür. DNA barkodlama, bir bitki, örneğin bir meyve veya sebze, DNA'sının belirli bir türe ait olduğunu tanımlamak için kısa bir genetik işaretleyici kullanan bir yöntemdir (Larranaga ve Hormaza, 2015). DNA barkodlama yöntemi, araştırılan çeşide bağlı olarak, kloroplast gibi organellere veya hücre çekirdeğine ait genetik materyallerin ilgili bölgelelerinin kısa zincir uzunluğundaki dizi bilgisinden faydalanılarak tür hatta alt tür seviyesinde tanımlamayı sağlayacak biyolojik barkodlar olarak tanımlanabilir (Kurban, 2019). Bitki DNA barkod süreci, numuneden DNA izolasyonunu, bu DNA'lar kullanılarak PCR amplifikasyonu ile hedef DNA barkod bölgesinin çoğaltılmasını, PCR ürünlerinin dizilenmesini, biyoinformatik araçlar ile veri analizini ve elde edilen dizileri referans veri tabanlarıyla karşılaştırılmasını içerir. Biyoinformatik analizden önce, barkod dizilerinin kalitesinin kontrol edilmesi bu süreç için temel adımdır (Şekil 1). Hemen hemen tüm bitki grupları için standart barkod olarak kullanılan gen bölgeleri, kloroplasttaki *matK* ve *rbcL* olmak üzere iki gen bölgesidir, (Dormontt ve diğerleri 2018). Ayrıca meyve ve sebzeler için barkod bölgeleri olarak da Barcode of Life Konsorsiyumu (CBOL) Bitki Çalışma Grubu tarafından onaylanmıştır. Bitki kimlik doğrulaması için çeşitli ek DNA barkod lokusları (*trnH-psbA*, *rpoB*, *rpoC1*, *ndhJ*, *accD*, *ITS*, *ycf5* ve *TS2*) ve çeşitli iki lokus kombinasyonları gibi alternatif barkodlama bölgelerinin kullanıldığı açıklanmıştır. *matK* ve *rbcL* kombinasyonunun tür düzeyinde yalnızca yaklaşık %70 olasılıkla ayırım yaptığı gösterilmiştir ([https://www.npainfo.org/App\\_Themes/NPA/docs/regulatoryLegislative/White%20Paper/NPAWhitePaper\\_DNABarcoding.pdf](https://www.npainfo.org/App_Themes/NPA/docs/regulatoryLegislative/White%20Paper/NPAWhitePaper_DNABarcoding.pdf)). Hayvan türleri barkodlama çalışmalarında bu oran %99'a dek başarı elde etmiştir (İvanova et al., 2016). DNA barkodlama ile ilgili bazı tanımlar Kutu 1'de verilmiştir.

### Kutu 1. DNA barkodlama ile ilgili bazı tanımlar.

#### Tanımlar

##### DNA barkodu

Bir tür için genomun küçük bir parçası (işaretleyici). Çoğu hayvan türünde standartlaştırılmış barkod, mitokondriyal COI geninin bir parçasıdır, bitkiler için standartlaştırılmış barkod, *matK* ve *rbcL* gibi genlerin bir parçasıdır, küf ve mantarlar için barkod ise ITS gen bölgesi olarak seçilebilir.

##### DNA barkodlama

Standartlaştırılmış DNA fragmanları kullanılarak türlerin tanımlanması. İdeal DNA barkodlama prosedürü, koleksiyonlarda saklanan iyi seçilmiş örneklerle başlar ve bilinen türlere bilinmeyen dizileri atamak için kullanılacak tür tanımlayıcıların açık bir referans veritabanında depolanan benzersiz bir diziyle biter.

##### Metabarkodlama

Karmaşık bir çevresel (*environmental*, e) DNA (eDNA) örneğinden veya bir koleksiyondan çok sayıda türü temsil eden DNA örneklerinden hareketle DNA tabanlı hızlı bir tanımlama yöntemi. Metabarkodlama yaklaşımı genellikle mikrobiyal topluluklara uygulanmakla birlikte meiofauna ve megafaunaya da uygulanabilir.

##### Operasyonel taksonomik birim (OTU)

Bir çalışmada kullanılmak üzere seçilen birey veya bakteri suşu, popülasyon, tür veya cins gibi taksonomik seviye. OTU'lar, özellikle küçük alt birim 16S (prokaryotlar için) veya 18S rRNA (ökaryotlar için) işaretleyici gen dizisi veri kümelerini analiz ederken en yaygın kullanılan çeşitlilik birimleridir.

## DNA/RNA İzolasyonu

Tüm canlılarda yaşam ile ilgili bilgiyi depolayan ve kodlayan genetik materyal olan nükleik asitlerin izolasyonu ve saflaştırılması barkodlama/metabarkodlama çalışmaları için ilk adımdır. Bir DNA molekülü, bir birine sarılı iki polinükleotid zincirinden oluşan bir çift sarmaldır. Her bir zincir, uzun bir nükleotid dizisinden oluşmaktadır. Her nükleotid aynı şeker ile fosfattan, ve de dört olası bazdan herhangi birinden meydana gelmektedir. Bir DNA molekülü, RNA molekülü ile birçok yapısal benzerlik paylaşmaktadır. Her ikisi de nükleik asittir. Her ikisi de bir şeker, bir fosfat ve bir bazdan oluşan nükleotidlerin polimerleridir. Fakat DNA ve RNA arasında üç önemli yapısal farklılık mevcuttur: RNA genelde tek zincirli moleküldür; DNA'daki şeker deoksiriboz'dan; RNA'daki şeker ise riboz'dan oluşmaktadır; bir DNA nükleotidi, dört olası bazdan birini içermektedir: adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G). RNA nükleotidinde A, C ve G ortaktır fakat T yerine urasil (U) mevcuttur. DNA hücre içinde RNA üretimini yönetir ve bununla birlikte protein üretimini de denetler (Arslan ve diğerleri 2017). Nükleik asit izolasyon yöntemlerinin buradaki kullanım amacı, Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR)'unda başlangıç materyali olacak meyve ve sebze örnekleri nükleik asit saflaştırılmasını sağlamaktır. Nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı PCR süreci için çok önemli faktörlerden bazılarıdır. Yüksek saflıkta, inhibisyon bulaşanlarından arındırılmış nükleik asitleri elde etmek için, farklı izolasyon yöntemleri uygulanabilmektedir. Bu amaçla, meyve ve sebze örneklerinden DNA/RNA izolasyon yöntemleri genellikle hücre ve çekirdek duvarlarının parçalanması (liziz); polisakkaritler, fenolik bileşikler, proteinler ve sıvı çözeltideki diğer hücre lizatlarının nükleik asit içeren kompleksden ayrılması (ekstraksiyon) ve presipitasyon temel aşamalarını içerir. DNA örneklerinin saflık derecelerini belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntemlerle 260 ve 280 nm'deki absorban değerlerinin oranı (A260/A280) mutlaka kontrol edilir. Ancak iyi

kalitede ve analize alınacak örneği temsil eden bir nükleik asit eldesi için hammadde, burada meyve ve sebze örneklerinin bazı ön işlemlerden geçmesi ve bu işlemlerinde iyi tanımlanmış olması gerekmektedir (homojenizasyon, mekanik parçalama, öğütme, filtreleme vb.). DNA/RNA izolasyonu için tanımlanmış klasik yöntemlerin yanı sıra pek çok ticari kit kullanımı da söz konusudur. DNA barkodlama çalışmalarında başarının sırrı, başlangıç materyali olan nükleik asidin yeterli ve kaliteli bir şekilde elde edilmesindedir.

## Barkod Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması

1985 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından bulunan ve *in vitro* bir teknik olan PCR (*Polymere Chain Reaction*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'ın temeli bir DNA zincirinin üzerinde, bilinen özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanmaktadır. Önceden belirli bir genin sadece az bir miktarı elde edilebilirken, günümüzde PCR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya çoğaltılabilir (Yılmaz ve diğerleri 2010). Bu teknik çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta tek zincir haline gelmesi (denatürasyon, 90-95°C), primer olarak kullanılan iki oligo nükleotidin hedef DNA'ya bağlanması (primer eşleşmesi, 50-70 °C), Mg<sup>2+</sup> iyonlarının varlığında, katalizör olan bir polimeraz enzimi ile primerlere nükleotid eklenmesi ve nükleik asit zincirinin uzaması (primer uzaması, 70-75 °C) aşamalarından oluşur. Oligonükleotidler genellikle kısa zincirlerden oluşan, birbirlerinden farklı ve çoğaltacak hedef DNA'nın bağlanacağı tanımlama bölgelerine eşittir. Denatürasyon, primer birleşmesi ve primer uzaması PCR metodunda bir döngüyü oluşturur. Her döngüden sonra yeni sentezlenen DNA zincirleri yeni döngüde ana zincir (hedef zincir) olabilir. Bu reaksiyonun ana ürünü, sonu oligonükleotid primerlerin 5' ucu olan ve uzunluğu primerler arası uzaklıkla tanımlanan bir nükleik asit parçasıdır. Başarılı bir amplifikasyonun ilk döngüsünün ürünleri, iki primerin bağlanma

bölgeleri arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip farklı boyutlarda nükleik asit molekülleridir. İkinci döngüde, istenen uzunluktaki nükleik asit zincirleri oluşur. Bu diğer amplifikasyon döngülerinde lineer olarak artar ve reaksiyonun temel ürünlerini oluşturur. Böylece amplifikasyon, ana zincirin son kopya sayısı olarak  $n$  döngü sayısı olmak üzere “ $(2n-2n)$ ” formülü ile açıklanır.

PCR için gerekli kimyasallar su, reaksiyon tamponu, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, oligonükleotid primerler, deoksiniükleotidler (dNTP), hedef DNA ve  $Mg^{+2}$  iyonlarıdır. Genel olarak bütün maddeler (hedef nükleik asit) dışında reaksiyon sayısına göre yeterli olacak şekilde tek bir tüpte karıştırılırlar. Bu karışım tek tek tüplere dağıtılır ve hedef DNA eklenir. Barkod bölgesinin başarı ile çoğaltılması hedef DNA'nın miktarı ve kalitesine bağlıdır (Yılmaz ve diğerleri 2010). Bir DNA barkodu gen bölgesinin üç kriteri karşılaması beklenir: (a) önemli tür düzeyinde genetik değişkenlik ve farklılık içermesi, (b) geniş taksonomik

uygulama için evrensel PCR primerleri seçimi ve korunmuş bölgelere sahip olması ve (c) DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonunu kolaylaştırmak için kısa bir dizi uzunluğu. Buna göre bazı orman meyvelerinin DNA barkodu çalışmasında kullanılan moleküler belirteçler için primer dizileri Tablo 1’de verilmiştir.

## Gen Dizileme

Bitkilerin DNA barkodlamasında bir diğer önemli adım, kullanılan moleküler belirteçler için dizi verilerinin elde edilmesidir. Klasik zincir sonlandırma dizileme yöntemi, tek sarmallı bir DNA şablonu, primer, DNA polimeraz, normal deoksiniükleosittrifosfatlar (dNTP’ler) ve modifiye edilmiş di-deoksiniükleosittrifosfatlar (ddNTP’ler) gerektirir; bunlardan ikincisi DNA zincirinin uzamasını sonlandırır. Bu zincir sonlandırıcı nükleotitler, iki nükleotit arasında bir fosfodiester bağının oluşumu için gerekli olan bir 3'-OH grubundan yoksundur ve bu, modifiye edilmiş bir ddNTP dâhil

**Tablo 1. Bazı orman meyvelerinin barkod gen bölgelerini çoğaltmak için PCR’da kullanılan primer dizileri (KAYNAK)**

Gen adı	Primer adı	Primer dizisi (5'- 3')	PCR Amplifikasyon koşulları	Uzunluk (bp)
<i>rbcl</i>	<i>r bcL</i> -F	TGTA AACGACGGCCAGTTTGCA GCATCCGAGTAAC	95 °C 10 dak; 95 °C 30 sn, 50 °C 30 sn, 72 °C 30 sn, 35 döngü; 72 °C 5dk	246
	<i>r bcL</i> -R	CAGGAAAACAGCTATGACAGTAAA CATGTTAGTAACAG		
<i>psbA - trnH</i>	<i>psbA - trnH</i> -fwd	TGTA AACGACGGCCAGTGTTATG CATGAACGTAATGCTC	95 °C 4 dak; 94 °C 30 sn, 64 °C 30 sn, 72 °C 30 sn, 35 döngü; 72 °C 5dk	450
	<i>psbA - trnH</i> -dev	CAGGAAAACAGCTATGACCGCG CATGGTGGATTCAATCC		
<i>matK</i>	<i>matK</i> -3F-KİM	TGTA AACGACGGCCAGTCGTACA GTACTTTTGTGTTACGAG	94 °C 1 dak; 94 °C 30 sn, 52 °C 20 sn, 72 °C 50 sn, 35 döngü; 72 °C 5 dk	890
	<i>matK</i> -1R-KİM	CAGGAAAACAGCTATGACACCCA GTCCATCTGGAAATCTTGTTTC		
<i>trnL</i>	<i>trnL</i> -g:A49425	TGTA AACGACGGCCAGTGGGCA ATCCTGAGCCAA	95 °C 10 dak; 95 °C 30 sn, 55 °C 30 sn, 72 °C 30 sn, 35 döngü; 72 °C 5 dk	10-143
	<i>trnL</i> -h:B49466	CAGGAAAACAGCTATGACCCATT GAGTCTCTGCACCTATC		
<i>trnL</i>	<i>trnL</i> -c:A49325	TGTA AACGACGGCCAGTCGAAAT CGGTAGACGCTACG	95 °C 10 dak; 95 °C 30 sn, 58 °C 30 sn, 72 °C 2 dk, 35 döngü; 72 °C 5 dk	254-767
	<i>trnL</i> -d:B49863	CAGGAAAACAGCTATGACGGGGATA GAGGGACTTGAAC		

edildiğinde DNA polimerazının DNA'nın uzamasını durdurmasına neden olur. ddNTP'ler, otomatik dizileme cihazlarında tespit için floresan ile etiketlenebilir (Sanger ve diğerleri, 1975). "Zincir sonlandırma yöntemi" olarak da bilinen Sanger dizileme, DNA'nın nükleotid dizisini belirlemeye yönelik bir yöntemdir. Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi ise, yüksek kapasiteli, yüksek verimli ve hızlı sıralama teknolojisidir. NGS teknolojisi, tüm genom ve DNA veya RNA'nın hedeflenen bölgelerindeki nükleotidlerin sırasını belirlemek için kullanılır. NGS, biyolojik bilimlerde devrim yaratarak, laboratuvarların çok çeşitli uygulamaları gerçekleştirmesine ve biyolojik sistemleri daha önce hiç mümkün olmayan bir düzeyde incelemesine izin verir. Bu dizileme yöntemi, klasik Sanger zincir sonlandırma yönteminden temelde farklı bir yaklaşım kullanır. DNA zinciri kopyalanırken etiketli nükleotitlerin eklenmesini takip eden sentez teknolojisi ile dizilemeyi büyük ölçüde paralel bir şekilde kullanır. Yeni nesil dizileme, yüksek kapasiteli DNA dizileme verisi üretir ve geleneksel Sanger dizilemesinden hem daha ucuz hem de daha az zaman alıcıdır. NGS sistemleri, cihaz tipine ve konfigürasyonuna bağlı olarak, tek bir çalıştırmada 300 kilo bazdan çoklu tera baza kadar değişen veri çıkışı sağlayabilir. Sonuç olarak, farklı bitki gen dizileme teknikleri ve farklı tipte genetik analiz cihazları mevcuttur. Elde edilen verilerin bir barkod referans veri tabanına yüklenmesi hedefleniyorsa, mümkün olduğunca, barkod ürünleri çift yönlü olarak dizilenmelidir. Çift yönlü dizileme, genellikle bir okumanın sonlarına doğru meydana gelen sinyal bozulması sorununa izin vermeden tam uzunlukta barkod dizilerinin oluşturulmasına yardımcı olur. Ayrıca, iki okumadan bir dizileme verisi oluşturan ve her pozisyon için kalite düzeyi belirleyen özel yazılımlar bulunmaktadır. DNA barkodlama çalışmaları, bilinmeyen örnekleri bilinen türlerin verileri ile karşılaştırmasına ve bu veriler ile açık bir referans veri tabanı oluşturulmasına olanak sağlar. Barkod dizilerinin analizi için etkili olan yaygın olarak kullanılan nükleik asit analiz yazılım paketleri bulunmaktadır (iBOL, Boldsystems).

## Biyoinformatik Analizler

Dizileme işleminden sonra elde edilen dizilerin analizi biyoinformatik analizler yapılarak gerçekleştirilir. Bu analizlerle ilgilenilen organizma için moleküler genetik belirteçler tanımlanabilir ve fenotipin eksiksiz anlaşılması sağlanabilir. Burada, ham DNA dizilerini temiz DNA barkodlarına dönüştürmek (dizi düzenleme, dizi hizalama) ve DNA barkod karşılaştırmaları için yaygın olarak kullanılan veri tabanı seçimi (taksonomik tanımlama) için belirli bir yol izlemek gereklidir. Barkod çalışmalarında, tür tanımlama ve yeni tür keşfini önemli düzeyde etkileyebilecek faktörler, özellikle, veri tabanı ve dizi arama stratejileridir. En sık kullanılan veritabanları olan GenBank (GenBank Overview) ve Barcode of Life Database'de (BOLD)'ın algoritmaları birbirinden oldukça farklıdır. Bununla birlikte, DNA barkodlarında kullanım için değerlendirilebilecek çok sayıda dizi hizalama metodolojisi mevcuttur. Doğru moleküler genetik belirteçlerin seçilmesi durumunda kullanılan metodoloji ne olursa olsun DNA barkodlama araştırmaları için büyük bir potansiyel vardır.

## Metabarkodlama

Barkodlama ve metabarkodlama yöntemlerinin uygulandığı tüm taksonomik gruplar arasında en yaygın olanı meyve ve sebzelerin de içinde bulunduğu bitkilerin tanımlanmasıdır. DNA metabarkodlama (metabarkodlama), birden fazla organizma içeren numunelere uygulanan barkodlamanın adıdır. Metabarkodlama, karışık çevresel örneklerden taksonların belirlenmesine olanak sağlar ve bu nedenle, lokus (moleküler belirteç) seçimi konusuna özellikle dikkat edilmesi gereklidir. Gerçekten evrensel olması için, metabarkodlama, her biri farklı taksonlarda tür düzeyinde çözünürlüğü yakalamak için optimize edilmiş çoklu lokusların dâhil edilmesini gerektirir (örneğin, meyve ve sebzeler için *mat K*, *rbc L*, *ITS*, *ndh F*, *trn L-trn F*, *atp B-rbc L* ve *psb A-trn H*). Bununla birlikte, taksonomik çözünürlüğü geliştirmek için barkodlamada tek tek numune-

lerin analizi için çoklu lokus dizisi verileri birleştirilebilir ancak metabarkodlamada kullanılan tek toplu numune (eDNA) bu tür bir işleme izin vermez. Metabarkodlama, barkodlama ile aynı referans veri tabanlarını kullanır, NGS yöntemini kullanarak karışık örneklerden taksonların tanımlanmasına sağlar. Metabarkodlama uygulamalarının potansiyeli, hemen hemen her numunenin tür bileşimini hızla belirleme olasılığı ile geniştir. Çevresel örneklerin (eDNA, çevresel örneklerden elde edilen DNA) analizini metabarkodlama ile uygun maliyetli ve güvenilir bir şekilde yapmak mümkündür. Bununla birlikte, hem barkodlama hem de metabarkodlamanın pratik uygulamaları, tanımlamaların dayandırılacağı kaliteli referans veri tabanlarının eksikliği nedeniyle sıklıkla sorun yaşar (Dormontt ve diğerleri 2018).

### **Türkiye Arazi Gen Bankaları**

15 Ağustos 1992 tarih ve 21316 sayılı “Bitki Genetik Kaynaklarının Toplanması Muhafazası ve Kullanılması Hakkında Yönetmelik” ile ülkemizde mevcut bitki genetik kaynaklarının toplanması ve muhafazası görevi Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına verilmiştir. 1970’lerden bu yana muhafaza çalışmalarında bulunan kamu ve kamu dışı sektörden birçok kuruluş ve program arasındaki muhafaza faaliyetlerini uyumlaştırmak ve koordine etmek amacıyla, Ülkesel Bitki Genetik Kaynakları Araştırma Projesi oluşturulmuştur. 1995 yılından başlayarak çalışmalar, Tarımsal Araştırma Projesinin yürürlüğe girmesi ile “Doğal Kaynaklar ve Çevre Araştırma Fırsat Alanı” çerçevesinde “Bitkilerde Biyolojik Çeşitlilik ve Muhafazası” ve “Doğal Kaynak İçin Veri Tabanı Oluşturma ve Erken Uyarı Sistemi Geliştirme” programları içinde yürütülmektedir. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ETAE), Ulusal programın Koordinasyon Merkezi olarak görev yapmakta ve koordinasyon görevi Bitki Genetik Kaynakları Bölümü tarafından yürütülmektedir. “Bitkilerde Biyolojik Çeşitlilik ve Muhafazası” Program çerçevesinde ülkemiz orjinli meyve ve bağ genetik kaynakları materyali, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne bağlı,

16 kuruluşun bünyesinde bulunan arazi gen bankalarında saklanmaktadır. Toplama çalışmaları ile elde edilen meyve ve bağ genetik kaynakları materyali, türün ekolojik istekleri dikkate alınarak uygun ekolojilerde ve biri emniyet duplikasyonu olmak üzere en az iki farklı kuruluşun arazi gen bankasında muhafaza edilmektedir. Meyve ve bağ genetik kaynakları materyalinin etkin biçimde saklanması, izlenmesi ve kullanılması amacıyla; Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü koordinatör kuruluş olarak, “Bitkilerde Biyolojik Çeşitlilik ve Muhafazası” Program çerçevesinde Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne bağlı, araştırma istasyonları ve enstitülerin bünyesinde bulunan, Meyve ve Bağ Genetik Kaynakları koleksiyonlarının veri tabanı sorumlusudur (Ulusal Arazi Gen Bankası). Ayrıca ETAE’deki farklı bitki gruplarınca uygulanan ıslah programları çerçevesinde, bitki genetik kaynakları koleksiyonları kullanılarak birçok çeşit geliştirilmiş ve tescil ettirilmiştir. Bunlar, 42 tütün, 1 bakla, 6 adi fiğ, 2 tüylü fiğ, 1 macar fiği, 1 italyan çimi, 1 üçgül, 2 koca fiğ, 1 yonca, 5 susam, 1 ayçiçeği, 1 anason, 1 bamya 5 kavun, 2 patlıcan, 5 biber ve 1 domates çeşididir. Bu güne kadar, ETAE arazi gen bankasında mevcut koleksiyonlar materyal kullanılarak geliştirilen 11 vişne, 11 yeşil erik 16 Avrupa eriği, 18 Japon eriği, 21 nar ve 3 ayva çeşidi ile 8 erik anacı tescil ettirilmiştir (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü).

### **Son Söz**

Görüldüğü gibi Türkiye arazi gen bankaları 1930 yılından bu yana oldukça önemsenmekte ve ETAE gibi arazi gen bankasına sahip enstitülerin tamamının meyve ve bağ genetik kaynakları konularındaki çalışmaları, Türkiye’de meyve yetiştiriciliğinin uzun vadeli korunması için bir temel oluşturmaktadır (Aykas ve diğerleri 2018).

Birleşmiş Milletler (UN) tarafından bu yılın meyve ve sebze yılı ilan edilmiş olması arazi gen bankaları tarafından muhafaza edilen meyve ve bağ genetik kaynaklarının barkodlama/metabarkodlama çalışmaları ve ulusal bir veri bankası oluşturulma-



sı için fırsat olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, Türkiye’de barkod referans verileri içeren bir veri tabanı için kapsamlı bir metabarkodlama sistemi oluşturulması gerekliliği ortadadır. Meyve ve bağ genetik kaynaklarına dair barkodlama ve metabarkodlama vaadini gerçekleştirmek için öncelikle Türkiye Arazi Gen Bankaları koleksiyonlarının büyük ölçekli ve koordineli analizinin yapılması uygun olacaktır. Ülkemiz üniversite, araştırma kurumları ve TAGEM genombilim yaklaşımı ile birlikte ortaya çıkan barkodlama ve metabarkodlama yöntemlerinin kullanılması için gerekli olan altyapı, bilgi ve beceri birikimine sahiptir.

### Kaynaklar

1. Arslan Ö., Çiçek, N., Yılmaz, Remziye, Öktem, H.A., Ekmekçi, Y., Kayihan, C., Eyidoğan, F., Kandemir, İ., Çetin, D. (2017) *Biyoloji: ÖZ*
2. Aykas, L., Kafa, G., Uzun, M., Doğan, A., Özdemir, M; Uğur, R., Küçük, E., Seymen, T., Vurgun, H., Balık, H., Çiçek, M., Sariçam, Ş., Ayar, A., Macit, İ., Gültekin, N., Kesgin, M., Özyurt, K., Uysal, T., Kaya H. (2018) Türkiye Arazi Gen Bankaları, Anadolu, 28 (2), 76 - 87.
3. Basic Local Alignment Search Tool. Erişim adresi: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
4. Bernardo G.D., Gaudio S.D., Galderisi U., Cascino A., Cipollaro M. (2007) Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotechnology Progress*, 23 (2), 297-301.
5. Bhargava M., Sharma A. (2013) DNA barcoding in plants: Evolution and applications of in silico approaches and resources. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67, 631-64.
6. Bolddsystem Taxonomy, Erişim adresi: [https://www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser\\_Homelackwell](https://www.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Homelackwell) Publishing Ltd
7. Casiraghi M., Labra M., Ferri E., Galimberti A., De Mattia F. (2010) DNA barcoding: a six-question tour to improve users’ awareness about the method. *Briefing in Bioinformatics*, 11, 440-453.
8. Cheng, Y., Guo, W., Yi, H. (2003) An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 21: 177.
9. Collins R. A., Cruick Shank R. H. (2013) The seven deadly sins of DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 13(6), 969-75.
10. Dormontt E., V. Dijk K., Bell K., Biffin E., Breed M. F., Byrne M., Caddy-Retalic S., Encinas-Viso F., Nevill P.,G., Shapcott A., Young J.M., Waycott M., Lowe A. J. (2018) Advancing DNA Barcoding and Metabarcoding Applications for Plants Requires Systematic Analysis of Herbarium Collections—An Australian Perspective. 6, 134.
11. Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.*, 19, 11-15.
12. Espineira M., Santaclara F.J. (2016) *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies: Improving Quality Throughout the Food Chain.* Woodhead Publishing, 402 p.
13. Galimberti A., De Mattia F., Losa A., Bruni I., Federici S., Casiraghi M., Martellos S., Labra M. (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50, 55-63.
14. GenBank Overview. Erişim Adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
15. Girme A., Ramesha D.M., K. Joseph J., V.Ravisankar. (2021) Chloroplast Gene matK Holds the Barcodes for Identification of Momordica (Cucurbitaceae) Species from Indian Subcontinent.
16. Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 270(1512), 313-21.
17. Hollingsworth P.M., Graham Sean W., Little D. P. (2011) Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254.
18. NPA Regulatory Documents. Erişim adresi: [https://www.npainfo.org/App\\_Themes/NPA/docs/regulatoryLegislative/White%20Paper/NPAWhitePaper\\_DNABarcoding.pdf](https://www.npainfo.org/App_Themes/NPA/docs/regulatoryLegislative/White%20Paper/NPAWhitePaper_DNABarcoding.pdf)
19. Ivanova N.V., deWaard J.R., Hajibabaei M., Hebert P.D.N. (2016) Protocols for High-Volume DNA Barcode Analysis, DNA Working Group Consortium for the Barcode of Life, 1-24.
20. Kurban M. (2019) *Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Ta-

banının Oluşturulması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dokotra Tezi, 175 s.

**21.** Köchl S., Niederstätter H., Parson W. (2005) DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Forensic DNA Typing Protocols*, Springer, 13-29.

**22.** Larranaga N., Hormaza J.I. (2015) DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (*Annonaceae*). *Front. Plant Sci.* 6, 589.

**23.** Madesis I., Ganopoulos, I. (2014) Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* 60,163-172.

**24.** Martins-Lopes P., Gomes S., Pereira L., Guedes-Pinto H. (2013) Molecular Markers for Food Traceability. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (2), 198-207.

**25.** Pafundo S., Gulli M., Marmioli N. (2011) Comparison of DNA extraction methods and development of duplex PCR and real-time PCR to detect tomato, carrot, and celery in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (19), 10414-10424.

**26.** Pasqualone A., Montemurro, C., Caponio F., Simeone, R. (2003) Multiplex Amplification Of DNA Microsatellite Markers to Fingerprint Olive Oils from Single Cultivars. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 12/53, 96-99.

**27.** Ratnasingham S., Hebert P.D.N. (2007) Barcoding BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) *Molecular Ecology Notes*, 355-364.

**28.** Ren X.Y., Vorst O., Fiers M.V., Stiekema W.J., Nap J.P. (2006) In plants, highly expressed genes are the least compact. *Trends Genet.* 22, 528-532.

**29.** Salem M.A., Kakani V.G., Koti S. (2007) Pollen based screening of soybean genotypes for high temperatures. *Crop Science* 47, 219-231.

**30.** Sanger F., Coulson A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by pri-

med synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94 (3), 441-8.

**31.** Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), 5463.

**32.** Ünsal, S.G., Çiftçi, Y.Ö., Eken, B.U. et al. Intraspecific discrimination study of wild cherry populations from North-Western Turkey by DNA barcoding approach. *Tree Genetics & Genomes* 15, 16 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1323-z>

**33.** The National Center for Biotechnology Information. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**34.** iBOL, DNA BARCODING. Erişim adresi: <https://ibol.org/about/dna-barcoding>

**35.** iBOL, Member And Associate Member Nations. Erişim adresi: <http://www.ibol.org/about-us/partner-nations/>

**36.** Ulusal Arazi Gen Bankası, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/etae/Menu/36/Ulusal-Arazi-Gen-Bankasi>

**37.** Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti, Wincker P., Swenson J.E., Taberlet P. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources*, 9, 51-60.

**38.** Yılmaz, Remziye , Eyidoğan, F, Öz, M.T., Yücel, M., Öktem H.A. (2010) Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri : Kurs Elkitabı. 1, 238.

**39.** Yılmaz, Remziye (2017) DNA Barcoding for MPR Fruits and Vegetables, Ed. Yildiz, F, Wiley, R. C., Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables, Springer US, Boston, MA, p. 639-649.