

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UYUZ GÖLÜ'NDE ÇEVRESEL DNA İLE BİYOÇEŞİTLİLİK TESPİTİ: GÖÇMEN
KUŞLAR MODELİ

Ayşegül ER

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ayşegül ER tarafından hazırlanan “Uyuz Gölü’nde Çevresel DNA ile Biyoçeşitlilik Tespiti: Göçmen Kuşlar Modeli” adlı tez çalışması 31/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Emre KESKİN
Ankara Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı

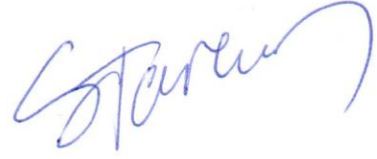


Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR
Ankara Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Ali Serhan TARKAN
Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi,
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Emre KESKİN
Ankara Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davranıldığını bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

31.12.2019



Ayşegül ER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

UYUZ GÖLÜ'NDE ÇEVRESEL DNA İLE BİYOÇEŞİTLİLİK TESPİTİ: GÖÇMEN KUŞLAR MODELİ

Ayşegül ER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre KESKİN

Anadolu, kuşların iki önemli göç yolu üzerinde köprü oluşturmaktadır (Avrupa-Afrika ve Afrika-Asya). Bu önemli göç rotası ve her yıl artan kuş gözlem verileri sayesinde ülkemizde hemen hemen her yıl yeni kuş türleri gözlemlenmektedir. Her yıl popülasyonları küresel ölçekte azalan göçmen ve yerel kuş türlerini düzenli olarak tespit etmek ekolojik bir değerlendirme yapabilmek için çok önemlidir. Çevresel DNA metabarkodlama, canlı organizmaların çeşitli yollarla doğaya bıraktıkları genetik materyalleri canlıya temas sağlamadan, toprak, hava ve su gibi çevresel örnekler kullanılarak hedef türleri ve örneklenen habitatın biyoçeşitliliğini, referans veri tabanı ölçeğinde tür seviyesinde tespit etmeyi sağlayan bir yöntemdir.

Bu tez ile, her yıl birçok göçmen kuşa kalıcı ve geçici yuva sağlayan koruma altındaki sulak alanlarımızdan biri olan Kulu Uyuz Gölü'nden kuş göçünün yoğunlaşmadığı Mart ve Ağustos aylarında aylık su örnekleri alınarak; kuşların yoğun göç aylarından biri olan Nisan ayı boyunca ise günlük su örnekleri alınarak göçmen kuşların tespit edilebilirliğinin dünyada ve Türkiye'de ilk kez eDNA metabarkodlama yöntemi ile ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda elde edilen su örnekleri kapalı filtrasyon sistemi ile filtrelenerek, eDNA yöntemine spesifik olarak optimize edilen izolasyon protokolleri ile çevresel DNA ekstrakte edilmiştir. Aves sınıfına özgün olarak tasarlanan ve 12SrRNA geninin kısa bir bölgesini çoğaltan evrensel primerler ile PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Örneklerin adaptör ligasyon yöntemi ile kütüphaneleri hazırlanarak yeni nesil dizilemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen milyonlarca nükleotid dizisi, çeşitli biyoinformatik filtreleme aşamalarından geçirilerek yerel veri tabanı hazırlanmıştır. Son aşamada, çalışmaya özgün olarak geliştirdiğimiz biyoinformatik araçlar kullanılarak biyoçeşitlilik (yerel kuşlar ve göçmen kuşlar) tür seviyesinde tespit edilerek farklı yöntemler arasındaki tür verileri karşılaştırılmıştır.

Aralık 2019, 152 sayfa

Anahtar Kelimeler: eDNA, sulcul ekosistem, metabarkodlama, tür tespiti, göçmen kuşlar

ABSTRACT

Master Thesis

BIODIVERSITY ASSESSMENT IN UYUZ LAKE USING ENVIRONMENTAL DNA: MIGRATORY BIRDS MODEL

Ayşegül ER

Ankara University
Graduate School of Natural ve Applied Sciences
Department of Fisheries ve Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre KESKİN

Anatolia is a bridge for two important bird migration routes (Europe- Africa and Africa- Asia). Due to this importance and increasing bird watching data, new species are observed almost every year in Turkey. Every year, migratory and local populations are decreasing globally, therefore it is significant to detect bird species regularly for an ecological assessment. Environmental DNA metabarcoding enables to identify target species and the biodiversity of sampled habitats at species level within reference database capability. without contacting organisms, only by taking environmental samples like soil, air and water.

This thesis aims to determine the detectability of migratory birds using eDNA metabarcoding, for the first time in the world and Turkey. Monthly samples were taken during March and August 2018 when migration is not intensive; and daily during April 2018, when migration is intensive in Kulu, Uyuz Lake; one of protected wetlands and providing permanent and temporary nest for many migratory birds.

Water samples were filtrated by closed filtration system and eDNA was extracted with optimized eDNA protocols. PCR amplifications were performed with primers specific for Aves class, targeting a short region of the 12SrRNA gene. The libraries were prepared by adapter ligation and Next Generation Sequencing was performed. Millions of nucleotide sequences were obtained and analysed using various bioinformatic filtration steps. A local database was prepared during the process. Finally, biodiversity (local and migratory birds) was detected at species level by using bioinformatics tools that were developed for this study and data was compared between results of different methods.

December 2019, 152 pages

Key Words: eDNA, aquatic ecosystems, metabarcoding, species identification, migratory birds

TEŞEKKÜR

Tez konumu belirleme aşamasında verdiği destek ve motivasyon için, çalışmanın başından sonuna kadar sağladığı her türlü laboratuvar ve arazi olanakları için, bilgisini, deneyimini, vaktini ve yardımlarını esirgemediğinden sabırla bu teze çok büyük katkı sağlayan sevgili hocam, danışmanım Doç.Dr Emre KESKİN'e çok teşekkür ederim.

Sevgili ekip arkadaşım Esra Mine ÜNAL'a tez aşamamın başından sonuna kadar sağladığı her türlü yardım için, deneyim ve bilgilerini benimle paylaştığı için, çalışmanın başından sonuna kadar verdiği tüm emeklere ve desteğine çok teşekkür ederim.

Sevgili ekip arkadaşlarıma çalışmam boyunca gösterdikleri sabır ve yoğun laboratuvar işlerini bu dönemde üzerimden alarak verdikleri destek için eGL (Evrimsel Genetik Laboratuvarı) ekibine çok teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarında bana yardımcı olan, 30 gün boyunca beni arazi noktasına götürüp, arazi çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili dayım Feridun YURTTAKALAN ve sevgili dedem İsmail YURTTAKALAN'a, bir aylık arazi süresince bana evini açan, destek, motivasyonunu ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen canım anneannem Nazlı YURTTAKALAN'a çok teşekkür ederim.

Kuşlar ile ilgili bilgi ve deneyimlerini her daim paylaşan, aves sınıfı yerel veri tabanı hazırlamamda verdiği destek ve yardımları için arkadaşım Ulvi Kerem GÜNAY'a çok teşekkür ederim.

Yeni Nesil Dizileme verilerimi analiz etmemde yardımcı olan ve elinden gelen bütün desteği sağlayan Teoman AYDOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak her zaman en büyük destekçilerim olan, canım annem Adeviye ER'e, canım babam Uğur ER'e, canım kardeşlerim Dilara ER ve Batuhan ER'e, her zaman sevgisi ve desteği ile yanımda olan Cihan Gökçe'ye sonsuz teşekkür ederim.

Ayşegül ER
Ankara, Aralık 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZET.....ii

ABSTRACT iii

TEŞEKKÜR iv

SİMGELER DİZİNİ vii

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ 5

2.1 Sulak Alanlar ve Kuş Gözlemi 5

2.2 Çevresel DNA (eDNA) 7

2.3 DNA Barkodlama..... 9

2.4 Metabarkodlama 10

3. METARYAL ve YÖNTEM..... 14

3.1 Arazi Çalışması 14

3.2 Kuş Gözlemi..... 20

3.3 Moleküler Analizler 20

3.3.1 Longmire solüsyonunun hazırlanması 20

3.3.2 DNA izolasyonu 21

3.3.2.1 Longmire solüsyonundan izolasyon 21

3.3.2.2 Sterivex filtrelerinden izolasyon 21

3.3.2.3 Selüloz nitrat filtrelerden izolasyon..... 23

3.3.3 DNA'nın spektrofotometrik analizi..... 24

3.3.4 DNA 'nın florometrik analizi 24

3.3.5 Jel elektroforezi 25

3.3.6 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)..... 25

3.3.7 Örneklerin DNA dizi analizine hazırlanması 25

3.3.7.1 Saflaştırma (Pürifikasyon) 25

3.3.7.2 DNA dizi analizi PCR'ı..... 26

3.3.7.3 DNA dizi analizi PCR pürifikasyonu: 27

3.3.7.4 Sephadex pürifikasyon protokolü..... 27

3.3.8 DNA dizi analizi	27
3.3.8.1 Dizilerin hizalanması	28
3.3.9 PCR ürünü pürifikasyonu	28
3.3.9.1 EtBr'lü jelden PCR ürünü pürifikasyonu	28
3.3.9.2 MN EtBr'lü jelden saflaştırma	28
3.3.9.3 Promega EtBr'lü jelden saflaştırma	29
3.3.9.4 PCR ürünü pürifikasyonu	30
3.3.10 DNA kütüphanesinin hazırlanması	31
3.3.10.1 Tagli PCR metodu	31
3.3.10.2 Tag PCR	41
3.3.10.3 Tag PCR ürünü pürifikasyonu	41
3.3.10.4 Tag PCR ürünü jelden saflaştırma	41
3.3.10.5 Qubit™ 3.0 florometre ve örneklerin karıştırılması	43
3.3.11 Kütüphane basamağı	43
3.3.11.1 TruSeq nano DNA library prep kiti “Repair Ends” basamağı	43
3.3.11.2 TruSeq nano DNA library prep kiti “Adenylate 3' Ends” basamağı	45
3.3.11.3 TruSeq nano DNA library prep kiti “Ligate Adapters” basamağı	46
3.3.12 Biyoinformatik analizler	47
3.3.12.1 Ön işlemler	48
3.3.12.2 Tür tespiti	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1 Moleküler Analiz Bulguları	51
4.2 Kuş Gözlem Veri Bulguları	112
4.3 Yeni Nesil Dizileme Bulguları	136
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	140
KAYNAKLAR	144
ÖZGEÇMİŞ	150

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
gx	Dakikada Devir
µL	Mikrolitre
rpm	Dakikada Devir
kg	Kilogram
g	Gram
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
ng	Nanogram
pmol	Pikomol
sn	Saniye
dk	Dakika
gr	Gram
mg	Miligram
Mg	Magnezyum

Kısaltmalar

A	Adenin
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
BOLD	The Barcode of Life Data System
COI	Sitokrom Oksidaz Alt Ünite I
C	Sitozin
ddNTP	Dideoksiribonükleozid Trifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
eDNA	Çevresel DNA
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
F	İleri Yön
GPS	Küresel Konumlandırma Sistemi
G	Guanin
HCl	Hidroklorik Asit
IUCN	Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği
LOD	Log of Odds
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Yeni Nesil Dizileme
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Yön
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris Asetat
T	Timin
UV	Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tagli Primerler ile Tek Aşamalı PCR Yöntemi	13
Şekil 3.1 Konya, Kulu, Uyuz Gölü Harita Görüntüsü	14
Şekil 3.2 Uyuz Gölü, 1	15
Şekil 3.3 Uyuz Gölü, 2	15
Şekil 3.4 Arazi Örnekleme Çalışmaları	16
Şekil 3.5 Arazi Filtrasyon Çalışmaları	16
Şekil 3.6 Arazi Örnekleme Çalışmaları	17
Şekil 3.7 Arazi Filtreleme Çalışmaları	17
Şekil 3.8 Arazi Örnekleme Çalışmaları	18
Şekil 3.9 Arazi Filtreleme Çalışmaları	18
Şekil 3.10 Biyoinformatik İş Akışı	49
Şekil 4.1 DNA Jel Elektroforezi Görüntüsü.	52
Şekil 4.2 Bird-F1/Bird-R1, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	54
Şekil 4.3 L14993/ H16065, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	54
Şekil 4.4 L5216/H6313, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	55
Şekil 4.5 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	56
Şekil 4.6 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	57
Şekil 4.7 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	58
Şekil 4.8 MiBird-U-F/ MiBird-U-R ve MiFish-U-F/ MiFish-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	59
Şekil 4.9 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	60
Şekil 4.10 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	61
Şekil 4.11 MiFish-U-F/ MiFish-U-R, 1959: Balık kas dokusu DNA izolatu, eDNA: balık akvaryumundan filtre izolasyonu yapılan eDNA izolatu, N: Negatif kontrol, L:Ladder	62
Şekil 4.12 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	63
Şekil 4.13 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, Gradient PCR Jel Görüntüsü,N:Negatif Kontrol, L: Ladder	63
Şekil 4.14 PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	65
Şekil 4.15 PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	65
Şekil 4.16 AVES01-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	66
Şekil 4.17 AVES02-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	66
Şekil 4.18 AVES03-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	67
Şekil 4.19 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, Normal Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, ...	68

Şekil 4.20 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, 1:2 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder	68
Şekil 4.21 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, 1:5 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder	69
Şekil 4.22 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	70
Şekil 4.23 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	70
Şekil 4.24 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	71
Şekil 4.25 Aves01-F/ Aves01-R, 1:5 konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	71
Şekil 4.26 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	72
Şekil 4.27 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal, 1:2 ve 1:5 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder	72
Şekil 4.28 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal, 1:2 ve 1:5 Konsantrasyon DNA ve Jel Pürifikasyon Sonrası Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, L: Ladder.....	73
Şekil 4.29 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder	74
Şekil 4.30 MiBird-U-F/MiBird-U-F, 1:2 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder	74
Şekil 4.31 MiBird-U-F/MiBird-U-F, 1:5 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder	75
Şekil 4.32 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder	77
Şekil 4.33 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder	77
Şekil 4.34 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder	78
Şekil 4.35 MiBird-U-F/MiBird-U-R, High-Fidelity DNA Polymerase, L: Ladder	78
Şekil 4.36 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, L: Ladder ..	79
Şekil 4.37 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, PCR Negatif, L: Ladder	79
Şekil 4.38 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	80
Şekil 4.39 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder	80
Şekil 4.40 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder	81
Şekil 4.41 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, 35 Döngü	81
Şekil 4.42 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, 35 Döngü	82

Şekil 4.43 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, 45 Döngü	82
Şekil 4.44 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, 45 Döngü	83
Şekil 4.45 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, 5 uM Primer Konsantrasyonu, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder.....	84
Şekil 4.46 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, 10 uM Primer Konsantrasyonu, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder.....	84
Şekil 4.47 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	85
Şekil 4.48 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif PCR, L: Ladder.....	85
Şekil 4.49 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder.....	86
Şekil 4.50 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder	86
Şekil 4.51 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. Negatif PCR, L: Ladder.....	87
Şekil 4.52 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	88
Şekil 4.53 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder	88
Şekil 4.54 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder	89
Şekil 4.55 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder	89
Şekil 4.56 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder	90
Şekil 4.57 MiBird-U-F/MiBird-U-R, 1. ve 2. Tekrar PCR, PCR Jel Görüntüsü,.....	91
Şekil 4.58 MiBird-U-F/MiBird-U-R, 2. Tekrar PCR ve Negatif Reaksiyon PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder	91
Şekil 4.59 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	92
Şekil 4.60 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	92
Şekil 4.61 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder	93
Şekil 4.62 MiBird-U-F/MiBird-U-F, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder.....	94
Şekil 4.63 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder	94
Şekil 4.64 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif Reaksiyon, L:Ladder	95
Şekil 4.65 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif Reaksiyon, L:Ladder	95
Şekil 4.66 Jel Görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, L: Ladder	96
Şekil 4.67 Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder	96
Şekil 4.68 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L:Ladder N: Negatif Kontrol	97
Şekil 4.69 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L:Ladder N: Negatif Kontrol	98

Şekil 4.70 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK:Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	99
Şekil 4.71 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK:Pozitif Kontrol, L: Ladder	100
Şekil 4.72 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK:Pozitif Kontrol, L: Ladder	100
Şekil 4.73 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK:Pozitif Kontrol, L: Ladder	101
Şekil 4.74 Jel Görüntüsü, Pürifikasyondan Önce, Exosap ve PCR-Clean-Up Kiti	101
Şekil 4.75 Jel Görüntüsü, Pürifikasyondan Önce, Exosap ve PCR Temizleme Kiti	102
Şekil 4.76 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, Jel Görüntüsü, L: Ladder ...	102
Şekil 4.77 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, ...	103
Şekil 4.78 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, ...	103
Şekil 4.79 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	104
Şekil 4.80 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, Jelden Kesim Yapılmadan Önce	104
Şekil 4.81 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, Jelden Kesim Yapıldıktan Sonra	105
Şekil 4.82 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	105
Şekil 4.83 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	106
Şekil 4.84 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	107
Şekil 4.85 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	108
Şekil 4.86 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	108
Şekil 4.87 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Arazi Örnek Bilgi Çizelgesi.....	19
Çizelge 3.2 ExoSap Termal Döngü Protokolü.....	26
Çizelge 3.3 DNA Dizi Analizi PCR Reaksiyon Protokolü.....	26
Çizelge 3.4 DNA Dizi Analizi Termal Döngü Protokolü.....	26
Çizelge 3.5 8 nükleotid uzunluğunda 36 farklı tag listesi (Taberlet vd. 2018).....	32
Çizelge 3.6 AVES01-F, İleri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu	33
Çizelge 3.7 AVES01-R, Geri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu	34
Çizelge 3.8 AVES01-F, İleri Yön Tagli Primer Dizisi	35
Çizelge 3.9 AVES01-R, Geri Yön Tagli Primer Dizisi	36
Çizelge 3.10 MiBird-U-F, İleri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu....	37
Çizelge 3.11 MiBird-U-R, Geri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu....	38
Çizelge 3.12 MiBird-U-F, İleri Yön Tagli Primer Dizisi.....	39
Çizelge 3.13 MiBird-U-R, Geri Yön Tagli Primer Dizisi.....	40
Çizelge 4.1 Örneklerin Nano Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları	51
Çizelge 4.2 Örneklerin Florometrik Ölçüm Sonuçları	52
Çizelge 4.3 Primer Tablosu.....	53
Çizelge 4.4 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg), PCR Reaksiyon Protokolü ..	53
Çizelge 4.5 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg), Termal Döngü Protokolü	53
Çizelge 4.6 MiBird-U-F/MiBird-U-R Primer Bilgi Çizelgesi	55
Çizelge 4.7 NXT Taq PCR Kit, PCR Reaksiyon Protokolü	56
Çizelge 4.8 NXT Taq PCR Kit, Termal Döngü Protokolü	57
Çizelge 4.9 Primer Bilgi Tablosu.....	58
Çizelge 4.10 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü	59
Çizelge 4.11 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, Termal Döngü Protokolü	59
Çizelge 4.12 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü	61
Çizelge 4.13 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, Termal Döngü Protokolü	61
Çizelge 4.14 Sanger Dizileme Sonuçları	64
Çizelge 4.15 Primer Bilgi Tablosu.....	64
Çizelge 4.16 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, PCR Reaksiyon Protokolü	75
Çizelge 4.17 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, Termal Döngü Protokolü	76
Çizelge 4.18 Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Reaksiyon Protokolü.....	76
Çizelge 4.19 Phusion® Hot Start PCR Mix, Termal Döngü Protokolü.....	76
Çizelge 4.20 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR Reaksiyon Protokolü.....	76
Çizelge 4.21 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Termal Döngü Protokolü.....	77
Çizelge 4.22 PrimeSTAR ® HS (Premix), PCR Reaksiyon Protokolü	87
Çizelge 4.23 PrimeSTAR ® HS (Premix), Termal Döngü Protokolü	87
Çizelge 4.24 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR Reaksiyon Protokolü.....	90
Çizelge 4.25 KAPA HiFi HotStart Ready Mix, Termal Döngü Protokolü.....	90
Çizelge 4.26 PCR Optimizasyon Çizelgesi.....	93
Çizelge 4.27 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR PCR Reaksiyon Protokolü	97

Çizelge 4.28 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Termal Döngü Protokolü.....	97
Çizelge 4.29 Q5® HotStart High-Fidelity 2X Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü ..	98
Çizelge 4.30 Q5® HotStart High-Fidelity 2X Master Mix, Termal Döngü Protokolü ..	98
Çizelge 4.31 5x HotFirepol Blend Master Mix (12.5 Mg) PCR Reaksiyon Protokolü ..	99
Çizelge 4.32 5x HotFirepol Blend Master Mix (12.5 Mg) Termal Döngü Protokolü	99
Çizelge 4.33 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, 1. Kütüphane Karışım Hesaplama Tablosu	110
Çizelge 4.34 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, 2. Kütüphane Karışım Hesaplama Tablosu	111
Çizelge 4.35 22.03.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	112
Çizelge 4.36 02.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	113
Çizelge 4.37 03.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	114
Çizelge 4.38 04.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	115
Çizelge 4.39 05.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	116
Çizelge 4.40 06.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	117
Çizelge 4.41 07.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	118
Çizelge 4.42 08.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	119
Çizelge 4.43 10.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	119
Çizelge 4.44 11.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	121
Çizelge 4.45 12.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	122
Çizelge 4.46 16.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	123
Çizelge 4.47 17.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	124
Çizelge 4.48 18.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	125
Çizelge 4.49 19.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	126
Çizelge 4.50 20.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	127
Çizelge 4.51 23.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	128
Çizelge 4.52 24.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	129
Çizelge 4.53 25.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	130
Çizelge 4.54 26.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	131
Çizelge 4.55 27.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	132
Çizelge 4.56 16.08.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.	133
Çizelge 4.57 Kuş Gözlemi ile Tespit Edilen Aves Sınıfı Tür Listesi.	135
Çizelge 4.58 Gözlemlenen Türler 12S Veri Tabanı Bilgisi	137
Çizelge 4.59 1-10 Okuma Sayısı ile Eşleşen Tür Listesi.....	138
Çizelge 4.60 10 ve Üzeri Okuma Sayısı ile Eşleşen Tür Listesi.....	139

1. GİRİŞ

Ülkemiz sınırları içerisinde 7 coğrafi bölge bulunmaktadır. Her coğrafi bölge sahip olduğu iklim, flora, fauna ve topoğrafya açısından birbirlerinden farklılık göstermektedir (Magnin ve Yazar, 1997). Bu farklılıklar biyolojik çeşitliliğimizi arttırarak her bölgeyi kendine özgü flora ve fauna bakımından birbirinden ayırır. Dünyadaki biyoçeşitliliğin 25 sıcak noktasından (olağanüstü biyolojik çeşitlilik barındıran ve insanlar tarafından tehlike altına sokulan önemli doğa alanları) 3'ü de ülkemiz sınırları içerisinde (Thacker 2004). Ayrıca dünya flora bakımından 37 farklı bölgeye ayrılmaktadır. Türkiye bu bölgelerin 3'ünü de kapsamaktadır ve ülkemizde binlerce tür için yaşam alanı sağlayan 305 önemli doğa alanı tanımlanmıştır. 135 tanesi uluslararası öneme sahip sulak alanlar olup bunlardan 91 tanesi ise kuşlar için önemli sulak alanlardır (Eken 2006). Sulak alanlar tropik ormanlardan sonra en çok biyoçeşitlilik barındıran habitatlardır. Ülkemizde bulunan sulak alanların koruma altında olmasının en önemli sebeplerinden biri Anadolu'nun iki önemli göç yolu üzerinde bulunmasıdır. Anadolu, Kuzey Avrupa ve Afrika'dan göç eden kuşlar için yuvalama, konaklama ve geçiş bölgesidir. Uygun iklim koşulları ve besin bolluğu sayesinde ülkemiz avifauna açısından zenginliğe sahiptir. Yılda yaklaşık olarak 480 ve üzeri kuş türü gözlemlenmektedir. Türkiye kuş kayıt komitesi toplan tür sayını 485 olarak açıklamıştır (Boyla 2018).

Kuşlar ekolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Predatör olarak omurgalı, omurgasız ve bitki popülasyonlarının dengesinde, tozlaşma ve tohumların taşınmasında, bir habitattan başka bir habitata besin taşınmasında, bazı türlerin indikatör tür olması gibi temel ekolojik roller oynarlar (Clout ve Hay 1989, Sekercioglu 2006). Ancak son yıllarda kuş popülasyonları tahmin edildiğinden daha hızlı olarak yok olma sürecindedir (Şekercioglu vd. 2004). Her yıl bilinçsiz ve kaçak avlanma, suların kirletilmesi, kışlama, göç ve yaşam alanlarının tahribatı gibi nedenlerden kaynaklanan habitat kaybı kuş popülasyonlarını önemli ölçüde azaltmaktadır (Şekercioglu vd. 2011, Tabur ve Ayvaz 2010).

Tüm Avrupa ülkeleri arasında üreyen ve yuvalayan kuş türleri en çok Türkiye'dedir (Şekercioglu vd. 2011). Ülkemiz zengin avifaunaya sahipken kuşların yayıldıkları alanları ve popülasyon yoğunluklarını takip etmek önemlidir.

Ülkemizde kuş türlerinin tespiti gözlem yoluyla yapılmaktadır ve bunun için çeşitli kuş gözlem metotları kullanılmaktadır. Bir bölgedeki bütün kuşları tespit etmek için iyi bir

kuş gözlemcisi olmak gerekir. Doğru zaman ve doğru yerde olmakta önemlidir. Bazı gözlemciler kısa görüş süresinde ve sesle tanım yapabilmektedir. Böyle durumda bile bazı türleri kaçırmak mümkündür. Ayrıca daha önce arazi tecrübesi bulunulmayan alanlarda gözlem yapmak günler sürebilir. Böyle durumlarda yerel halktan ya da çift olarak kuş gözlemi yaparak verileri karşılaştırmak faydalı olabilir. Bazı kuş türleri günün belli saatlerinde aktif olmaktadır. Gözlem yaparken bu durumu dikkate almak önemlidir (Robinson 2006). Gözlem uygun ölçeklerde dürbün, teleskop veya fotoğraf makinesi yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Gözlem ve sayım yöntemi olarak nokta sayım yöntemi, transekt ve rastgele gözlem metotları kullanılmaktadır (Jones 2001). Belli bir alan içinde belli bir sürede kuş türleri gözlemlenir ve türler sayılır genellikle kuş kayıt defterine not alınır. GPS cihazı kullanılarak konumlar kaydedilir.

Anadolu, kuşların Avrupa-Afrika ve Afrika-Asya göç yolu üzerinde köprü oluşturmaktadır. Bu önemli göç rotası sayesinde ülkemizde hemen hemen her yıl yeni kuş türleri gözlemlenmektedir (Trakuş 2018). Her yıl popülasyonları küresel ölçekte azalan göçmen ve yerel kuş türlerini tespit etmek ekolojik denge için çok önemlidir. Yeni türlerin ya da uzun zamandır kayıt altına alınamayan türlerin ülkemizi göç yolu olarak tercih edip etmediğini takip etmek rastlantısal ve zor bir süreçtir. Genellikle kuşlar yuvalama, beslenme ve dinlenme bölgeleri olarak sulak alanları tercih ederler. Bu alanlardan bazıları kuş cenneti statüsünde geri kalan önemli doğa alanları ise koruma altındadır.

Çağımızda yaşanan yeni bilimsel gelişmelerle hedef türler, biokütle, biyoçeşitlilik, istilacı türler, birey yoğunluğu tahmini ve nesli tükenmekte olan canlıları daha hassas, habitatlarına, canlıya zarar vermeden ve geleneksel yöntemlere göre iş gücü, zaman ve maliyet bakımından daha avantajlı olarak kısa bir sürede moleküler tekniklerle tespit etmek mümkün hale gelmiştir (Ficetola vd. 2008, Thomsen ve Willerslev 2015, Barnes ve Turner 2016, Takahara vd. 2019). Bu yeni moleküler tekniklerden biri olan Çevresel DNA (eDNA) yöntemi DNA'nın çevresel ortamdan (su, toprak, hava, sediment gibi) ekstrakte edilmiş halidir (Thomsen ve Willerslev 2015). eDNA'yı izole etmek için; DNA'yı tutabilen özel filtreler yardımıyla sudan eDNA filtre edilir ve filtreden ekstrakte edilen eDNA daha sonraki süreçte tür tespiti için PCR, indeks ve kütüphane oluşturulması, yeni nesil dizileme ve biyoinformatik aşamalarına tabi tutulur (Spens vd. 2017).

eDNA çalışmalarında tür teşhisi için en geçerli moleküler teknik olarak kabul edilen DNA metabarkodlama yöntemleri kullanılmaktadır. Tr teşhisi için en güncel moleküler teknik olan DNA barkodlama standardize edilmiş kısa DNA bölgeleri kullanılarak yapılan moleküler tanımlama yöntemidir (Hebert vd. 2003a). Mitokondriyal (bitkilerde kloroplast) genomda bulunan bu kısa gen bölgeleri sayesinde canlının kolaylıkla ve ekonomik olarak tür ayrımı yapılabilir. Hayvanlar için en yaygın kullanılan, mitokondriyal sitokrom oksidaz alt nite I geninin 658 baz çiftlik kısmı veya “DNA barkodu” olarak bilinen bölgesidir (Hebert vd. 2003, Ji vd. 2013). Metabarkodlama ise tek bir evresel DNA rneğinde çoklu tür tespiti yapabilen bir yöntemdir. Bu yöntem için Yeni Nesil Dizileme (NGS) platformu kullanılmaktadır. Bu yeni platformlar tek bir deneyde milyarlarca dizi okuması sağlayabilirler. Özellikle biyoçeşitlilik çalışmalarında Sanger dizileme yöntemine göre hata oranı ve maliyeti daha düşüktür (Metzker 2010). NGS ncesi kullanılan tek aşamalı PCR yönteminde primer dizisinin ileri ve geri dizilerinin 5’ ucuna farklı kombinasyonlarda 5-8 arası nükleik asitler ve belirsiz baz (N (A, T, G, C)) dizileri (1-4 arası) eklenir. Kullanılacak primerler bu şekilde dizilendikten sonra tek aşamalı PCR gerçekleştirilir (Valentini vd. 2016). Saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra kullanılacak platform ve cihazın adaptör dizileri ligasyon yöntemiyle dizilerin 5’ ucuna eklenir ve örnekler dizilenmek üzere kuyulara yüklenir. Bu yöntemin avantajı düşük kopya sayısı ve düşük konsantrasyonlu örneklerde PCR amplifikasyon oranını arttırmasıdır. Bu avantajından dolayı eDNA yönteminde kullanılması elde edilen okuma sayılarının kalitesini arttıracaktır (Taberlet vd. 2018). Ayrıca ikili PCR yöntemine göre maliyeti yarıya indirmektedir. Metabarkodlama çalışmalarında ham veri farklı dosya formatlarında çıktı olarak ulaşır. Bu aşamadan sonra örnekler biyoinformatik iş akışında filtrelenerek referans veri tabanlarıyla(yerel veri tabanı, NCBI, EMBL) eşleştirilir ve sonuç çıktısı elde edilir (Boyer vd. 2016).

Bu tez ile moleküler bir teknik olan eDNA metabarkodlama yönteminin göçmen kuşların teşhis edilmesindeki etkinliğini ortaya koyulması amaçlanmıştır. Ayrıca yoğun göç dönemi olan Nisan ayında günlük örnekleme yapılarak bunun öncesi ve sonrası olan Mart ve Ağustos aylarında eDNA rneği alınmıştır. Sulak habitattaki türlerin tespiti günümüzde eDNA yöntemiyle yapılmakta ve daha önce avlama ya da gözlem yoluyla tespit edilemeyen yeni türlerin bu teknikle ortaya koyulduğu bilinmektedir. Ülkemizde yalnızca gözlem yoluyla tespit edilen göçmen kuş türlerinin, daha kesin ve objektif

(görsel yorumlama olmaksızın) olarak tür seviyesinde tanımlanması, özellikle çok az sayıda ve kısa süreli bulunduğu için görsel olarak tespit edilemeyen türlerin de kayıt altına alınması gerekmektedir. Bu nedenle günümüzde bilimsel literatürde sıklıkla kullanılmaya başlayan eDNA yöntemini kullanarak, Konya, Kulu Uyuz Gölü'ndeki göçmen sulak ve suyla bağlantılı kuşları moleküler olarak tür seviyesinde bu tez ile tanımlaması amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Sulak Alanlar ve Kuş Gözlemi

Tatlı su ekosistemleri; biyolojik çeşitlilik, ekonomik, bilimsel araştırma ve kültürel olarak çok önemli olan doğal veya yapay kaynaklarımızdır. Bu kaynakların korunması çevredeki arazi, su altı ve su üstü biyolojik çeşitlilik açısından büyük önem taşımaktadır. Sulak alanlar kirlilik, küresel ısınma, iklim değişikliği ve istilacı türler gibi nedenlerle biyoçeşitlilik açısından büyük tehdit altındadır (Dudgeon vd. 2006).

Sulak alanlar ekolojik açıdan en zengin habitatlardır. Omurgasız, omurgalı, kabuklu, alg ve bitki gibi çok fazla makro ve mikro canlıları barındırırlar. Zengin habitat olma özelliğinden dolayı çok fazla kuş türüne ev sahipliği yapmaktadırlar. Günümüzde sulakalanlar koruma altına ve geri kazanılmaya çalışılsa da geçmişte insan etkisinden dolayı çoğu tarım arazisi için kurutulmuş ve kirlenmiştir (Urry vd. 2017).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de sulak alanlar büyük önem taşırlar. İran'ın Ramsar şehrinde 1971 yılında imzalanan Ramsar Sözleşmesi (Özellikle Su Kuşları Yaşama Ortamı Olarak Uluslararası Öneme Sahip Sulak Alanlar Hakkında Sözleşme) 1994 yılında taraf olduğumuz, 2002 yılında ise ülkemizde hayata geçirilmeye başlanmıştır. Ülkemizde toplamda 13 Ramsar alanı ve 122 uluslararası öneme sahip Ramsar alanı olma özelliğinde sulak alan bulunmaktadır. Ekolojik açıdan bu kadar önemli doğa alanlarımız varken sulak alanlarımız tehlike altındadır. Sulak alanlar yeraltı sularını beslerler ya da boşaltırlar, olası sel baskınlarını önlerler, tarım, kültürel ve turizm açısından önemlidir, hayvancılık, suyun filtre edilmesi, iklim değişikliği kontrolü gibi doğada ve insanlar için önemli etkenleri vardır (WWF 2008, Eken 2006).

Ülkemizde 1,2-1,5 milyon hektar sulak hektar bulunmaktadır. Türkiye sulak alanlarının yarısını kaybetmesine rağmen hala çok önemli sulak alanlara sahiptir. Özellikle su kuşları ve göçmen kuşlar için sulak ekosistemlerin hepsi göç yolu üzerinde konaklama, üreme ve beslenme kaynaklarını sağlayan habitatlardır (Eken 2006).

Sulak alanlar, karasal, denizsel ve kıyısız yaşama ortamlarını bir araya getiren ekosistemlerdir. Sulak alanlar sahip oldukları 3 özellik ile ayırt edilmektedirler. İlk olarak, sulak alan hidrolojisi. Bu durumda suyun ortamda bulunması gerekir. İkinci olarak, fizikokimyasal çevre. Kendine özgü toprak yapısının olması gerekir. Üçüncü

olarak, biyolojik çeşitlilik. Sulak alanlara uyum sağlamış canlıların tümüdür. Ülkemizde sulak alanlar 7 ana gruba toplanmıştır. Haliç ve deltalar, tatlı su bataklıkları, göller, kıyısız sulak alanlar, turbalıklar, nehir ve taşkın ovalar ile insan yapısı sulak alanlar. Ülkemizde bu kadar çeşitli ve önemli sulak alanlar varken, 4 ana kuş göç yolunun 2'si ülkemiz üzerinden geçmektedir. Bu nedenle sulak alanlar, için pek çok kuş türünün neslinin devamlılığı için kilit öneme sahiptir. Ülkemizdeki sulak alanların korunması çalışmaları 2872 sayılı Çevre Kanunu ve 1994 yılında taraf olduğumuz Ramsar Sözleşmesi (Özellikle Su Kuşları Yaşama Ortamı Olarak Uluslararası Öneme Sahip Sulak Alanlar Hakkındaki Sözleşme) kapsamında Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nce yürütülmektedir (Cowardin 1979, Anonim 2004, Meriç 2013, Anonim 2017).

Türkiye'de ilk kuş gözlemi İstanbul kıyılarında Belon (1555) tarafından kayda alınmıştır. Daha sonra Ergene (1945) Türkiye kuş türlerinin ilk bilimsel çalışması olan "Türkiye'nin Kuşları" adlı çalışmayı yayımlamıştır. Sonraki yıllarda ise kuşların gözlemi ile ilgili çalışmalar artış göstermiştir. Kuş türleri konakladıkları habitatlarda yalnızca gözlem yoluyla tespit edilebilmektedirler. Gözlem karada veya su üzerinde başlar (McFadden vd. 2017).

Kuş gözlemi dolaylı ve doğrudan olmak üzere ikiye ayrılır. Dolaylı gözlem metodunda kuşların yuvalarından, morfolojik özelliklerinden, ötüş farklılıklarından, uçuş özelliklerinden, bıraktıkları pelet ve ölü bireylerden faydalanarak yapılan gözlem türüdür. Doğrudan gözlemde ise nokta sayım yöntemi, transekt ve rastgele gözlem metotları kullanılmaktadır. Kuş gözlemi için en önemli faktörler zaman, gün, sezon ve hava durumudur (Bibby vd. 1998).

Kuş gözlemi hem çok uzun zaman alan hem de ekonomik açıdan maliyeti çok yüksek olan bir yöntemdir. Ülkemizde eğitimli kuş gözlemcisi sayısı oldukça azdır. Bunun nedeni teknik ve ekonomik yetersizliktir (Arslangündoğdu, 2006). Günümüzde sulak ekosistemlerde yaşayan canlıların tespitinde başarıyla uygulanan eDNA yöntemi ile kuşların varlığını tespit etmek de mümkündür (Thomsen vd. 2012, Ushio vd. 2018).

2.2 Çevresel DNA (eDNA)

Çevresel DNA yöntemi makrobiyota tespitinde ilk kez dışkı ile yapılan bir çalışma ile başlamıştır (Höss vd. 1992). Daha sonra sediment analizi ile bitki ve hayvan DNA'ları tespit edilmiştir (Willerslev vd. 2003). Daha sonra Ficetola (2008) ilk suyla bağlantılı makrobiyota eDNA çalışmasını gerçekleştirmiş ve çevresel DNA ile ilgili pek çok çalışma geçmişte ve günümüzde artış göstererek devam etmektedir.

Keskin (2014) tarafından gerçekleştirilen ve ülkemizde yapılan ilk eDNA uygulaması olma özelliği taşıyan çalışmada hedef canlı olarak istilacı balık türleri seçilmiştir. İstilacı tatlısu balık türlerinin tespitinde eDNA tekniği kullanılmış ve geleneksel yöntemlerle tespit edilen bu türlerin sonuçları eDNA tekniğiyle karşılaştırılıp daha önce istilacı türlerin varlığı tespit edilmeyen bölgelerde bu türlere ilişkin küçük popülasyonlar tespit edilmiştir.

eDNA sayesinde nesli tükenmekte olan türleri, biyoçeşitliliği, diyet analizlerini, patojenik türleri, istilacı ve daha önce tespit edilemeyen düşük popülasyon büyüklüklerine sahip istilacı türleri geleneksel yöntemlere göre zamandan ve iş gücünden tasarruf ederek ayrıca düşük maliyetli bir şekilde kısa sürede tespit edilmektedir (Bohmann vd. 2014). Bohmann vd. (2014); Çevresel DNA'nın tür tanımlama etkinliğinin yanı sıra istilacı türleri, nesli tehlike altındaki ve tespiti zor olan türlerin tespitinde başarılı sonuçlar verdiğinden bahsetmektedir. Özellikle ekolojik ve evrimsel süreçlerin izlenmesinde etkili bir yöntem olduğunu vurgulamaktadır.

Pek çok durumda yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemler biyoçeşitliliği belirlemede yetersiz kalmaktadır. Günümüzde tehdit altındaki, endemik, nadir veya istilacı türlerin tespitinde veya daha kapsamlı biyoçeşitlilik çalışmalarında güvenilirliği daha yüksek, düşük maliyet ve daha az iş gücü gerektiren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Thomsen ve Willerslev 2015). Thomsen ve Willerslev (2015); gerçekleştirdikleri çalışmada dünya üzerindeki biyoçeşitliliğin sürekli düşüş halinde olduğu, biyoçeşitlilik durumu ve dağılımı hakkındaki önemli bilgi eksiklikleri bulunduğunu vurgulamaktadır. Geleneksel yöntemlerin yetersizliği, tespit aşamalarının uzunluğu ve yaşam evrelerinden dolayı bazı türlerin doğru tanımlanamaması gibi nedenlerle biyoçeşitlilik tespiti ve korunumu konusunda eksikliklerden söz edilmiştir. Bu nedenle eDNA gibi büyük ölçekli, örnekleme kolay, hassas, düşük maliyetli, son derece

hızlı sonuç veren ve sürekli gelişen bir teknolojinin bu sorunu çözmede uygun bir aday olabileceğinden bahsedilmiştir.

Türler arasındaki farklılıkları geleneksel yöntemler ile tespit etmek, farklı yaşam evrelerinde ve özellikle morfolojik özellikler bakımından çok benzer türler arasında zordur ve uzun tecrübeler sonucunda kazanılmış yüksek seviyede taksonomik uzmanlık gerektirmektedir ve bu uzmanlığı her takson için ulaşmak her zaman mümkün olmamaktadır. Büyük ölçekli ekosistem ölçeğinde yapılan araştırmalar pahalı ve zaman alıcı süreçlerdir. Bununla birlikte, moleküler tür tespit tekniklerindeki son gelişmeler sayesinde, özellikle çevresel DNA (eDNA) yöntemi ile habitat biyoçeşitliliğini tespit etme araştırmalarını çok daha düşük bütçe, iş gücü, zaman ve daha yüksek kesinlik ile gerçekleştirmek mümkündür (Bista vd. 2017).

Serbest DNA doğada; ölü hücre, kan, idrar, dışkı, yumurta, sperm, yaprak, meyve, kök, polen ve bunun gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Doğaya salınmış halde bulunan genetik materyallerin tümüne çevresel DNA (eDNA) denilmektedir. eDNA tekniği tüm dünyada kullanım alanı artan, canlıların doğada bulunan (su, toprak, hava ve bunun gibi) serbest DNA'larını her türlü habitatından örnek alarak neredeyse tüm türleri moleküler düzeyde teşhis etmemizi sağlayan bir yöntemdir (Shogren vd. 2017).

Spens (2017) yapmış olduğu çalışmada eDNA'yı yakalamak için en uygun filtre, filtre içinde DNA degradasyonunu en düşük hıza indirmek için en iyi koruma solüsyonu ve eDNA izolasyon teknikleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kapalı filtre sistemi ile filtrasyonun (Sterivex), koruma solüsyonu için Longmire tamponu ve izolasyon tekniği olarak protokolü optimize edilmiş ticari bir kit olan "DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Stockach, Germany)" kiti en iyi sonuçları vermiştir.

Ushio vd. (2018), literatürdeki ilk hedef türün aves sınıfı olduğu bir çevresel DNA metabarkodlama çalışması gerçekleştirmişlerdir. Kuşlar, ekosistemlerin korunmasında benzersiz işlevsel rol oynarlar. Bu çalışmada, kuşların, ana habitatlarına bakılmaksızın, suyla sık temasla sahip olmaları gerektiği ve çevrede devam eden DNA'larını içeren dokuların (çevresel DNA; eDNA) kuş türlerinin varlığını tespit etmek için kullanılabileceğini gösterdiler. Bu amaçla, metabarcod kuş eDNA'sı için bir dizi evrensel PCR primerleri olan MiBird primer çiftlerini tasarladılar ve kuş dokularından elde edilen DNA'larla primerlerin işlevselliğini doğruladılar. Tür kompozisyonunu bilinen kuşların,

hayvanat bahçesinden su örneklerinin analizi gerçekleştirildi. MiBird primerlerin kullanılmasının kuş türlerini su örneklerinden başarıyla saptayabileceğini gösterdiler. Ayrıca, doğal bir göletten toplanan su örneklerinin analizi ile örnekleme alanlarında ortak beş kuş türü tespit edildi. Mevcut bulgular, kuş eDNA metabarkodlamasının kuş türlerinin gözleminin zor olduğu durumlarda tamamlayıcı bir tespit / tanımlama aracı olacağını yapmış oldukları çalışmada gösterdiler.

2.3 DNA Barkodlama

DNA barkodlama standardize edilmiş bir gen bölgesidir. İlk kez Hebert vd. (2003a, 2003b, 2004) tarafından moleküler tür tanımlama tekniği olarak geliştirilmiştir. Tür tanımlamada hayvanlar için evrensel kabul edilen mitokondriyal sitokrom c oksidaz I (COI) geninin yaklaşık 650 baz çifti uzunluğundaki bölgesi, hayvanların tür tanımlamasını hızlı, ekonomik ve basit bir şekilde gerçekleştirilmesinde en çok kullanılan moleküler belirteç durumundadır (Hebert vd. 2003a, Hebert vd. 2003b, Hebert vd. 2004). 2004 yılında başlayan barkodlama çalışmaları 2007 yılında The Barcode of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham ve Hebert 2007) veri tabanının hayata geçmesiyle gelişmeye başlamıştır. Dünyada az sayıda bilim insanı canlıların tür ayrımını yapabilmektedir. Bazı türler bulunduğu ekolojik şartlarda morfolojik farklılık göstermektedir ya da juvenil formda türlerin tür ayrımına gidilememektedir. DNA barkodlama tekniği ise, yeni türlerin keşfedilmesini hızlandırma, taksonomik bilgi ile eşleştirme, kayıt altına alınan barkod bilgilerinin araştırmacılar için hazır bulundurması gibi avantajlar vardır (Miller 2007).

Türler için yapılan DNA barkodlama çalışmalarında, ülkemiz ve dünyada genetik materyalin ekstraksiyonu için kan örneği ya da doku alınmaktadır (Bilgin vd. 2016; Johnsen vd. 2010). Moleküler analizleri yapılan bu örnekler için tür tanımlama aşamasında canlı grubuna ait evrensel primerler kullanılmakta ya da türe spesifik primerler tasarlanmaktadır. Ayrıca elde edilen PCR ürünlerinin her biri için tek tek Sanger dizileme yapılmaktadır. Sanger dizileme PCR ile çoğaltılan milyonlarca kopyası oluşturulan DNA'nın bir dizi zincir sonlanma reaksiyonuna tabi tutulup, floresan boyalı 3'OH grubu bulunmayan nükleotidlerin verdiği ışığa sayesinde kimyasal ve yazılımsal işleme tabi tutularak barkodlanan türün genetik dizisinin biyoinformatik analizlerle tespit

edilerek sonuçlanmasıdır. Her bir analiz için tek tek yapılan bu işlem hem uzun vakit alan hem de maliyetli olan bir süreçtir.

Hebert vd. (2004) yapmış olduğu çalışmada mitokondriyal genin yaklaşık 648 baz çiftlik bölgesini oluşturan COI kısa dizisinin hayvan türlerinin tanımlanmasında bir DNA barkod olabileceğini ve 260 farklı kuş türünden yapmış olduğu barkodlama çalışmasıyla bu gen bölgesinin hem başarılı olarak türleri teşhis edebildiği hem de türlerin ayrımını yapabildiği ayrıca yeni türlerin keşfedilmesinde kullanılabileceğimiz bir yöntem olduğunu çalışmalarında göstermişlerdir. Tasarlamış oldukları evrensel kuş barkod primerleri ile kuş barkodlama çalışmalarının etkinliğini arttırmışlardır.

Bilgin vd. (2016); Aras Nehri boyunca en az 264 kuş türünün üreme alanı olan Aras Nehri Kuş Cenneti kara kuşlarının genetik çeşitliliğini tespit etmek için DNA barkodlama yöntemini kullanmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin, DNA barkodlama tekniğinin filocoğrafya çalışmaları ile birlikte kullanılabileceğini göstermiştir.

2.4 Metabarkodlama

Geleneksel DNA dizi analizi yöntemi (Sanger vd. 1977), örnekleri yalnızca tek tek dizilebilir ve özellikle büyük ölçekli çalışmalar ve çevresel örneklerin (eDNA) tespiti için yetersizdir. Bir çevresel DNA örneklemede bulunan birden fazla türün DNA dizilerinin aynı anda elde edilmesi için, DNA'yı paralel olarak çoklu okuma yeteneğini gerektirir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin etkili bir şekilde yaptığı ve maliyetleri Sanger DNA dizileme yöntemine göre düşüren bir yöntemdir (Shokralla vd. 2012). Dudgeon vd. (2006) yapmış oldukları çalışmada dünya üzerindeki tatlı su ve iç suların biyolojik çeşitliliğinin öneminden, tehdit altında olduğu unsurlardan ve korunması için yapılması gerekenlerden bahsetmektedir. Çalışma sonucunda dünyada çok az alan kaplayan tatlı su habitatlarının korunması için değerlendirmeler sunulmuştur yeni nesil dizileme yöntemlerinin sunduğu olanakların sucul ekosistemlerin izlenmesinde büyük kolaylıklar sunduğu belirtilmiştir.

Yeni Nesil Dizileme teknolojisi ise (NGS), son yıllarda geliştirilen ve bilim dünyasında yapılan birçok çalışmada Sanger dizileme tekniğinin yerini alan yeni bir yöntemdir. NGS olarak adlandırılan bu yeni teknoloji Sanger dizileme yöntemine göre çok daha hızlı,

ekonomik ve yüksek doğrulukta dizileme yapmaktadır. NGS teknolojisinde katı bir yüzey üzerinde küçük parçalara ayrılan DNA dizilerinin uçlarına adaptörler takılarak katı yüzeyde bulunan boncuklara sabitlenip paralel olarak birçok reaksiyonun gerçekleştirildiği ve takılan adaptörler sayesinde DNA kütüphanesinin oluşturulduğu bir yöntemdir. Her bir DNA'yı yakalayan boncuklardaki ayrı ayrı dizileri okunur ve daha sonra biyoinformatik yöntemlerle yan yana dizilenerek referans dizilerle eşleştirilir (Metzker, 2010). Metzker (2010)'a göre, büyük miktarda dizi verisini ucuz ve hızlı şekilde üretebilen, geleneksel yöntemlere göre avantaj sağlayan yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerini kullanarak örneklerin hazırlanma, dizileme, görüntüleme ve genom hizalama gibi NGS'de kullanılan son yöntemleri teknik bir biçimde açıklamakta olup biyoçeşitlilik tespitinde geleceğin bu yöntem ile entegre edilecek çalışmalardan oluşacağı çıkarımını paylaşmaktadır.

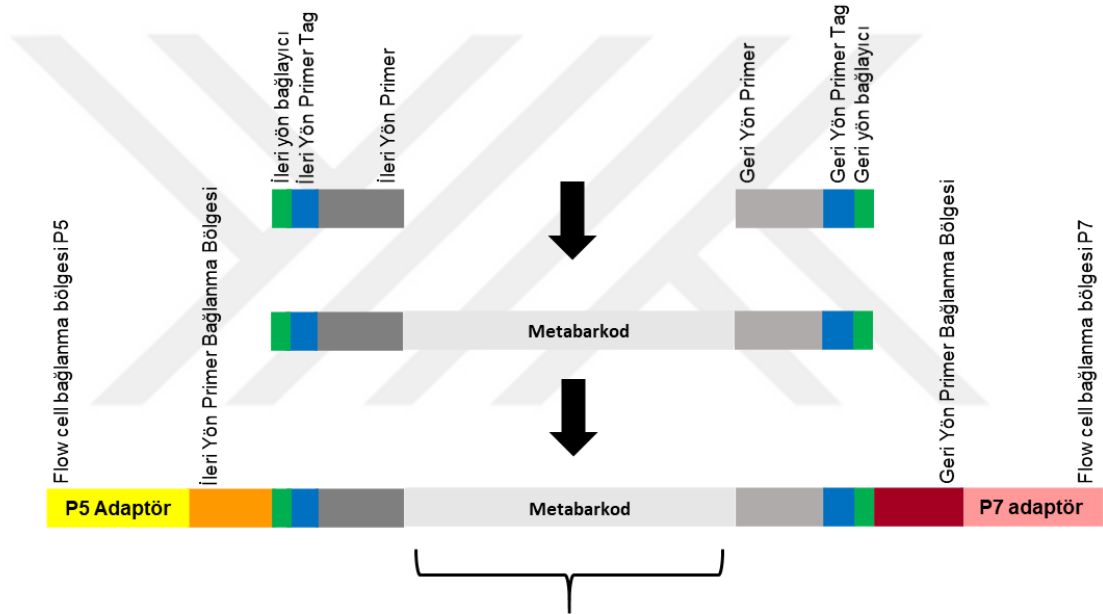
“eDNA barkodlama (türe spesifik tespit)” ortamdaki tek bir türü tespit etmeyi amaçlayan bir yöntemdir. Aynı zamanda bir ekosistemde örneklenmiş, mevcut olması muhtemel türler hakkında önceden bilgi sahibi olmadan çevresel bir ortamdan birden fazla taksonu eşzamanlı olarak eDNA metabarkodlama ile tanımlanmak mümkündür (Valentini vd. 2016). NGS teknolojisi ile tek bir reaksiyonda birden fazla türün metabarkodlaması yapılarak tek bir örnekten farklı canlı gruplarını aynı anda tespit etmek mümkündür (Carew vd. 2013). eDNA metabarkodlama yönteminin karasal ve sucul ekosistemlerde mevcut olan biyoçeşitliliği izlemede başarılı ve uygulaması kolay bir yöntem olduğu birçok bilimsel çalışma ile ortaya konulmuştur. eDNA metabarkodlama çalışmaları ile diyet analizi çalışmaları (Pompanon vd. 2012, McInnes vd. 2017, Kowalczyk vd. 2019), biokütle, sucul ekosistemlerde popülasyon yoğunluğu çalışmaları (Doi vd. 2017), istilacı tür tespiti (Keskin 2014), denizel ve tatlısu ekosistemlerinde biyoçeşitlilik tespiti (Thomsen vd. 2012, Elbrecht vd. 2017, Boussarie vd. 2018, Zulkefli vd. 2019) gibi birçok araştırma yapılmaktadır. Özellikle Bista vd. (2017), hedef tür olarak makro omurgasızların seçildiği eDNA çalışmasında; biyoçeşitlilik tespitinde eDNA'nın etkinliğinden ve metabarkodlama yöntemi kullanılarak eDNA'nın zamansal olarak mevsimsel çeşitliliği izlemedeki kalıcılığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Makalenin sonucunda, göl sisteminden bir yıl boyunca alınan su örnekleri (eDNA) sonuçlarının klasik taksonomide belirlenmiş mevsimsel sonuçlarla paralellik gösterdiği, hatta birçok yeni türün varlığını ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır. Makalenin bulguları, Tatlısu

eDNA'sının biyolojik izleme ve biyoçeşitlilik gibi ekosistem fonksiyon ilişkilerinin gelecekte araştırılmasında ekolojik olarak önemli olduğu sonucuna dikkat çekmektedir.

eDNA izolasyonu yapılan kalıp DNA'lar biyoçeşitlilik çalışmalarında canlı gruplarına spesifik evrensel metabarkodlama primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmaktadır (Ushio vd. 2018).

Kütüphane basamağında metabarkodlama çalışmaları için üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler çalışmanın amacı ve araştırmacıların tercihinine göre kullanılmaktadır. İlk olarak Illumina adaptörleri ile tek aşamalı PCR yöntemi. Bu yöntem, kullanılacak primer dizilerinin 3' ucunda P5 dizisi ve 5' ucunda P7 dizisi içeren uzun primer dizileridir. Bu yöntemin avantajı iki aşamalı PCR yapmadan veya adaptörleri (P5 ve P7) ligasyon yöntemiyle birleştirmeden örnekler direkt cihaza yüklemeye hazırdır ve örnekler arası tag sıçramasını ve kontaminasyonu önler (Schnell vd. 2015). Dezavantajı ise P5 ve P7 adaptör dizilerini içeren primer dizilerinin Illumina platformunda kullanılacak tek bir cihaza spesifik olmasıdır. İkinci yöntem ise iki aşamalı PCR metodu. Bu yöntem eDNA metabarkodlama çalışmalarında sıklıkla Illumina platformunda kullanılmaktadır. İlk PCR aşaması, indeks primer dizileri ile gerçekleştirilmektedir. İkinci PCR aşamasında ise indeks dizilerine flowcell bağlanma bölgeleri (P5 ve P7 adaptör dizileri) PCR ilk aşamada gerçekleştirilen PCR ürünlerine eklenir (5' ve 3' uçlarına). Bu yöntemin dezavantajı örnekler arası PCR kontaminasyon riskinin fazla olması ve maliyetinin fazla olması. Her bir örnek için tek tek kütüphane hazırlanması gerekmektedir. İki aşamalı PCR yönteminde de indeks ve adaptör (P5 ve P7) dizileri Illumina platformunda kullanılacak tek bir cihaza uyumludur. Üçüncü yöntem ise Tagli primerler ile tek aşamalı PCR yöntemi. Tek aşamalı PCR yönteminde primer dizisinin ileri ve geri dizilerinin 5' ucuna farklı kombinasyonlarda 8 adet nükleik asit eklenir. Tasarlanan bu kısa dizilere moleküler etiket (tag) denir. Tez çalışması için 36 farklı tag, OligoTag programı kullanılarak tasarlanmıştır (<https://pythonhosted.org/OBITools/scripts/oligotag.html?highlight=oligotag#module-oligotag>). Tasarlanan her 8 nükleotitlik tag, birbirlerinden en az 3 nükleotid farklıdır. Tagler tasarlandıktan sonra okuma kalitesini arttırmak, indeks dizilerinin degradasyonunu önlemek ve aynı zamanda her dizileme döngüsünde okuma sayısını artırmak için taglerin başına en az bir adet belirsiz nükleotidler eklenir (N). Tagler tasarlandıktan ve belirsiz nükleotidler eklendikten sonra primer dizisinin 5' ucuna eklenir

(NN+Tag+Primer). Bu yöntemin avantajı düşük kopya sayısı ve düşük konsantrasyonlu örneklerde PCR amplifikasyon oranını arttırmasıdır. Bu avantajından dolayı eDNA yönteminde kullanılması elde edilen okuma sayılarının kalitesini arttırmaktadır. Ayrıca ikili PCR yöntemine göre maliyeti yarıya indirmektedir. Bir diğer avantajı ise taglerin örnek kuyuları arası sıçrama ve kontaminasyon oranı çok düşüktür (Willerslev vd. 2014, Valentini vd. 2016, Taberlet vd. 2018, Zizka vd. 2019).



Şekil 2.1 Tagli Primerler ile Tek Aşamalı PCR Yöntemi

3. METARYAL ve YÖNTEM

3.1 Arazi Çalışması

Tez arazi çalışması Mart, Nisan ve Ağustos ayları içerisinde Konya ilinin Kulu ilçesine bağlı Kömüşini mahallesinde bulunan Uyuz Gölü'nde (39°14'33"N, 32°55'30"E) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Mart ayında, 22.03.2018 tarihinde ön arazi gerçekleştirilmiştir ve 4 adet sterivex filtre (2611, 2612, 2613, 2614 numaralı örnekler) ile örnek alınmıştır. Nisan ayında ise 02.04.2018-27.04.2018 tarihleri arasında (hafta sonları ve yağmurlu günler hariç) sudan 28 adet sterivex filtre (2615- 2642 numaralı örnekler) ile eDNA örnekleme yapılmıştır. Ağustos ayında ise yuvalayan ve kalıcı kuş popülasyonunu tespit etmek ve göç dönemi verisi ile (mart ve nisan ayı örnekleme) karşılaştırmak için 18.08.2018 tarihinde arazi yapılmıştır ve 4 adet sterivex filtre (2850, 2851, 2852, 2853 numaralı örnekler) ile örnek alınmıştır. Arazi örnekleme için Uyuz Gölü şekil 2.1'de gösterildiği gibi 4 bölgeye ayrılmıştır. Her bir bölgeden rastgele su örnekleri alınarak 5L'lik karışım plastik şişelerinde toplanmıştır. 22.03.2018, 02.04.2018, 03.04.2018, 04.04.2018 ve 18.08.2018 tarihlerinde gerçekleştirilen arazi çalışmalarında bu dört karışım şişelerinden ayrı ayrı örnekleme yapılarak 4 filtre örneği sudan süzölmüştür. Diğer arazi günlerinde ise dört bölgeden rast gele alınan ve şişelerde toplanan su örnekleri tek bir karışım bidonunda birleştirilerek 1 adet örnek sudan filtre edilmiştir. Arazi örnek bilgileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Konya, Kulu, Uyuz Gölü Harita Görüntüsü



Şekil 3.2 Uyuz Gölü, 1



Şekil 3.3 Uyuz Gölü, 2



Şekil 3.4 Arazi Örnekleme Çalışmaları



Şekil 3.5 Arazi Filtrasyon Çalışmaları



Şekil 3.6 Arazi Örneklemeye Çalışmaları



Şekil 3.7 Arazi Filtreleme Çalışmaları



Şekil 3.8 Arazi Örnekleme Çalışmaları



Şekil 3.9 Arazi Filtreleme Çalışmaları

Çizelge 3.1 Arazi Örnek Bilgi Çizelgesi

Örnek Adı	Filtre Tipi	Örnek Arazi Bilgisi
2611	Sterivex (0.22 µm) Filtre	22.03.2018 tarihli arazi 1. istasyon
2612	Sterivex (0.22 µm) Filtre	22.03.2018 tarihli arazi 2. istasyon
2613	Sterivex (0.22 µm) Filtre	22.03.2018 tarihli arazi 3. istasyon
2614	Sterivex (0.22 µm) Filtre	22.03.2018 tarihli arazi 4. istasyon
2615	Sterivex (0.22 µm) Filtre	02.04.2018 tarihli arazi 1. istasyon
2616	Sterivex (0.22 µm) Filtre	02.04.2018 tarihli arazi 2. istasyon
2617	Sterivex (0.22 µm) Filtre	02.04.2018 tarihli arazi 3. istasyon
2618	Sterivex (0.22 µm) Filtre	02.04.2018 tarihli arazi 4. istasyon
2619	Sterivex (0.22 µm) Filtre	03.04.2018 tarihli arazi 1. istasyon
2620	Sterivex (0.22 µm) Filtre	03.04.2018 tarihli arazi 2. istasyon
2621	Sterivex (0.22 µm) Filtre	03.04.2018 tarihli arazi 3. istasyon
2622	Sterivex (0.22 µm) Filtre	03.04.2018 tarihli arazi 4. istasyon
2623	Sterivex (0.22 µm) Filtre	04.04.2018 tarihli arazi 1. istasyon
2624	Sterivex (0.22 µm) Filtre	04.04.2018 tarihli arazi 2. istasyon
2625	Sterivex (0.22 µm) Filtre	04.04.2018 tarihli arazi 3. istasyon
2626	Sterivex (0.22 µm) Filtre	04.04.2018 tarihli arazi 4. istasyon
2627	Sterivex (0.22 µm) Filtre	05.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2628	Sterivex (0.22 µm) Filtre	06.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2629	Sterivex (0.22 µm) Filtre	07.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2630	Sterivex (0.22 µm) Filtre	08.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2631	Sterivex (0.22 µm) Filtre	10.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2632	Sterivex (0.22 µm) Filtre	11.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2633	Sterivex (0.22 µm) Filtre	12.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2634	Sterivex (0.22 µm) Filtre	16.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2635	Sterivex (0.22 µm) Filtre	17.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2636	Sterivex (0.22 µm) Filtre	18.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2637	Sterivex (0.22 µm) Filtre	19.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2638	Sterivex (0.22 µm) Filtre	20.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2639	Sterivex (0.22 µm) Filtre	23.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2640	Sterivex (0.22 µm) Filtre	25.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2641	Selüloz Nitrat Filtre (0.22 µm) Filtre	26.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2642	Selüloz Nitrat Filtre (0.22 µm) Filtre	27.04.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2850	Sterivex (0.45 µm) Filtre	18.08.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2851	Sterivex (0.22 µm) Filtre	18.08.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2852	Sterivex (0.45 µm) Filtre	18.08.2018 tarihli arazi karşım istasyon
2853	Sterivex (0.22 µm) Filtre	18.08.2018 tarihli arazi karşım istasyon

Örnekler peristaltik pompa ve peristaltik pompaya uyumlu hortum kullanılarak sterivex (Millipore) marka 0.22 µm ve 0.45 µm (sadece 18.08.2018 tarihli arazide kullanılmıştır) por çapında kapalı sistem filtre kullanılarak filtre edilmiştir. Her filtreden filtre tıkanıncaya kadar su geçirilmiştir. Daha sonra filtre içerisine 2 ml koruma solüsyonu “Longmire” (Longmire vd. 1997) eklenmiştir. 2641 ve 2642 nolu örneklerin filtrelemesi diğer örneklerden ayrı olarak laboratuvarda selüloz nitrat filtre kullanılarak manifold filtrasyonu sistemi ile örnekler filtre edilmiştir. Örnekleme ekipmanları her arazi sonrası %10’luk çamaşır suyu ile steril edilmiştir.

3.2 Kuş Gözlemi

Kuş gözlemleri 39°14'28.0"N 32°55'23.9"E, 39°14'30.8"N 32°55'41.4"E ve 39°14'17.8"N 32°55'37.2"E koordinat noktalarında Nikon 50x optical zoom kamera ve 10x50 dürbün ile gerçekleştirildi. Gözlemler çizelge 3.1’de verilen arazi örnek bilgisi çizelgesindeki tarihlerle aynı gün gerçekleştirilmiştir.

3.3 Moleküler Analizler

3.3.1 Longmire solüsyonunun hazırlanması

Longmire solüsyonu her sterivex filtrenin içerisine 2 ml aktarılır. Solüsyonun amacı filtre içerisindeki DNA’nın uzun süreli korunumunu sağlamaktır.

1 litre Longmire DNA koruma solüsyonu hazırlamak için;

1. 50 ml 2M Tris-HCl, pH 8.0
2. 200 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0
3. 2 ml 5 M NaCl
4. 25 ml %20’lik SDS

Kimyasallar hazırlandıktan sonra en az 1000 ml’lik mezüre aktarılır. 1 litreye saf su ile tamamlanır. Daha sonra cam şişeye aktarılır (Longmire vd. 1997).

3.3.2 DNA izolasyonu

Elde edilecek olan Sterivex kapsül filtre örneğinin DNA İzolasyonlarında, Spens vd. (2017) tarafından DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Stockach, Germany) kullanılarak geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu protokol, Longmire solüsyonu ve Sterivex filtrelerden ayrı ayrı izolasyon yapılarak, elde edilen izolatların birleştirilmesine dayanmaktadır.

İzolasyon öncesinde bütün filtrelerin dış yüzeyleri %10'luk çamaşır suyu ve etanol ile temizlenir.

3.3.2.1 Longmire solüsyonundan izolasyon

1. Sterivex filtre kapsülü içerisindeki koruma solüsyonunun aktarımı için filtrenin inlet kısmı steril 5ml'lik tüpün içerisine geçirilerek sıkıca parafilmleir ve 50 ml'lik falkon içerisine yerleştirilir. 2000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.
2. 5ml'lik tüplerde toplanılan çözeltiler, 6000*g (8000 rpm)'de 30-45 dakika arası santrifüjlenerek sıvı faz dökülür ve katı çökelti kurumaya bırakılır.
3. Her örnek için 180 µL ATL tamponu ve 20 µL proteinaz K karışımı hazırlanır.
4. Hazırlanan 200 µL lizis karışımı çökeltiye eklenerek 15 saniye vortekslenir.
5. Örnekler döner halde, 56 °C de 24 saat inkübe edilir.
6. Örnekler 15 saniye vortekslenir.

Bundan sonraki basamaklar Sterivex filtrelerinden izolasyon protokolü ile ortaktır. (8. basamaktan devam)

3.3.2.2 Sterivex filtrelerinden izolasyon

1. Filtre kapsüllerinin giriş ve çıkış kapakları çıkartıldıktan sonra, giriş kısmı aşağıda kalacak şekilde çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılır (Damlayan su için tüplerin altına peçete koyulur).

2. Her örnek için 180 µL ATL tamponu, 20 µL proteinaz K ve 600 µL 'lik saf su karışımı 1,5 ml'lik tüpte hazırlanır.
3. Çıkış tarafındaki kapak kapatıldıktan sonra, hazırlanan 800 µL lizis karışımı filtrenin dış kısmı ile kapsülün yan yüzeyleri arasından akacak şekilde dökülür. Giriş tarafındaki kapak da kapatılarak birkaç saniye güçlü bir şekilde çalkalanır.
4. Örnekler döner halde, 56 °C de 24 saat inkübe edilir.
5. Kapsüller beş kez güçlü bir şekilde çalkalanır.
6. Sterivex filtre kapsülü içerisindeki inkübasyon tamponu aktarımı için filtrenin giriş kısmı steril 5ml'lik tüpün içerisine geçirilerek sıkıca parafilmelenir ve 50 ml'lik falkon içerisine yerleştirilir.
7. 5500 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.
8. Örnekler birkaç saniye vortekslenir.
9. Örnekle aynı hacimde 99%'luk soğuk etanol (moleküler grade) ve AL tamponu eklenir (200 µL AL tamponu ve üzerine örneğin hacmini tamamlayacak kadar saf su eklenir).
10. Örnekler güçlü bir şekilde çalkalanır.
11. Bir defada en fazla 650 µL alınarak, 2 ml'lik DNeasy kolonlarına aktarılır.
12. 4°C ve 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
13. Sıvı kısım atılır.
14. 10-12. basamaklar bütün hacim filtrelenene kadar tekrarlanır.
15. DNeasy kolonları 2 ml'lik yeni tüplere aktararak, üzerine 500 µL AW1 tamponu eklenir ve 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
16. DNeasy kolonlarının üzerine 500 µL AW2 tamponu eklenir ve 20000*g (14000 rpm)'de 3 dakika santrifüjlenerek membranın kuruması sağlanır. Ardından kolonlar tekrar 17000*g (13000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
17. Kolonlar 1.5 veya 2 ml'lik yeni tüplere aktarılır (Kapakları açık şekilde).
18. Tüplerin üzerlerine 50 µl AE tamponu eklenir.

19. Kolonlar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
20. Örnekler 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
21. Kolonlar atılır.
22. DNA temiz tüplere aktarılarak saklanır.

3.3.2.3 Selüloz nitrat filtrelerden izolasyon

1. Filtreler, içerisinde farklı boyutlarda cam boncuk bulunan 5 ml'lik tüplerin içerisine yerleştirilir.
2. Her örnek için 180 µL ATL tamponu, 20 µL proteinaz K ve 600 µL'lik saf su karışımı hazırlanır.
3. Toplam 800 µL' lik karışım 5 ml'lik cam boncuklar tüplerin içerisine yerleştirilmiş filtrelerin içerisine aktarılır.
4. Örnekler döner halde, 56 °C de 24 saat inkübe edilir.
5. 5 ml'lik tüpler beş kez güçlü bir şekilde çalkalanır.
6. 20000*g (14000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenerek boncuklar dibe çöktürülür.
7. Süpernatant mikro pipet yardımıyla çekilerek hacmi ölçülür ve 5 ml'lik tüplere aktarılır.
8. Örnekler birkaç saniye vortekslenir.
9. Örnekle aynı hacimde 99%'luk soğuk etanol (moleküler grade) ve AL tamponu eklenir (200 µL AL tamponu üzerine örneğin hacmini tamamlayacak kadar saf su eklenir.). (Tampon ve etanol önceden birleştirilerek örneğe eklenebilir).
10. Örnekler güçlü bir şekilde çalkalanır.
11. Bir defada en fazla 650 µL alınarak, 2 ml'lik DNeasy kolonlara aktarılır.
12. 4°C ve 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
13. Sıvı kısım atılır.
14. 10-12. basamaklar bütün hacim filtrelene kadar tekrarlanır.

15. DNeasy kolonları 2 ml'lik yeni tüplere aktararak, üzerine 500 µL AW1 tamponu eklenir ve 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
16. DNeasy kolonları 2 ml'lik yeni tüplere aktararak, üzerine 500 µL AW2 tamponu eklenir ve 20000*g (14000 rpm)'de 3 dakika santrifüjlenerek membranın kuruması sağlanır. Ardından kolonlar yeni tüplere aktararak 17000*g (13000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
17. Kolonlar 1.5 veya 2 ml'lik yeni tüplere aktarılır (Kapakları açık şekilde).
18. Tüplerin üzerlerine 50 µl AE tamponu eklenir.
19. Kolonlar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
20. Örnekler 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenir.
21. Kolonlar atılır.
22. DNA temiz tüplere aktararak saklanır.

3.3.3 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'ların miktar ve saflık analizleri nano spektrofotometre'de gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu 260 nm'de 1 OD'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplanmıştır. DNA'nın saflığını değerlendirirken 260 nm/280 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ proteinin absorpsiyon değeri) ve 260 nm/230 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/alkolün abropsiyon değeri) değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

3.3.4 DNA'nın florometrik analizi

Son derece hassas ve kantitatif sonuç elde etmek için DNA miktarını florometrik ölçen Qubit™ 3.0 Florometre cihazı kullanılmıştır.

3.3.5 Jel elektroforezi

DNA varlığını görüntülemek için jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. %1'lik agaroz jel içerisinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilir ve 3 µl DNA, 3 µl 1X Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenir. Jel 'deki ilk kuyuya DNA Ladder yüklenir. Örnekler 100 voltta 45 dakika yürütülür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarılır. Burada UV ışık altında görüntülenerek bütünlüğü saptanan DNA'nın görüntüsü kontrol edilir. Nano spektrometrede ölçümleri tamamlandıktan sonra örnekler birleştirildi.

3.3.6 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

eDNA izolasyonu yapılan kalıp DNA'lar kuşlar için evrense barkodlama ve metabarkodlama primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR da kullanılacak reaktif karışım için uygun sıcaklık, döngü sayısı ve miktar optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Her istasyon için alınan sterivex ile 2 tekrarlı PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Belirtilen şartlarda ve negatif kontrol kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 100 voltta 35 dakika yürütülmüştür. Ardından UV görüntüleme sisteminde uygun bant boyu ve negatif kontrol bakımından değerlendirilerek kütüphane işlemi öncesinde pozitif kontrol sağlanmıştır.

3.3.7 Örneklerin DNA dizi analizine hazırlanması

3.3.7.1 Saflaştırma (Pürifikasyon)

Pürifikasyon için ExoSAP-IT™ ticari reaktifi kullanılacaktır. Dizi analinizi inhibe edebilecek fazla primer ve nükleotidler bu aşamada hidrolize edilir.

1. Dizilenecek PCR ürününden 3 µl yeni 200 µl'lik PCR tüplerine aktarılır.
2. Üzerine 1 µl ExoSap eklenir. Daha sonra termal döngü cihazına yerleştirilir.

Çizelge 3.2 ExoSap Termal Döngü Protokolü

37°C	30 dakika
80°C	15 dakika
4°C	∞

3.3.7.2 DNA dizi analizi PCR'ı

ExoSap Pürifikasyon aşamasından sonra PCR ürünlerinin dizileme PCR'ı hazırlanır (Çizelge 3.2- 3.3). Bu aşamada PCR ile çoğaltılan milyonlarca kopyası oluşturulan DNA'nın bir dizi zincir sonlanma reaksiyonuna tabi tutulup, floresan boyalı 3'OH grubu bulunmayan nükleotidler eklenecektir. Bu nükleotidlerin verdiği ışıma sayesinde matematiksel ve yazılımsal işleme tabi tutularak barkodlanan türün genetik dizisinin biyoinformatiksel analizlerle tespit edilerek sonuçlandırılacaktır.

Çizelge 3.3 DNA Dizi Analizi PCR Reaksiyon Protokolü

PCR Ürünü	4 µl
BigDye™ Buffer	2 µl
BigDye™ Terminator v3.1	2 µl
Primer (3,2 pmol)	2 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.4 DNA Dizi Analizi Termal Döngü Protokolü

İlk Denatürasyon	96°C	1 dk	25 döngü
Denatürasyon	96°C	10 sn	
Eşleşme	50°C	5 sn	
Sentez	60°C	4 dk	
Son Sentez	4°C	∞	

3.3.7.3 DNA dizi analizi PCR pürifikasyonu:

Bu aşamada dizileme PCR 'ında bağlanmamış floresan boya işaretli ddNTP 'ler sephadex jel kolonu kullanılarak uzaklaştırılır.

3.3.7.4 Sephadex pürifikasyon protokolü

1. 3 gr sephadex tartılır ve 50 ml'lik falkona aktarılır, üzerine 45 ml saf su eklenir. (Miktar plaka aktarılabacak dizileme ürün sayısına göre değişebilir.)
2. Tamamen homojen oluncaya kadar karıştırılır veya vortekslenir.
3. Kolonlar hazırlanır. Kolonların kendi toplama tüpleri raklara dizilir ve kolonlar yeni ya da daha önce yıkaması yapılmış 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilir.
4. Kolonların üzerine 700 µl sephadex karışım eklenir.
5. 4600 rpm'de 2 dakika santrifüjlenir.
6. Toplama tüpleri saf su kaplarına atılır.
7. Kolonlar ilk aşamada ayrılan ve raklara dizilen kendi toplama kaplarına yerleştirilir. (Bu aşamada tüpler yeni ve steril olmalıdır.)
8. Dizilenecek örnekler kolonların içerisinde beyaz jelimsi sephadexlerin tam ortasına ve kesinlikle sephadexlere değmeden 10 µl eklenir.
9. 4600 rpm'de 2 dakika santrifüjlenir.
10. 2 ml'lik tüplerde toplanan örnekler dizileme plakasına eklenir. (Santrifüj sonrasında 10 µl örnek olmalıdır. Eğer daha fazla örnek toplanırsa tüpte 30 µl'ye kadar dizileme plakasına ekleme yapılabilir.)

3.3.8 DNA dizi analizi

DNA dizi analizini gerçekleştirmek için ön denemelerde Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer platformunda Big Dye Cycle Sequencing Kit V.3.1 kullanılarak Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu için protokoller ve döngü koşulları

optimize edilmiştir. Tez kapsamındaki tüm DNA dizileme reaksiyonları, üretici tarafından önerilen ve çalışmamıza göre optimize edilmiş protokollere göre yapılacaktır.

3.3.8.1 Dizilerin hizalanması

Tüm örneklerle ilişkin DNA dizileri GenBank ve BOLD veri tabanlarından elde edilen referans diziler yardımı ile Clustal W (Thompson vd. 1994), MEGA 5.2 (Tamura vd. 2011) ve Sequencher 5.0 yazılımları kullanılarak hizalanacaktır.

Abi. formatında gelen dosyalar NCBI veri tabanında eşleştirildi Blast sonuçlarında kuş türleri ile eşleşme sağlanamadı.

Anspesifik bağlanan PCR örneklerinden jelden pürifikasyon yapıldı. Optimizasyon için iki farklı kit denendi. Promega marka “Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System” kiti ve MN marka jel saflaştırma protokolü “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir.

Silik bant veren örnekler 45 döngüde farklı seyreltme konsantrasyonlarında denendi.

3.3.9 PCR ürünü pürifikasyonu

3.3.9.1 EtBr’lü jelden PCR ürünü pürifikasyonu

1. 1X oranında TAE (40 mM Tris-asetat, 1mM EDTA, pH 8) stok solüsyonu hazırlanır ve %2’lik jel (2 gram agaroz, 100 ml 1X TAE, 0,5 µl EtBr) hazırlanır.
2. Kuyulara pürifikasyon yapılacak örnekler yüklenir. EtBr’lü %2’lik jelde 100 Volt, 35 dakika yürütülür.
3. Daha sonra örnekler görüntüleme cihazı içerisinde UV altında görüntülenir ve doğru uzunluktaki ürün jelden kesilerek saflaştırılır.

3.3.9.2 MN EtBr’lü jelden saflaştırma

- Jel saflaştırma protokolü MN marka ticari kit olan “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir.

1. Jelden kesilen doğru uzunluktaki ürünler 2 ml'lik tüplere aktarılır.
2. Boş bir 2 ml'lik tüp alınarak tartım kabına yerleştirilir ve darası alınır. Daha sonra 2 ml'lik tüplere aktarılan örnekler tartılır.
3. Ağırlıkları bilinen örneklerin üzerine iki kat hacminde NTI tamponu eklenir (Örneğin 100 mg jel üzerine 200 µl NTI tamponu eklenir).
4. Örnekler 50 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır. 5 dakikada bir 2-3 saniye vortekslenir.
5. Örnekler tamamen eridikten sonra temizleme kolonlarına aktarılır.
6. 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
7. Temizleme kolonlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
8. 7.aşama tekrar edilir. Temizleme kolonlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
9. Membranın kurumasın sağlamak için temizleme kolonları 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir.
10. Temizleme kolonları yeni 2 'ml'lik tüplere aktarılır.
11. Temizleme kolonları üzerine 20 µl NE tamponu eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
12. 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir. Temizleme kolonları atılır.
13. Saflaştırılan PCR ürünleri ikinci PCR reaksiyonu gerçekleşene kadar- 20 °C'de saklanır.

3.3.9.3 Promega EtBr'lü jelden saflaştırma

Jel saflaştırma protokolü Promega marka ticari kit olan “Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir.

1. Jelden kesilen doğru uzunluktaki ürünler 2 ml'lik tüplere aktarılır.

2. Boş bir 2 ml'lik tüp alınarak tartım kabına yerleştirilir ve darası alınır. Daha sonra 2 ml'lik tüplere aktarılan örnekler tartılır.
3. Ağırlıkları bilinen örneklerin üzerine her 10mg jel ağırlığı başına 10µl membran bağlanma solüsyon eklenir (Örneğin 100 mg jel üzerine 100 µl membran bağlanma solüsyon eklenir).
4. Örnekler 50 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır. 5 dakikada bir 2-3 saniye vortekslenir.
5. SV mini kolonlar toplama tüpüne yerleştirilir.
6. Örnekler tamamen eridikten sonra mini kolonlar aktarılır. 1 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
7. 1 dakika 16,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
8. Mini kolonlar üzerine 700µl membran yıkama solüsyonu eklenir ve 1 dakika 16,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
9. 8.aşama tekrar edilir. Minicolumn üzerine 500µl membran yıkama solüsyonu eklenir ve 5 dakika 16,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
10. Membranın kurumasın sağlamak için mini kolonlar 1 dakika 16,000xg 'de santrifüjlenir.
11. Mini kolonlar yeni 2 'ml'lik tüplere aktarılır.
12. Mini kolonlar üzerine 20 µl steril saf su eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
13. 1 dakika 16,000xg 'de santrifüjlenir. Mini kolonlar atılır.
14. Saflaştırılan PCR ürünleri ikinci PCR reaksiyonu gerçekleşene kadar- 20 °C'de saklanır.

3.3.9.4 PCR ürünü pürifikasyonu

- PCR saflaştırma protokolü MN marka ticari kit olan “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir.

1. PCR örnekleri steril 2 ml'lik tüplere aktarılır.
2. Örneklerin üzerine iki kat hacminde NTI tamponu eklenir (Örneğin 100 µl PCR ürünü üzerine 200 µl NTI tamponu eklenir).
3. Örnekler temizleme kolonlarına aktarılır.
4. 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
5. Temizleme kolonlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
6. 5.aşama tekrar edilir. Temizleme kolonlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
7. Membranın kurumasın sağlamak için temizleme kolonları 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir.
8. Temizleme kolonları yeni 2 'ml'lik tüplere aktarılır.
9. Temizleme kolonları üzerine 20 µl NE tamponu eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
10. 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir. Temizleme kolonları atılır.
11. Saflaştırılan PCR ürünleri- 20 °C'de saklanır.

3.3.10 DNA kütüphanesinin hazırlanması

Aşağıda protokolü verilen tekli-PCR metodu ile örneklerin DNA Kütüphanesi hazırlanacaktır.

3.3.10.1 Tagli PCR metodu

eDNA izolasyonu yapılan kalıp DNA'ların NGS platformunda 12S yerel veri tabanını oluşturmak için MiBird-U-F/ MiBird-U-R ve AVES01-U-F/AVES01-U-R primer çiftleri kullanılacaktır. PCR aşaması metabarkodlama çalışmalarında kullanılan "tek aşamalı PCR" yöntemi ile gerçekleştirilecektir. Tek aşamalı PCR yönteminde primer dizisinin ileri ve geri dizilerinin 5' ucuna farklı kombinasyonlarda 8 adet nükleik asit eklenir.

Tasarlanan bu kısa dizilere moleküler etiket (tag) denir. Bizim çalışmamız için her örnek başına bir adet tag olacak şekilde 36 farklı tag kullanılmıştır.

Çizelge 3.5 8 nükleotid uzunluğunda 36 farklı tag listesi (Taberlet vd. 2018).

1	acacacac	13	agactatg	25	agcgacta
2	acagcaca	14	gcgtcagc	26	tcagtgtc
3	gtgtacat	15	tgacatca	27	actctgct
4	tatgtcag	16	acatgtgt	28	atatagcg
5	tagtcgca	17	gtacgact	29	ctatgcta
6	tactatac	18	atgatcgc	30	tcgctgtg
7	actagatc	19	acgacgag	31	agcacagt
8	gatcgcca	20	catcagtc	32	tagctagt
9	cgctctcg	21	atcagtca	33	agtgctac
10	gtcgtaga	22	tctactga	34	cgtataca
11	gtcacgtc	23	gatgatct	35	cgagtcgt
12	gactgatg	24	ctgcgtac	36	cacatgat

Tasarlanan her 8 nükleotitlik tag, birbirlerinden en az 3 nükleotid farklıdır. Tag'ler tasarlandıktan sonra okuma kalitesini arttırmak, indeks dizilerinin degradasyonunu önlemek ve aynı zamanda her dizileme döngüsünde okuma sayısını artırmak için tag'lerin başına en az bir adet belirsiz nükleotidler eklenir (N). Tag'ler tasarlandıktan ve belirsiz nükleotidler eklendikten sonra primer dizisinin 5' ucuna eklenir (NN+Tag+Primer).

Çizelge 3.6 AVES01-F, İleri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu

Primer Yönü	N	Primer Tags	Primer Dizisi (AVES01-U-F)
F	N	acacacac	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	acagcaca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	gtgtacat	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	tatgtcag	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	tagtcgca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	tactatac	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	actagatc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	gatcgcca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	cgctctcg	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	gtcgtaga	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	gtcacgtc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	gactgatg	GATTAGATACCCCACTATGC
F	N	agactatg	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	gcgtcagc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	tgacatca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	acatgtgt	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	gtacgact	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	atgatcgc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	acgacgag	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	catcagtc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	atcagtca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	tctactga	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	gatgatct	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	ctgcgtac	GATTAGATACCCCACTATGC
F	N	agcgacta	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	tcagtgtc	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	actctgct	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	atatagcg	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	ctatgcta	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	tcgcgctg	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	agcacagt	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	tagctagt	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	agtgtctac	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NN	cgtataca	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNN	cgagtcgt	GATTAGATACCCCACTATGC
F	NNNN	cacatgat	GATTAGATACCCCACTATGC

Çizelge 3.7 AVES01-R, Geri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu

Primer Yönü	N	Primer Tags	Primer Dizisi (AVES01-R)
R	N	acacacac	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	acagcaca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	gtgtacat	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	tatgtcag	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	tagtcgca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	tactatac	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	actagatc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	gatcgcca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	cgctctcg	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	gtcgtaga	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	gtcacgtc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	gactgatg	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	N	agactatg	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	gcgtcagc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	tgacatca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	acatgtgt	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	gtacgact	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	atgatcgc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	acgacgag	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	catcagtc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	atcagtca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	tctactga	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	gatgatct	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	ctgcgtac	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	N	agcgacta	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	tcagtgtc	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	actctgct	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	atatagcg	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	ctatgcta	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	tcgcgctg	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	agcacagt	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	tagctagt	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	agtgtctac	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NN	cgtataca	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNN	cgagtcgt	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
R	NNNN	cacatgat	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG

Çizelge 3.8 AVES01-F, İleri Yön Tagli Primer Dizisi

Primer Adı	Primer Dizisi
AVES01_01_F	NACACACACGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_02_F	NNACAGCACAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_03_F	NNNGTGTACATGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_04_F	NNTATGTCAGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_05_F	NNNTAGTCGCAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_06_F	NNNNTACTATACGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_07_F	NNACTAGATCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_08_F	NNNGATCGCGAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_09_F	NNNNCGCTCTCGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_10_F	NNGTCGTAGAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_11_F	NNNGTCACGTCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_12_F	NNNNGACTGATGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_13_F	NAGACTATGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_14_F	NNGCGTCAGCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_15_F	NNNTGACATCAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_16_F	NNACATGTGTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_17_F	NNNGTACGACTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_18_F	NNNNATGATCGCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_19_F	NNACGACGAGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_20_F	NNNCATCAGTCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_21_F	NNNNATCAGTCAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_22_F	NNTCTACTGAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_23_F	NNNGATGATCTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_24_F	NNNNCTGCGTACGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_25_F	NAGCGACTAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_26_F	NNTCAGTGTCGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_27_F	NNNACTCTGCTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_28_F	NNATATAGCGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_29_F	NNNCTATGCTAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_30_F	NNNNTCGCGCTGGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_31_F	NNAGCACAGTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_32_F	NNNTAGCTAGTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_33_F	NNNNAGTGCTACGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_34_F	NNCGTATACAGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_35_F	NNNCGAGTCGTGATTAGATACCCCACTATGC
AVES01_36_F	NNNNCACATGATGATTAGATACCCCACTATGC

Çizelge 3.9 AVES01-R, Geri Yön Tagli Primer Dizisi

Primer Adı	Primer Dizisi
AVES01_01_R	NACACACACGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_02_R	NNACAGCACAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_03_R	NNNGTGTACATGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_04_R	NNTATGTCAGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_05_R	NNNTAGTCGCAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_06_R	NNNNTACTATACGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_07_R	NNACTAGATCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_08_R	NNNGATCGCGAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_09_R	NNNCGCTCTCGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_10_R	NNGTCGTAGAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_11_R	NNNGTCACGTCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_12_R	NNNNGACTGATGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_13_R	NAGACTATGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_14_R	NNGCGTCAGCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_15_R	NNNTGACATCAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_16_R	NNACATGTGTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_17_R	NNNGTACGACTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_18_R	NNNNATGATCGCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_19_R	NNACGACGAGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_20_R	NNNCATCAGTCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_21_R	NNNNATCAGTCAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_22_R	NNTCTACTGAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_23_R	NNNGATGATCTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_24_R	NNNNCTGCGTACGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_25_R	NAGCGACTAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_26_R	NNTCAGTGTCGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_27_R	NNNACTCTGCTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_28_R	NNATATAGCGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_29_R	NNNCTATGCTAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_30_R	NNNNTCGCGCTGGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_31_R	NNAGCACAGTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_32_R	NNNTAGCTAGTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_33_R	NNNNAGTGCTACGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_34_R	NNCGTATACAGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_35_R	NNNCGAGTCGTGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG
AVES01_36_R	NNNNCACATGATGTTTTAAGCGTTTGTGCTCG

Çizelge 3.10 MiBird-U-F, İleri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu

Primer Yönü	N	Primer Tags	Primer Dizisi (MiBird-U-F)
F	N	acacacac	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	acagcaca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	gtgtacat	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	tatgtcag	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	tagtcgca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	tactatac	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	actagatc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	gatcgcca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	cgctctcg	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	gtcgtaga	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	gtcacgtc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	gactgatg	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	N	agactatg	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	gcgtcagc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	tgacatca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	acatgtgt	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	gtacgact	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	atgatcgc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	acgacgag	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	catcagtc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	atcagtca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	tctactga	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	gatgatct	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	ctgcgtac	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	N	agcgacta	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	tcagtgtc	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	actctgct	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	atatagcg	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	ctatgcta	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	tcgcgctg	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	agcacagt	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	tagctagt	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	agtgctac	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NN	cgtataca	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNN	cgagtcgt	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
F	NNNN	cacatgat	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC

Çizelge 3.11 MiBird-U-R, Geri Yön, Tag, Belirsiz Dizi(N) ve Primer Bilgi Tablosu

Primer Yönü	N	Primer Tags	Primer Dizisi (MiBird-U-R)
R	N	acacacac	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	acagcaca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	gtgtacat	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	tatgtcag	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	tagtcgca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	tactatac	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	actagatc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	gatcgcca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	cgctctcg	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	gtcgtaga	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	gtcacgtc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	gactgatg	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	N	agactatg	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	gcgtcagc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	tgacatca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	acatgtgt	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	gtacgact	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	atgatcgc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	acgacgag	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	catcagtc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	atcagcca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	tctactga	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	gatgatct	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	ctgcgtac	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	N	agcgacta	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	tcagtgtc	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	actctgct	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	atatagcg	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	ctatgcta	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	tcgcgctg	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	agcacagt	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	tagctagt	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	agtgctac	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NN	cgtataca	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNN	cgagtcgt	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
R	NNNN	cacatgat	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

Cizelge 3.12 MiBird-U-F, İleri Yön Tagli Primer Dizisi

Primer Adı	Primer Dizisi
MiBird_01_F	NACACACACGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_02_F	NNACAGCACAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_03_F	NNNGTGTACATGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_04_F	NNTATGTCAGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_05_F	NNNTAGTCGCAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_06_F	NNNNTACTATACGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_07_F	NNACTAGATCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_08_F	NNNGATCGCGAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_09_F	NNNCGCTCTCGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_10_F	NNGTCGTAGAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_11_F	NNNGTCACGTCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_12_F	NNNNGACTGATGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_13_F	NAGACTATGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_14_F	NNGCGTCAGCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_15_F	NNNTGACATCAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_16_F	NNACATGTGTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_17_F	NNNGTACGACTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_18_F	NNNNATGATCGCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_19_F	NNACGACGAGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_20_F	NNNCATCAGTCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_21_F	NNNNATCAGTCAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_22_F	NNTCTACTGAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_23_F	NNNGATGATCTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_24_F	NNNNCTGCGTACGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_25_F	NAGCGACTAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_26_F	NNTCAGTGTCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_27_F	NNNACTCTGCTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_28_F	NNATATAGCGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_29_F	NNNCTATGCTAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_30_F	NNNNTCGCGCTGGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_31_F	NNAGCACAGTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_32_F	NNNTAGCTAGTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_33_F	NNNNAGTGCTACGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_34_F	NNCGTATACAGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_35_F	NNNCGAGTCGTGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC
MiBird_36_F	NNNNCACATGATGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC

Çizelge 3.13 MiBird-U-R, Geri Yön Tagli Primer Dizisi

Primer Adı	Primer Dizisi
MiBird_01_R	NACACACACCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_02_R	NNACAGCACACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_03_R	NNNGTGTACATCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_04_R	NNTATGTCAGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_05_R	NNNTAGTCGCACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_06_R	NNNNTACTATACCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_07_R	NNACTAGATCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_08_R	NNNGATCGCGACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_09_R	NNNNGCTCTCGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_10_R	NNGTCGTAGACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_11_R	NNNGTCACGTCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_12_R	NNNNGACTGATGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_13_R	NAGACTATGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_14_R	NNGCGTCAGCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_15_R	NNNTGACATCACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_16_R	NNACATGTGTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_17_R	NNNGTACGACTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_18_R	NNNNATGATCGCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_19_R	NNACGACGAGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_20_R	NNNCATCAGTCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_21_R	NNNNATCAGTCACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_22_R	NNTCTACTGACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_23_R	NNNGATGATCTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_24_R	NNNNCTGCGTACCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_25_R	NAGCGACTACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_26_R	NNTCAGTGTCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_27_R	NNNACTCTGCTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_28_R	NNATATAGCGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_29_R	NNNCTATGCTACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_30_R	NNNNTCGCGCTGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_31_R	NNAGCACAGTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_32_R	NNNTAGCTAGTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_33_R	NNNNAGTGCTACCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_34_R	NNCGTATACACATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_35_R	NNNCGAGTCGTCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
MiBird_36_R	NNNNCACATGATCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

3.3.10.2 Tag PCR

Tag dizilerinin yukarıdaki Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13 'de verilen MiBird-U-F/ MiBird-U-R ve AVES01-F/AVES01-R primer çiftlerinin ileri ve geri dizilerine eklenmesi ile sentezlenen primerler kullanılacaktır. Tag PCR'lar gerçekleştirildikten sonra aşağıda verilen protokoller uygulanır.

- Jel elektroforezi ile görüntülenen PCR ürünlerinin yaklaşık 280-300 baz (MiBird-U-F/ MiBird-U-R) ve 100-110 baz (AVES01-F/AVES01-R) uzunluğunda olduğu kontrol edilir.
- İstenmeyen PCR ürünleri olması durumunda doğru uzunluktaki ürün jelden kesilerek saflaştırılır.

3.3.10.3 Tag PCR ürünü pürifikasyonu

1. 1X oranında TAE (40 mM Tris-asetat, 1mM EDTA, pH 8) stok solüsyonu hazırlanır ve %2'lik jel (2 gram agaroz, 100 ml 1X TAE) hazırlanır.
2. Kuyulara pürifikasyon yapılacak örnekler yüklenir. EtBr'süz %2'lik jelde 100 Volt, 35 dakika yürütülür.
3. Örnekler yürütülürken boyama solüsyonu plastik kap içerisinde hazırlanır.
4. Plastik kap içerisinde, SYBR Green I reagent 1:10.000 oranında 1X TAE stok solüsyonu ile seyreltilir.
5. Yürütülen örnekler boyama solüsyonu içerisinde 20 dakika bekletilir.
6. Daha sonra örnekler görüntüleme cihazı içerisinde mavi ışık altında görüntülenir ve doğru uzunluktaki ürün jelden kesilerek saflaştırılır.

3.3.10.4 Tag PCR ürünü jelden saflaştırma

- Jel saflaştırma protokolü "NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up" kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir.
1. Jelden kesilen doğru uzunluktaki ürünler 2 ml'lik tüplere aktarılır.

2. Boş bir 2 ml'lik tüp alınarak tartım kabına yerleştirilir ve darası alınır. Daha sonra 2 ml'lik tüplere aktarılan örnekler tartılır.
 3. Ağırlıkları bilinen örneklerin üzerine iki kat hacminde NTI tamponu eklenir (Örneğin 100 mg jel üzerine 200 µl NTI tamponu eklenir).
 4. Örnekler 50 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır. 5 dakikada bir 2-3 saniye vortekslenir.
 5. Örnekler tamamen eridikten sonra temizleme kolonlarına aktarılır.
 6. 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
 7. Temizleme kolonlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
 8. 7.aşama tekrar edilir. Temizleme kolanlarının üzerine 650 µL NT3 tamponu eklenir ve 30 saniye 11,000xg 'de santrifüjlenir. Sıvı kısım atılır.
 9. Membranın kurumasın sağlamak için temizleme kolanları 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir.
 10. Temizleme kolanları yeni 2 'ml'lik tüplere aktarılır.
 11. Temizleme kolanlarının üzerine 10 µl NE tamponu eklenir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
 12. 1 dakika 11,000xg 'de santrifüjlenir. Temizleme kolanları atılır.
 13. Saflaştırılan PCR ürünleri ikinci PCR reaksiyonu gerçekleşene kadar- 20 °C'de saklanır.
- Jelden saflaştırması yapılan PCR örneklerinin tekrar PCR'ı kurulur.
 - Jel elektroforezi ile görüntülenen PCR ürünlerinin yaklaşık 280-300 baz (MiBird-U-F/ MiBird-U-R) ve 100-110 baz (AVES01-F/AVES01-R) uzunluğunda olduğu kontrol edilir.

3.3.10.5 Qubit™ 3.0 florometre ve örneklerin karıştırılması

- PCR saflaştırılması yapılan ve baz uzunlukları kontrol edilen örneklerin Qubit™ 3.0 Florometre ile kalite ve miktarları ölçülür.
- Her örnek tek tek ölçülerek konsantrasyonu 10ng/μl 'ye eşitlenir.
- Konsantrasyonu eşitlenen her 36'lık serilik örnek tek bir karışımda birleştirilir.
- Her bir 36 örnekten 5 μl alınarak toplamda 180 μl'lik homojen karışım elde edilir.
- Karışımın içerisinde 60 μl mikro pipetle alınır ve kütüphane basamağı için 0.2 ml'lik tüpe aktarılır

3.3.11 Kütüphane basamağı

- Bu aşamada rutinde shotgun dizileme kütüphane hazırlığı basamağında kullanılan “TruSeq Nano DNA” kütüphane hazırlama kiti optimize edilerek kullanılacaktır. Kısaca DNA fragmentlerine indeks adaptörleri ligasyon tekniği ile eklenir.

3.3.11.1 TruSeq nano DNA library prep kiti “Repair Ends” basamağı

1. ERP2 ya da ERP3 600 × g'de 5 saniye santrifüjlenir.
2. Her 60 μl'lik karışım üzerine ERP2 ya da ERP3'den 40 μl eklenir.
3. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
4. Örnekler pipetajlanır.
5. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg 'de 1 dakika karıştırılır.
6. Karıştırıcı ısıtıcı cihazın içerisinde örnekler 30°C'de 30 dakika inkübe edilir ardından hemen buzun içerisine yerleştirilir.

7. Termal döngü cihazında ERP programı çalıştırılır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır.
8. Karışımların üzerine 160 µl SPB tamponu eklenir.
9. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
10. Örnekler pipetajlanır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır.
11. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
12. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg 'de 1 dakika karıştırılır.
13. Manyetik stant üzerinde karışım tamamen çözününceye kadar 5-7 dakika bekletilir.
14. 250 µl süpernatant CEP plakaya aktarılır.
15. Kalan pelet üzerine 30 µl SPS tamponu eklenir.
16. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
17. Örnekler pipetajlanır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır.
18. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
19. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg 'de 1 dakika karıştırılır.
20. Manyetik stant üzerinde karışım tamamen çözününceye kadar 5-7 dakika bekletilir.
21. Tüm Süpernatant atılır.
22. Pelet üzerine 200 µl yeni hazırlanmış 80% EtOH eklenir.

23. 30 saniye manyetik stant üzerinde inkübe edilir. Tüm süpernatant atılır.
24. Örnekler 5 dakika manyetik stand üzerinde kurutulur.
25. 20 µl RSB tamponu eklenir.
26. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
27. Örnekler pipetajlanır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır.
28. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
29. Manyetik stand üzerinde karışım tamamen çözününceye kadar 5-7 dakika bekletilir.
30. 17.5 µl süpernatant ALP plakaya aktarılır.

3.3.11.2 TruSeq nano DNA library prep kiti “Adenylate 3' Ends” basamağı

- Bu aşamada 280-300 ve 100-110 baz çifti uzunluğuna eşitlenen örneklerin 3' ucuna poli A kuyruğu eklenir. Örneklerimizde cihazla uyumlu adaptörlü primer ve indeksleri olmadığı için bu aşama adaptör ligasyon basamağı için gereklidir.
1. ATL ya da ATL2 tamponu 600xg'de 5 saniye santrifüjlenir.
 2. 12.5 µl ATL ya da ATL2 tamponu örneklerin üzerine eklenir.
 3. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
 4. Örnekler pipetajlanır.
 5. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 37°C'de 30 dakika ve 70°C'de 5 dakika bekletilir. Daha sonra örnekler buz içerisine alınarak 5 dakika bekletilir.
 6. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 37°C'de 30 dakika, 70°C'de 5 dakika ve 4°C'de 5 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır. Her bir örneğin 30 µl karışım içermesi gerekmektedir.

7. 280xg 'de 1 dakika santrifüj edilir.

3.3.11.3 TruSeq nano DNA library prep kiti “Ligate Adapters” basamağı

- Bu aşamada, DNA fragmanlarının uçlarına HiSeq cihazıyla uyumlu çoklu indeksleme adaptörleri bağlanır, ürünleri flow cell üzerinde hibridizasyona hazırlar.
1. Index adaptörlerin eklenmesi; (HT Kit). DAP üzerinden seal çıkartılır.
 2. DNA Adaptörler 600xg 'de 5 saniye santrifüjlenir. DAP, 280xg 'de 1 dakika santrifüj edilir.
 3. Plastik kapak çıkartılır. DAP barkod eklenir.
 4. LIG2 tamponu -25°C'den -15°C'ye kaldırılır.
 5. RSB, LIG2, DNA adaptör tamponlarından 2.5 µl eklenir.
 6. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
 7. Örnekler pipetajlanır.
 8. 280xg 'de 1 dakika santrifüj edilir.
 9. Daha önceden 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde kapak kapalı şekilde 10 dakika bekletilir. Daha sonra örnekler buz içerisine alınır.
 10. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 10 dakika bekletilir. Örnekler termal döngü cihazından alınır. Her bir örneğin 37.5 µl karışım içermesi gerekmektedir.
 11. STL tamponu 600xg 'de 5 saniye santrifüj edilir.
 12. Örnekler üzerine 5 µl STL tamponu eklenir.
 13. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılır.
 14. Örnekler pipetajlanır. 280xg 'de 1 dakika santrifüj edilir.
 15. SPS tamponu tamamen çözününceye kadar vortekslenir. (Round 1 aşaması uygulanır.)

16. Örnekler üzerine 42.5 µl SPS tamponu eklenir.
17. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm’de 2 dakika karıştırılır.
18. Örnekler pipetajlanır.
19. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır. 280xg ’de 1 dakika santrifüj edilir.
20. Örnekler tamamen çözününceye kadar manyetik stant üzerinde 2-5 dakika bekletilir. Tüm süpernatant atılır.
21. Pelet üzerine 200 µl yeni hazırlanmış 80% EtOH eklenir.
22. Örnekler 30 saniye manyetik stant üzerinde inkübe edilir. Tüm süpernatant atılır.
23. Örnekler 5 dakika manyetik stant üzerinde kurutulur.
24. Örnekler üzerine 52.5 µl RSB tamponu eklenir.
25. Karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm’de 2 dakika karıştırılır.
26. Örnekler pipetajlanır.
27. Örnekler oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakılır. 280xg ’de 1 dakika santrifüj edilir.
28. Örnekler tamamen çözününceye kadar manyetik stant üzerinde 2-5 dakika bekletilir.
29. 50 µl’lik süpernatant CAP plakaya aktarılır.
30. Bu aşama Round 2 protokolü uygulanarak tekrarlanır. (SPB tamponu 50 µl, RSB tamponu 27.5 µl eklenir.)
31. 25 µl’lik süpernatant PCR plaka kuyularına aktarılır.
32. Bu işlemlerin ardından HiSeq SBS V4 kiti kullanılarak 2 × 150 bp baz çiftlik (bç) paired-end 300 döngülü dizileme işlemi başlatılır.

3.3.12 Biyoinformatik analizler

Biyoinformatik iş akışı için OBITOOLS software (<https://git.metabarcoding.org/obitools>) modifiye edilerek kullanılacaktır. İş akışında

kullanılacak olan “FastQC”, “FLASH” ve “ncbiblast” programları ise ücretsiz olarak indirilip kullanılabilmektedir.

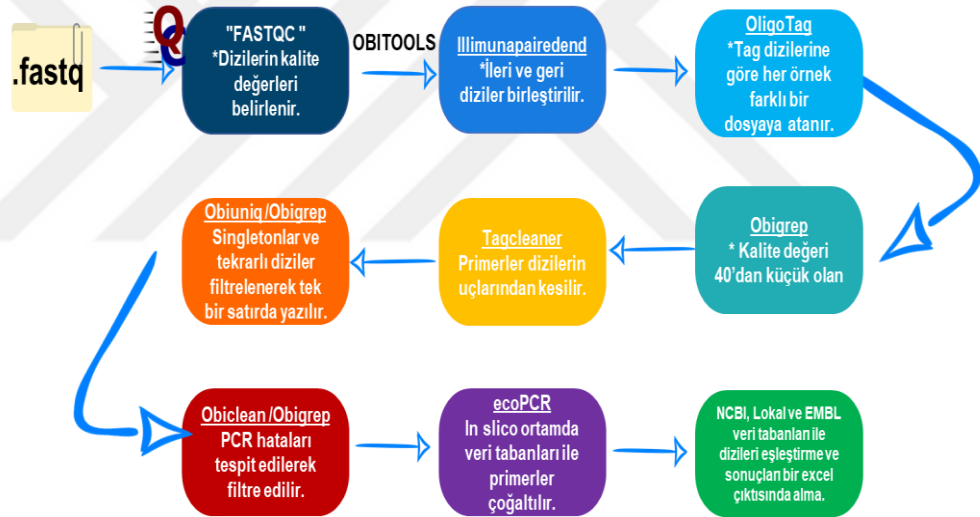
3.3.12.1 Ön işlemler

1. HiSeq cihazından “.fastq” formatında çıkan dizilerin kaliteleri ve bu dizilerle ilgili ana istatistikler FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) programı ile kontrol edilecektir.
2. Aynı DNA fragmanına karşılık gelen ileri ve geri okumalar, birleşme kalitesini (fred score 40’dan büyük olmak şartıyla) dikkate alan IlluminaPairEnd kodu uygulanarak hizalanacak ve birleştirilecektir. Kullanılacak örnek kod:
illuminapairedend --score-min=40 -r raw/Tez-MiBird_S56_L001_R2_001.fastq
raw/1001GOL-MiBird_S56_L001_R1_001.fastq>
obi_process/1_align/Tez.ali.fastq
3. İleri ve geri diziler birleştirildikten sonra aynı fastq dosyası içerisinde gelen 36 farklı tagli örnek OBITOOLS oligotag komudu ile birbirlerinden ayrılarak ayrı ayrı işlenmeye hazır hale getirilir. Homopolimerler olmadan ve birinci konumda bir C bazı olmadan, aralarında en az 3 nükleotit fark bulunan, 8 nükleotit uzunluğunda en az 36 oligonükleotit ailesini arar. Çıkan liste Tez_tags.txt dosyasına kaydedilir. Kullanılacak örnek kod: oligotag -s 8 -f 96 -d 3 -p 1 -r cnnnnnn Tez.ali.fastq > obi_process /2_tags/ Tez_tags.txt
4. İleri ve geri diziler birleştirildikten ve örnekler ayrıldıktan sonra birleştirilemeyen ileri ve geri diziler filtrelenir. Kullanılacak örnek kod: obigrep -p 'mode!="joined"' 1_align/Tez.ali.fastq > 2_merge/Tez.merged.fastq | obicount 2_merge/Tez.merged.fastq | awk 'NR%4==1' 1_align/Tez.ali.fastq | awk 'NR%4==1' 1_align/Tez.ali.fastq | awk -F ";" " | sort | uniq
5. Birleştirilen dizilerden belirsiz baz okumalarına sahip olanlar (N) veya beklenen PCR ampikon uzunluğundan farklı uzunluğa sahip olanlar çeşitli Perl betikleri kullanılarak temizlenecektir. TAGCLEANER (Schmieder vd. 2010) programı ile tagli primer dizileri, maksimum üç yanlış eşleşmeye izin verilerek temizlenecektir. Kullanılacak örnek kod: perl ~/tagcleaner-standalone-

```
0.16/tagcleaner.pl -fastq 2_merge/Tez.merged.fastq -out
3_trim/Tez.merged.trimmed -tag5
NNNNATGATCGCGGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC -tag3
NNNNATGATCGCCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG -mm5 3 -mm3
```

6. Daha sonra obiuniq kodu kullanılarak tekrarlı diziler kaldırılır ve tekrarı olan dizilerin başlık satırına eklenir. Tekrar sayıları (okuma sayıları) belirlendikten sonra 1-10 arası okuma ve 10'dan büyük okumaya sahip olan örnekler ayrı iki dosyaya atanır ve dizi eşleştirme, tür tespit işlemleri bu iki ayrı dosya üzerinden devam ettirilip sonuçlar en son karşılaştırılır.

7. Ön işlemlerden geçirilen ve filtrelenen dizilerle ilgili istatistikler çeşitli bash komutları kullanılarak hesaplanacaktır.



Şekil 3.10 Biyoinformatik İş Akışı

3.3.12.2 Tür tespiti

1. UCLUST (Edgar 2010) algoritmasında bulunan 'derep_fulllength' komutu ile tekrarlı diziler temizlenerek, tekrar sayıları FASTA dosyasının başlık satırına eklenecektir.
2. Tekrar sayısı 10'dan az olan diziler UCLUST (Edgar 2010) algoritmasında bulunan 'usearch_global' komutu kullanılarak, 10'dan fazla tekrarı bulunan

dizilerle hizalanacak ve bunlardan herhangi biri ile 99% (1 veya 2 yanlış eşleşme) benzerlik göstermesi durumunda ilgili dizinin tekrarı olarak sınıflandırılacaktır. Bu basamağın amacı, dizileme / PCR hatalarına veya popülasyonlardaki gerçek nükleotid varyasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösteren dizilerin, veri setinden çıkmamasını sağlamaktır.

3. İşlenen diziler, önceden indirilip hazırlanan BOLD, NCBI ve veri tabanları kullanılarak karşılaştırılacaktır.
4. En iyi BLAST eşleşmesi, minimum 97% dizi benzerliği ve maksimum 10⁻⁵ E-value değerine sahip olması durumunda ilgili dizilere atanacaktır. Miya vd. (2015), tür kompozisyonu bilinen deneylerde, verilen değerlerin tür kompozisyonunu en iyi şekilde tespit ederken, yanlış tanımlamaları da engellediğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada da farklı eşik değerleri denenerek, farklı parametrelerin tür tespitini nasıl etkilediği incelenecektir.
5. Tür tespitinin güvenilirliği, toplam hizalama uzunluğunun referans ve eldeki diziler arasındaki yanlış eşleşme sayılarına oranı incelenerek değerlendirilecektir. Örneğin 150 baz çifti uzunluğundaki bir amplikonun bir adet yanlış eşleşme ile en iyi BLAST eşleşmesine atanması (150/1+1) olarak hesaplanır. Bu işlem en iyi iki BLAST eşleşmesi için hesaplanarak, bu oranlar arasında LOD (Log of odds) skoru belirlenir ve bu değer ile tür tespitinin güvenilirliği kontrol edilir.
6. Bu iş akışının sonunda BLAST sonuçları, tür ismi, genel isim, toplam okuma sayısı ve dizilerin olduğu bir tablo formatında elde edilecektir. Kullanılacak örnek kod:
blastn -query 6_clean/Tez.merged.trimmed.uniq.c5-10.1150.L250.clean.fasta -db ~/blastdb/localdb.fasta -max_target_seqs 1 -outfmt "6 qseqid sseqid length pident" -out 12_lblast.results/Tez.c5-10.lblast.results.xls

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Moleküler Analiz Bulguları

Bölüm “3.3.2 DNA İzolasyonu” protokollerine göre gerçekleştirilen eDNA izolasyonları sonucunda, DNA’ların spektrofotometrik analizi (bölüm 3.3.3) gerçekleştirildi.

Çizelge 4.1 Örneklerin Nano Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

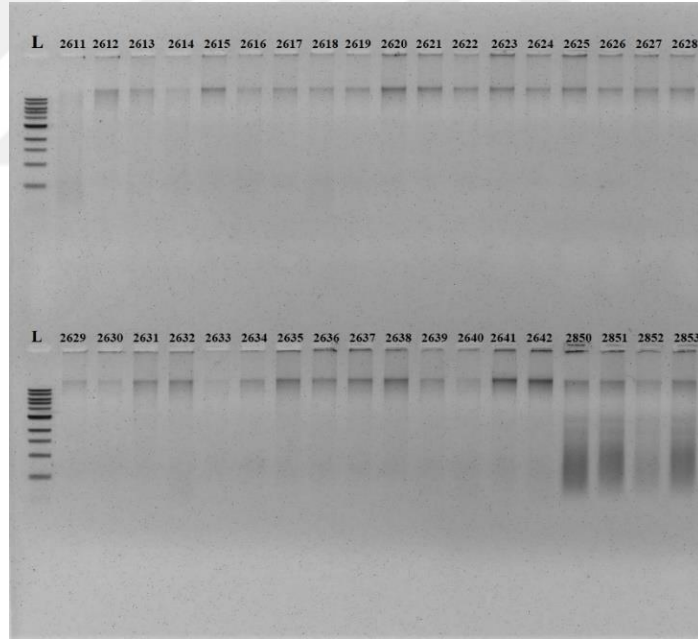
Örnek Adı	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618
Konsantrasyon	50,91	18,46	13,67	12,08	19,76	9,67	9,28	30,43
A260/A280	1,48	2,13	2,33	1,76	2,09	2,13	2,85	1,78
A260/A230	0,36	0,29	0,3	0,35	0,37	0,24	0,2	0,43
Örnek Adı	2619	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626
Konsantrasyon	31,23	45,46	32,07	20,7	28,63	2,13	23,23	15,47
A260/A280	1,61	1,67	1,72	1,72	1,75	0,37	1,76	0,98
A260/A230	0,42	0,53	0,46	0,35	0,4	13,35	0,39	0,35
Örnek Adı	2627	2628	2629	2630	2631	2632	2633	2634
Konsantrasyon	11,29	12,46	13,49	52,22	11,35	18,36	54,78	59,35
A260/A280	1,48	1,56	1,76	1,49	1,7	1,59	1,5	1,38
A260/A230	0,22	0,24	0,21	0,42	0,19	0,29	0,44	0,54
Örnek Adı	2635	2636	2637	2638	2639	2640	2641	2642
Konsantrasyon	20,93	24,68	33,98	28,57	24,29	20,06	48,08	31,11
A260/A280	1,85	1,89	1,39	1,85	2,45	1,74	1,92	1,82
A260/A230	0,49	0,48	0,63	0,58	0,39	0,39	0,47	0,48
Örnek Adı	2611-L	2612-L	2613-L	2614-L	2615-L	2616-L	2617-L	2618-L
Konsantrasyon	138,37	-0,91	-7,66	-7,81	-7,31	16,18	-5,9	14,58
A260/A280	1,54	0,42	12,51	8,85	4,52	2,04	18,54	1,15
A260/A230	0,48	0,1	0,52	0,6	1,03	0,24	0,55	0,36
Örnek Adı	2619-L	2620-L	2621-L	2622-L	2623-L	2624-L	2625-L	2626-L
Konsantrasyon	15,01	-5,29	42,72	-1,12	-1,2	19,27	25,63	-2,78
A260/A280	1,76	4,44	1,53	0,34	0,31	1,8	1,74	2,44
A260/A230	0,31	0,53	0,63	0,56	0,41	0,29	0,43	0,37
Örnek Adı	2627-L	2628-L	2629-L	2630-L	2631-L	2632-L	2633-L	2634-L
Konsantrasyon	4,04	15,03	7,58	5,37	12,83	11,41	1,41	11,27
A260/A280	2,03	1,73	2,02	6,25	1,93	1,44	12,82	1,87
A260/A230	0,15	0,29	0,19	0,1	0,31	0,36	0,04	0,19
Örnek Adı	2635-L	2636-L	2637-L	2638-L	2639-L	2640-L	2641-L	2642-L
Konsantrasyon	-3,1	-6,02	-4,23	17,27	-4,62	20,05	154,22	31,41
A260/A280	1,68	6,87	3,29	1,67	2,3	1,8	1,57	1,63
A260/A230	0,36	0,54	0,58	0,28	0,49	0,21	0,64	0,44
Örnek Adı	2850-L	2851-L	2852-L	2853-L	2850	2851	2852	2853
Konsantrasyon	145,5	92,0	118,9	87,4	77,9	92,7	47,5	56,6
A260/A280	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9	2,00	1,9	2,01
A260/A230	1,39	1,49	1,53	0,79	1,12	1,23	0,99	1,00

DNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin (Bölüm 3.3.2 DNA İzolasyonu) florometrik analizi (bölüm 3.3.4) gerçekleştirildi.

Çizelge 4.2 Örneklerin Florometrik Ölçüm Sonuçları

Örnek Adı	2611	2612	2613	2614	2615	2616	2617	2618	2619
Konsantrasyon(ng/μl)	3.91	4.92	5.66	3.41	4.52	3.50	2.13	5.68	1.88
Örnek Adı	2620	2621	2622	2623	2624	2625	2626	2627	2628
Konsantrasyon(ng/μl)	4.25	5.76	3.34	3.04	1.29	5.06	5.56	2.36	2.62
Örnek Adı	2629	2630	2631	2632	2633	2634	2635	2636	2637
Konsantrasyon(ng/μl)	5.14	4.53	3.23	3.11	3.87	4.52	10.5	11.3	13.5
Örnek Adı	2638	2639	2640	2641	2642	2850	2851	2852	2853
Konsantrasyon(ng/μl)	17.5	13.7	13.3	5.73	5.75	5.78	6.63	14.0	11.7

İzolasyonları gerçekleştirilen örneklerin DNA jel elektroforezi görüntüsü;



Şekil 4.1 DNA Jel Elektroforezi Görüntüsü.

Çizelge 4.3’de verilen primer çiftleri kullanılarak, DNA izolatlarından PCR gerçekleştirildi (bölüm 3.3.6). 5x Hot Firepol Blend Master Mix marka PCR reaktifi kullanılarak Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’de verilen protokollere göre gerçekleştirildi.

Çizelge 4.3 Primer Tablosu

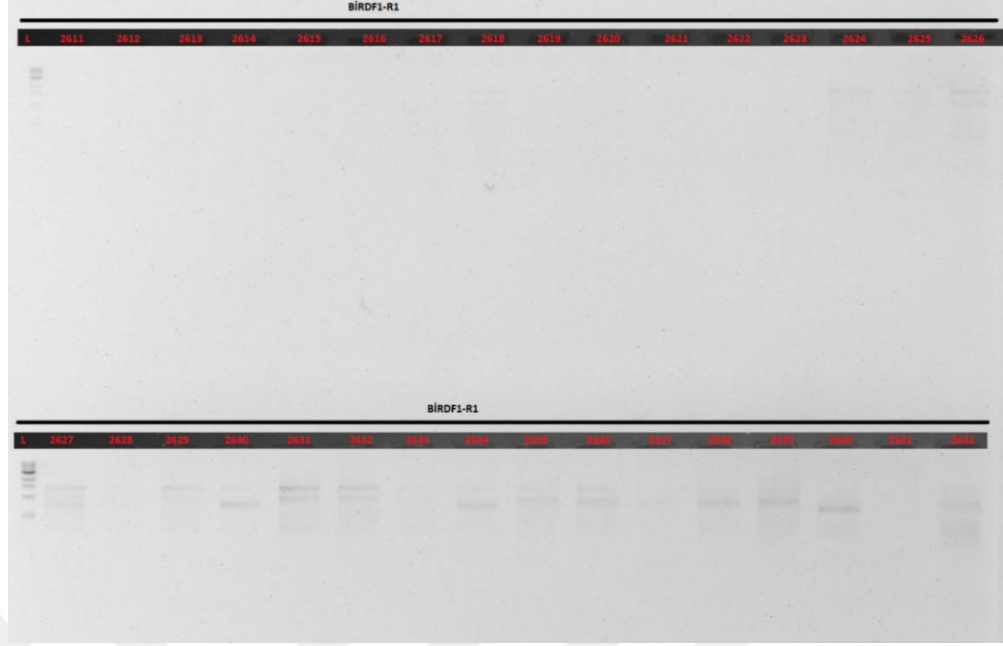
Primer Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Gen Bölgesi	Referans
BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	55 °C	COI	(Hebert 2004)
BirdR1	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG	55 °C	COI	(Hebert 2004)
L14993	CCATCCAACATCTCAGCYTGAAAYTT	63 °C	cytb/tRNA-Thr	(Helbig ve Seibold 1999)
H16065	GGAGTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC	63 °C	cytb/tRNA-Thr	(Helbig ve Seibold 1999)
L5216	GGCCCATACCCCGRAAATG	55 °C	ND2	(Sorenson 1999)
H6313	ACTCTTRTTTAAGGCTTTGAAGGC	55 °C	ND2	(Sorenson 1999)

Çizelge 4.4 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg), PCR Reaksiyon Protokolü

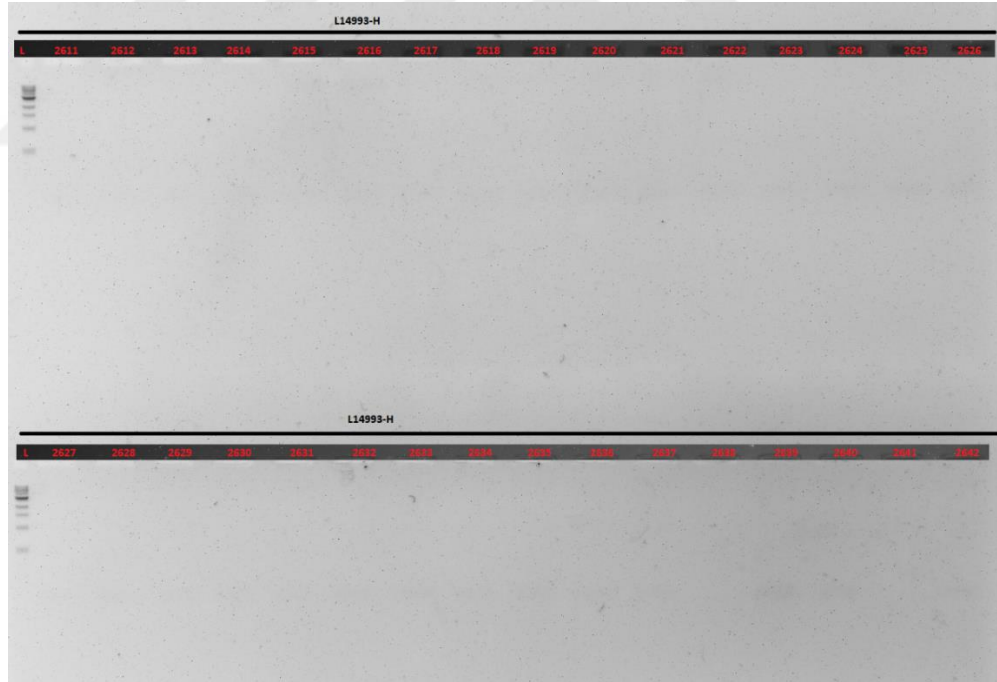
5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)	1X	33X (32+1)
Karışım	2.5 µl	82,5 µl
İleri Yön	0.25 µl	8,25 µl
Geri Yön	0.25 µl	8,25 µl
Su	6 µl	198 µl
DNA	1 µl	µl
TOPLAM	10 µl	297+32(DNA) µl

Çizelge 4.5 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg), Termal Döngü Protokolü

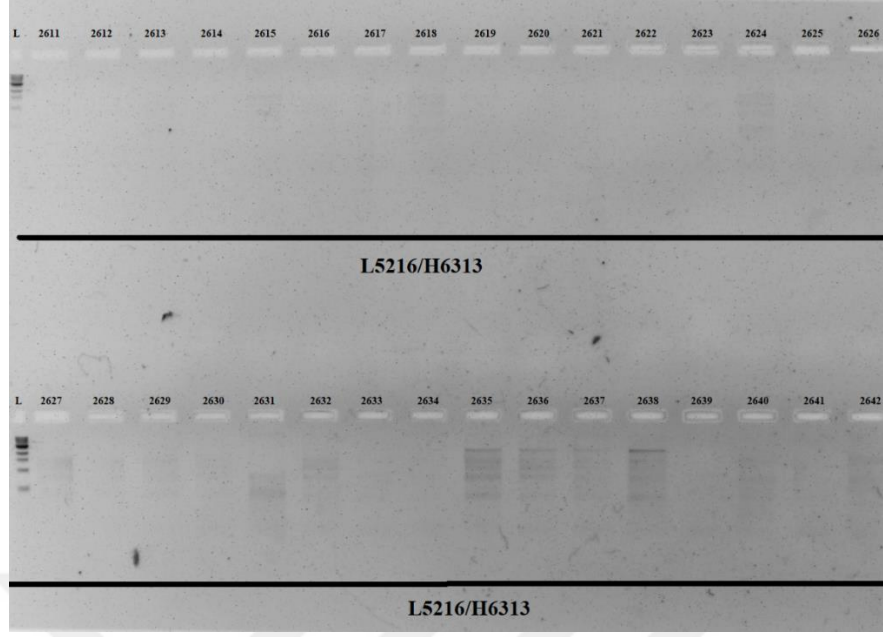
5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)- PCR Döngü Protokolü			
Ön Denatürasyon	95°C	15 dk.	30 Döngü
Denatürasyon	95°C	15 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	Çizelge 4.3	45 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	2 dk.	
Son Sentez	72°C	10 dk.	
	4°C	∞	



Şekil 4.2 Bird-F1/Bird-R1, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder



Şekil 4.3 L14993/ H16065, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder



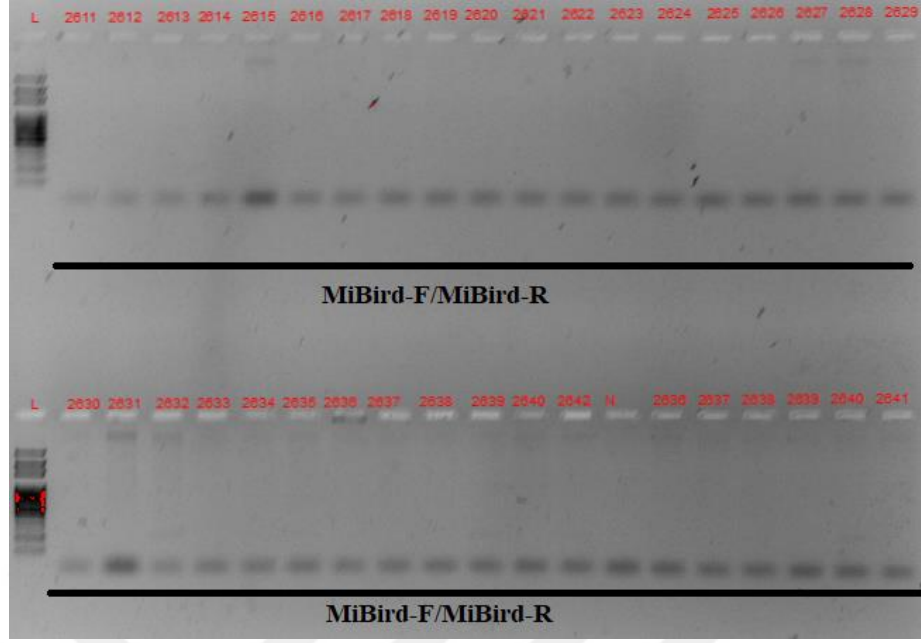
Şekil 4.4 L5216/H6313, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Aves sınıfı için moleküler tür tanımlamada, farklı gen bölgelerine ait evrensel barkod primerlerinin (Çizelge 4.3) PCR'ı gerçekleştirildi. PCR sonuçlarında pozitif bant elde edilemedi. Hem primerlerin istenilen sonucu vermemesi hem de barkod primerlerinin yeni nesil dizileme için dizisi için çok uzun olmasından dolayı optimizasyonları gerçekleştirilmedi.

DNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin yaklaşık 250 baz çifti uzunluğunda dizi çoğaltan 12S gen bölgesine ait MiBird-F/MiBird-R (Ushio vd. 2018) primer çifti (Çizelge 4.6) ile PCR'ları Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'e göre gerçekleştirildi. Bağlanma sıcaklığı 65 °C'ye ayarlandı.

Çizelge 4.6 MiBird-U-F/MiBird-U-R Primer Bilgi Çizelgesi

Primer Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Gen Bölgesi	Referans
MiBird-U-F	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC	65 °C	12S	(Ushio vd. 2018)
MiBird-U-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG	65 °C	12S	



Şekil 4.5 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

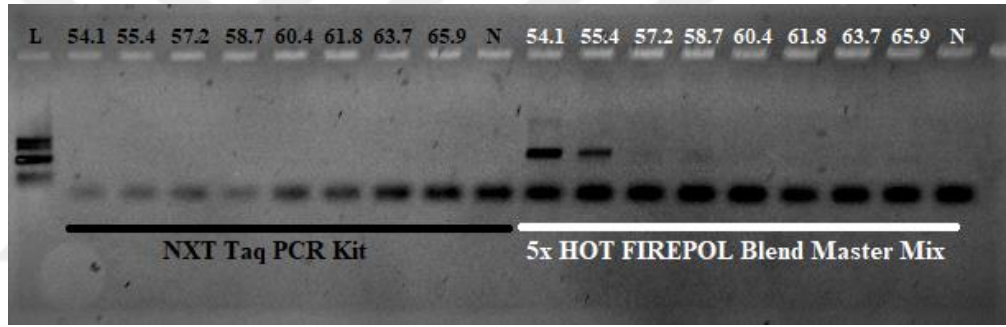
MiBird-U-F/ MiBird-U-R primer çifti ile PCR 'ı kurulan örneklerin, 65°C bağlanma sıcaklığında silik band veren 2632 nolu örnek ile gradient PCR'ı gerçekleştirildi. Gradient aralığı 54-65°C olarak ayarlandı. PCR reaktifi olarak EURx marka "NXT Taq PCR Kit" ve "5x Hot Firepol Blend Master Mix" kullanıldı. Çizelge 4.3-4.4 ve Çizelge 4.7 - 4.8 'de verilen protokollere göre reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Çizelge 4.7 NXT Taq PCR Kit, PCR Reaksiyon Protokolü

NXT Taq PCR Kit	1X	9X (8+1)
Karışım	5 µl	45 µl
10X Loading Colour Buffer	1 µl	9 µl
İleri Yön	0.25 µl	2.25 µl
Geri Yön	0.25 µl	2.25 µl
Su	2.5 µl	22.5 µl
DNA	1 µl	1 µl
TOPLAM	10 µl	81+8 (DNA) µl

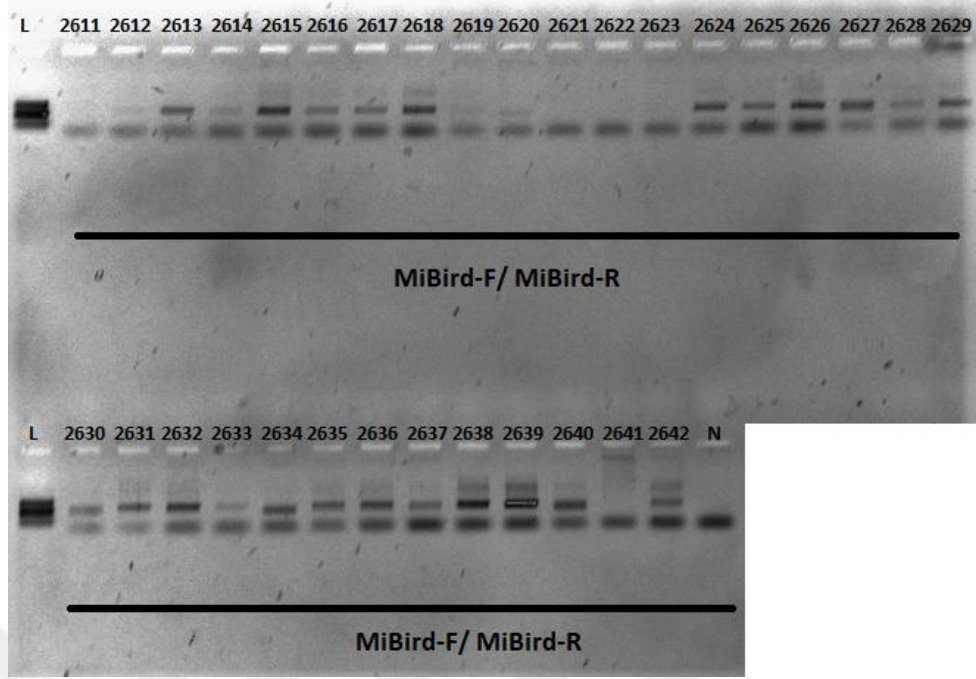
Çizelge 4.8 NXT Taq PCR Kit, Termal Döngü Protokolü

NXT Taq PCR Kit -PCR Döngü Protokolü			
Ön Denatürasyon	95°C	5 dk.	35 Döngü
Denatürasyon	95°C	5 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	54-65°C	5 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	+1 her 100 bp için +3 sn (8sn ayarlandı 250bp)	
Son Sentez	72°C	1 dk.	
	4°C	∞	



Şekil 4.6 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Jel görüntüsü sonucunda bağlanma sıcaklığı 54°C olarak belirlendi. MiBird-U-F/ MiBird-U-R primerleri ile bütün örneklerin PCR'ı optimize edilen bağlanma sıcaklığı ile “5x Hot Firepol Blend Master Mix” kullanılarak Çizelge 4.4 ve 4.5’e göre tekrar kuruldu.



Şekil 4.7 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

18.08.2018 tarihinde Kulu Uyuz Gölü'nde yapılan tez arazisi örneklerinin (2850, 2851, 2852, 2853) PCR'ları "EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix" ile kuruldu (Çizelge 4.10-4.11). Göl balık popülasyonu açısından yoğun olduğu için pozitif kontrol olarak yeni kullanılan PCR karışımını denemek için MiFish-U-F/ MiFish-U-R balık evrensel metabarkodlama primerleri kullanıldı.

Çizelge 4.9 Primer Bilgi Tablosu

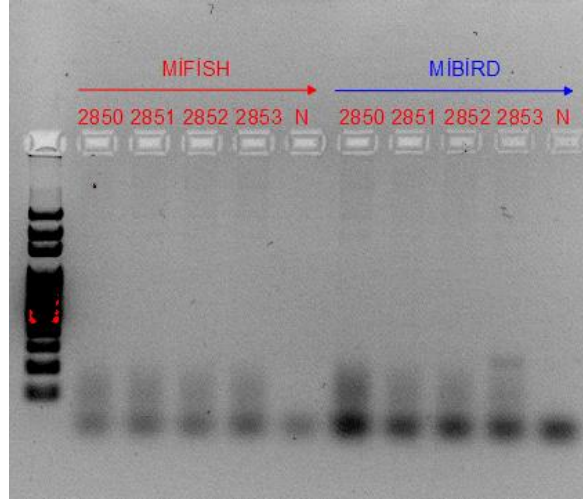
Primer Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Gen Bölgesi	Referans
MiBird-U-F	GGGTTGGTAAATCTTGTGCCAGC	54 °C	12S	(Ushio vd. 2018)
MiBird-U-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG	54 °C	12S	
MiFish-U-F	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC	64 °C	12S	(Miya vd. 2015)
MiFish-U-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG	64 °C	12S	

Çizelge 4.10 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü

EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix	1X	5X (4+1)
Karışım	5 µl	25 µl
İleri Yön	0.04 µl	0.2 µl
Geri Yön	0.04 µl	0.2 µl
Su	3.92 µl	19.6 µl
DNA	1 µl	1 µl
TOPLAM	10 µl	45+4(DNA) µl

Çizelge 4.11 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, Termal Döngü Protokolü

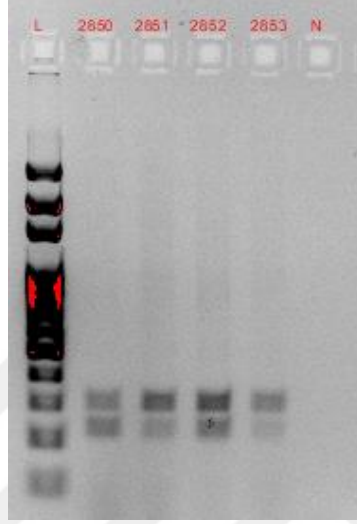
EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix- PCR Döngü Protokolü			
Denatürasyon	98°C	10 sn.	30 Döngü
Bağlanma Sıcaklığı	Çizelge 4.9	30 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	20 sn.	
	4°C	∞	



Şekil 4.8 MiBird-U-F/ MiBird-U-R ve MiFish-U-F/ MiFish-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

“EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” PCR ile gerçekleştirilen (Şekil 4.8) jel görüntüsünden sonuç elde edilemedi.

PCR optimizasyonları daha önce “5x Hot Firepol Blend Master Mix” ile gerçekleştirilen 2611-2642 nolu örneklerin PCR’ları Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’e göre 2850, 2851, 2852, 2853 numaralı örnekler ile gerçekleştirildi. Bağlanma sıcaklığı 54°C’ye ayarlandı.



Şekil 4.9 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

“5x HOT FİREPOLBlend Master Mix” ile gerçekleştirilen PCR sonucunda istenilen yerde band elde edildi (Şekil 4.9). Örneklerin tekrar “EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” ile PCR’ı kuruldu. İlk denemede (Çizelge 4.10- 4.11), orijinal protokolüne göre reaksiyon volümü 50ul’dan 10ul’ye düşürüldü ve sonuç elde edilemedi (Şekil 4.8).

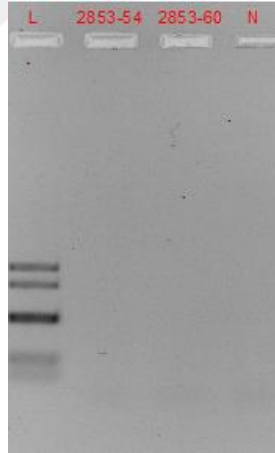
Optimizasyon için orijinal protokole göre 50 ul’lik reaksiyon kurularak “2853” numaralı örnek ile iki farklı bağlanma sıcaklığı kullanılarak optimizasyon gerçekleştirildi (Çizelge 4.12- 4.13).

Çizelge 4.12 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü

EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix	1X	5X (4+1)
Karışım	25 µl	125 µl
İleri Yön	0.2 µl	1 µl
Geri Yön	0.2 µl	1 µl
Su	23.6 µl	118 µl
DNA	1 µl	1 µl
TOPLAM	50 µl	245+4(DNA) µl

Çizelge 4.13 EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix, Termal Döngü Protokolü

EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix- PCR Döngü Protokolü			
Denatürasyon	98°C	10 sn.	30 Döngü
Bağlanma Sıcaklığı	54°C ve 60°C	30 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	20 sn.	
	4°C	∞	

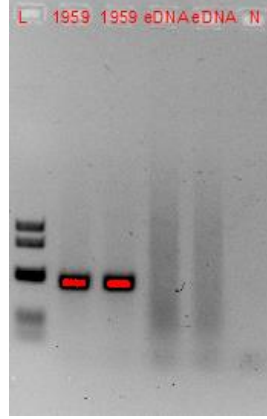


Şekil 4.10 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

“EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” ile sonuç elde edilemedi. (Şekil 4.10)

Örneklerin “EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” ile reaksiyona girip girmediğini kontrol etmek için DNA izolasyon sonucu kaliteli çıkan (260/280 değeri) balık kas dokusu DNA izolatu ve balık akvaryumundan filtre izolasyonu yapılan eDNA izolatının

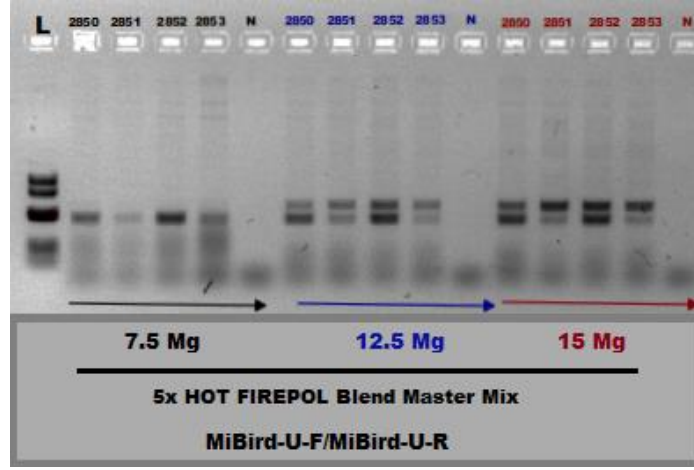
“EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” optimizasyonu için PCR'ları kuruldu. 10 ul'lik reaksiyon hazırlandı (Çizelge 4.10- 4.11).



Şekil 4.11 MiFish-U-F/ MiFish-U-R, 1959: Balık kas dokusu DNA izolatu, eDNA: balık akvaryumundan filtre izolasyonu yapılan eDNA izolatu, N: Negatif kontrol, L: Ladder

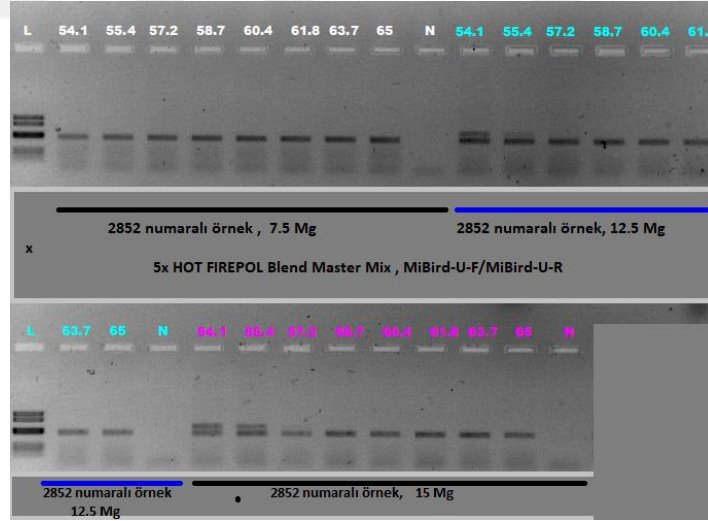
Gerçekleştirilen optimizasyon sonuçlarına göre “EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix” ile sadece dokudan DNA izolatu elde edilmiş PCR sonucunda pozitif band elde edilmiştir. eDNA izolatları ile gerçekleştirilen PCR'larda sonuç elde edilememiştir bu karışım eDNA çalışmaları için uygun değildir.

Örneklerin hangi Mg konsantrasyonunda PCR sonuçlarının en iyi şekilde elde edileceğini tespit etmek için “5x Hot Firepol Blend Master Mix (7.5 Mg, 12.5 Mg ve 15 Mg)” kullanılarak 3 farklı Mg (magnezyum) konsantrasyonlarında PCR karışımları ile optimizasyon yapılmıştır (Çizelge 4.4- 4.5). 2850, 2851, 2852, 2853 numaralı örnekler ile bağlanma sıcaklığı 54°C 'ye ayarlanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.12 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Gerçekleştirilen PCR sonuçlarına göre 54°C’de ansipesifik bağlanma elde edilmesinden dolayı MiBird-U-F/ MiBird-U-R primerleri ile “2852” numaralı örnek kullanılarak tekrar “5x Hot Firepol Blend Master Mix (7.5 Mg, 12.5 Mg ve 15 Mg)” ile PCR yapılmasına karar verildi. Farklı Mg konsantrasyonları kullanılarak gradient PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5). Bağlanma sıcaklığı 54-65°C arası ayarlandı.



Şekil 4.13 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, Gradient PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Gerçekleştirilen gradient PCR sonucunda pozitif band sonucu alınan örnekler DNA dizi analizine hazırlandı. DNA dizi analizi protokolü bölüm 3.3.7’ de verilen protokole göre gerçekleştirildi ve bölüm 3.3.8’de verilen eşleşme protokolü ile sonuçlar elde edildi.

Çizelge 4.14 Sanger Dizileme Sonuçları

Örnek No	Eşleşme	Eşleşme Yüzdesi (P.ident)	Eşleşme Yüzdesi (Q.cover)	Uzunluk
2852	<i>Sturnus vulgaris</i>	100 %	34%	61
2852	<i>Streptopelia turtur</i>	96.15%	8%	314
2852	<i>Ficedula albicollis</i>	94.59%	25%	144

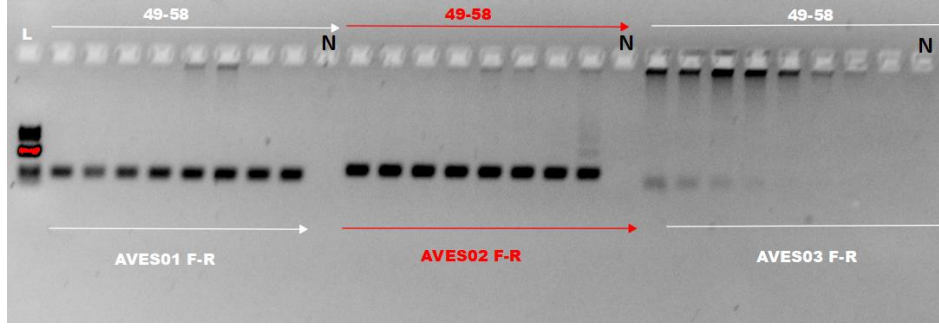
MiBird-U-F/MiBird-U-R primerler ile gerçekleştirilen ön optimizasyonlar ve dizileme sonuçlarında kuş türleri ile eşleşme alındı fakat dizi okuma kaliteleri düşük ve istenilen uzunlukta okuma elde edilemedi.

Literatür araştırması yapılarak yeni primerler sentezlendi.

Çizelge 4.15 Primer Bilgi Tablosu

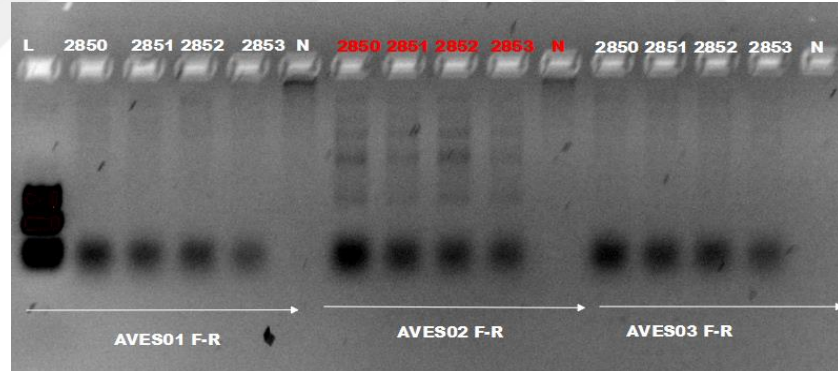
Primer Adı	Primer Dizisi	Gen Bölgesi	Bağlanma Sıcaklığı	Referans
Aves01-F	GATTAGATACCCCACTATGC	12S	54°C	(Epp vd. 2012)
Aves01-R	GTTTAAAGCGTTTGTGCTCG	12S	54°C	(Epp vd. 2012)
Aves02-F	GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC	12S	51°C	(Taberlet vd. 2018)
Aves02-R	CATACCGCCGTCGCCAG	12S	51°C	(Taberlet vd. 2018)
Aves03-F	TATGATAAAGTGAACATRGAGG	tRNA ile-gln	49°C	(Taberlet vd. 2018)
Aves03-R	GGTTCRAYTCCTRCTTTTCTA	tRNA ile-gln	49°C	(Taberlet vd. 2018)

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek için daha önce dokudan DNA ekstraksiyonu yapılmış DNA izolatu ile “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak gradient PCR kuruldu (Çizelge 4.4- 4.5). Bağlanma sıcaklığı 49-58 °C’ye ayarlandı.



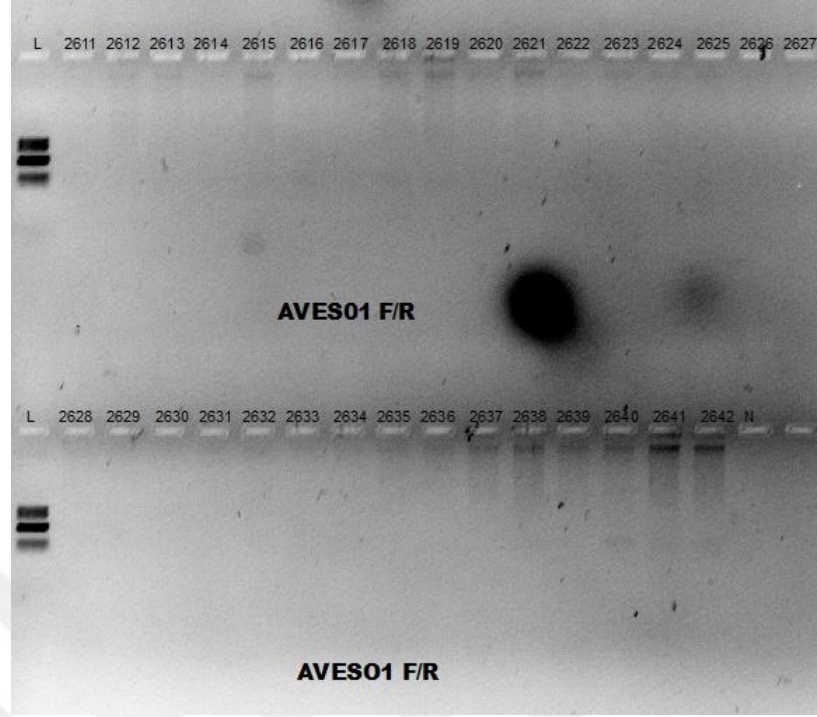
Şekil 4.14 PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Gradient PCR sonucunda primerlerin bağlanma sıcaklıkları Çizelge 4.15’de verilmiştir. Bağlanma sıcaklıkları belirlenen Aves01-F/Aves01-R, Aves02-F/ Aves02-R ve Aves03-F/ Aves03-R primerleri ve 2850, 2851, 2852 ve 2853 numaralı örnekler ile “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR kuruldu (Çizelge 4.4- 4.5). Bağlanma sıcaklıkları Çizelge 4.15’e göre ayarlandı.

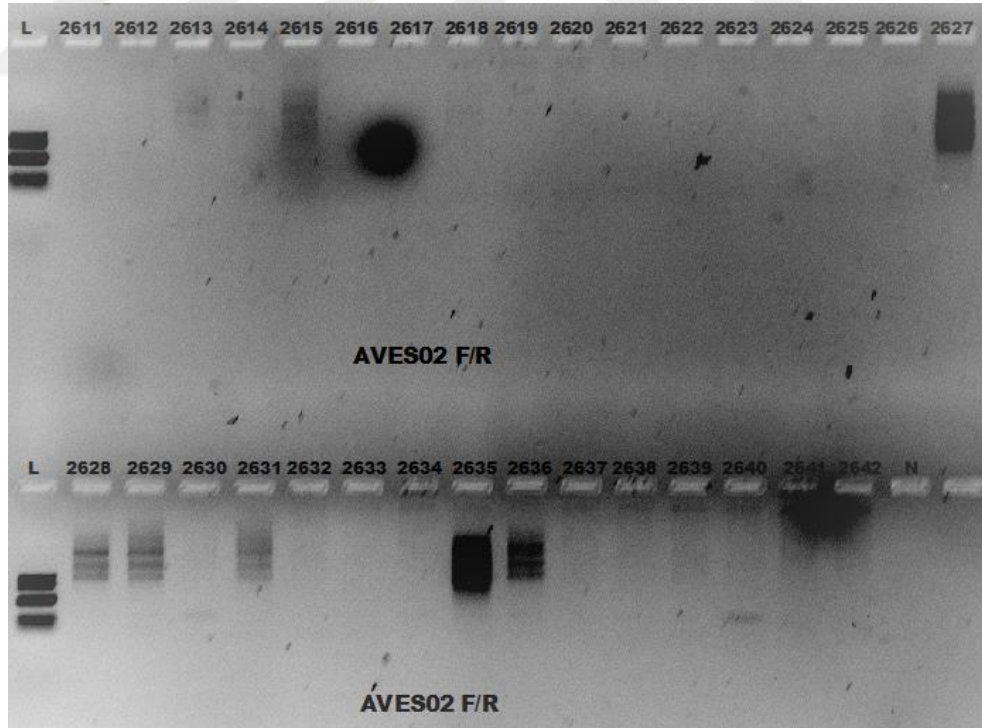


Şekil 4.15 PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

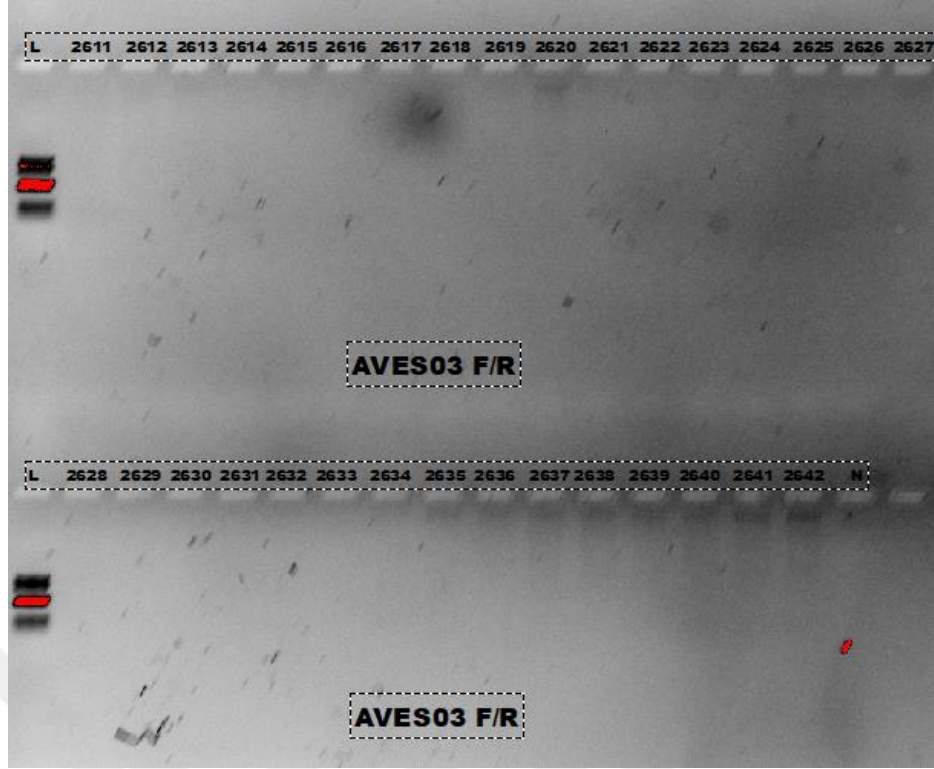
Gerçekleştirilen PCR sonucunda eDNA örnekleri ile istenilen uzunlukta PCR ürünü elde edilemedi (70-100 bç). Tüm örnekler kullanılarak “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” ile tekrardan PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5). Bağlanma sıcaklıkları Çizelge 4.15’e göre ayarlandı.



Şekil 4.16 AVES01-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder



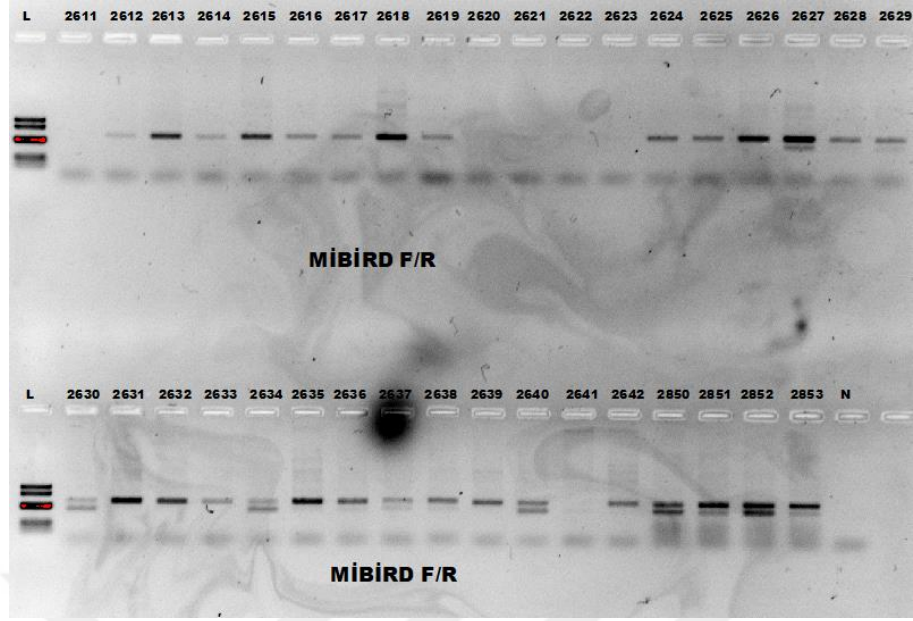
Şekil 4.17 AVES02-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder



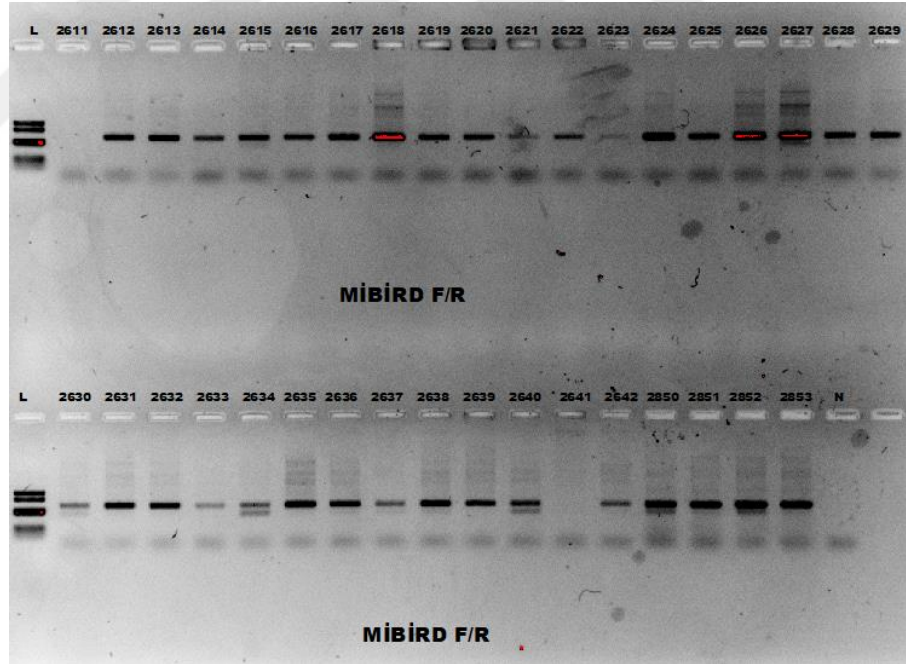
Şekil 4.18 AVES03-F/R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Tez örnekleri ile kurulan PCR sonucunda Çizelge 4.15’de kullanılan primerler ile amplifikasyon gerçekleştirilemedi.

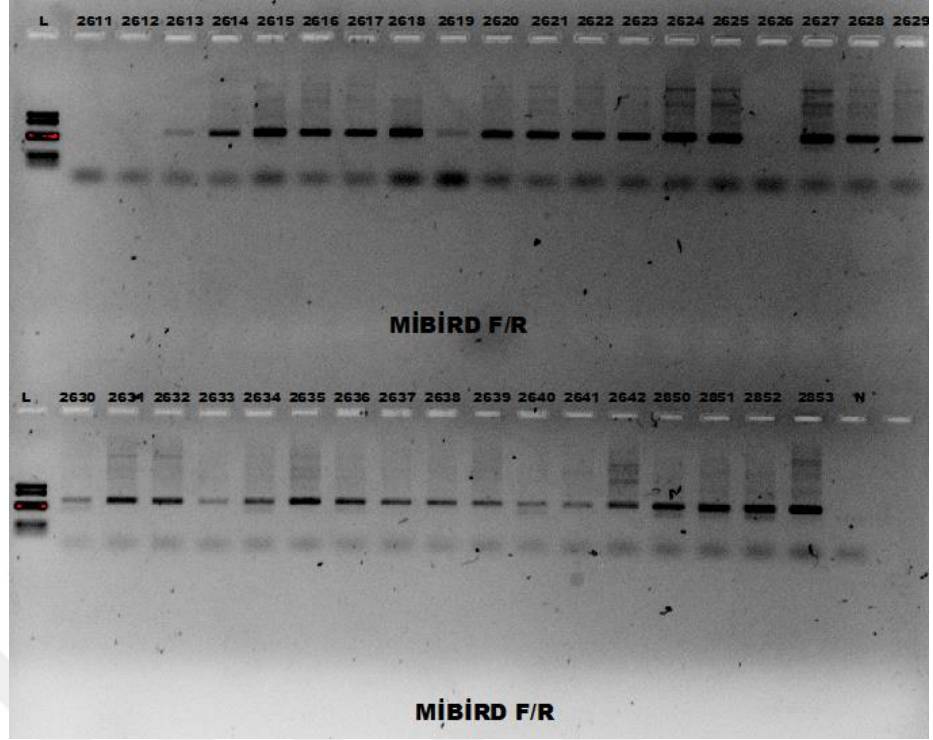
Sonuç elde edilmemesinden dolayı tez örnekleri ile MiBird-U-F/MiBird-U-R primer çifti kullanılarak “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” ile PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5). PCR sırasında inhibitörleri azaltmak için DNA konsantrasyonları seyreltildi (1:2 ve 1:5 dilüsyonlar). Bağlanma sıcaklığı 54°C’ye ayarlandı.



Şekil 4.19 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, Normal Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder



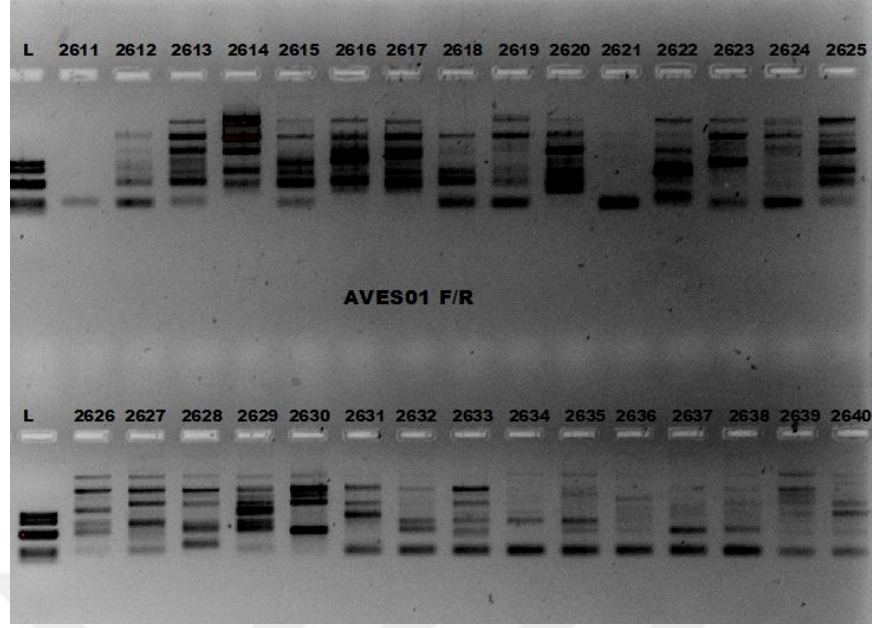
Şekil 4.20 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, 1:2 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder



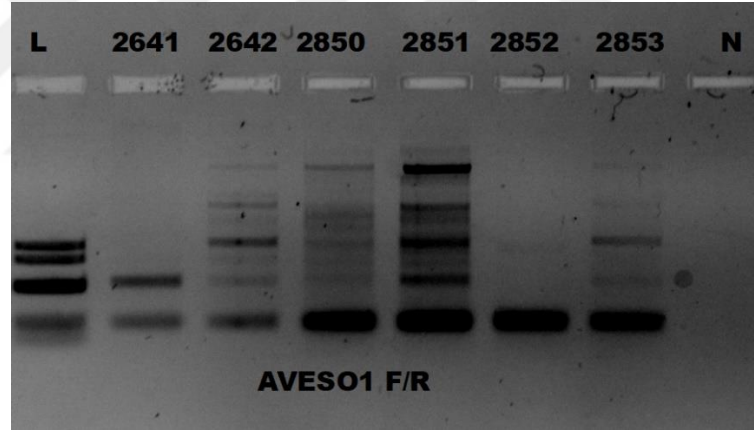
Şekil 4.21 MiBird-U-F/ MiBird-U-R, 1:5 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder

PCR sonuçlarına göre her örnek için farklı konsantrasyonların kullanılmasına karar verildi. Anspesifik bağlanmalar birçok örnekte elimine edildi.

Çizelge 4.15’de verilen primer çiftleriyle daha önce sonuç elde edilemeyen tez örneklerinin tekrar optimizasyonu gerçekleştirildi. Aves01-F/ Aves01-R primer çifti ile “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR kuruldu (Çizelge 4.4-4.5). 1:2 konsantrasyon DNA kullanıldı. Termal döngü protokolü 45 döngüye ayarlanır. Bağlanma sıcaklığı 54°C.

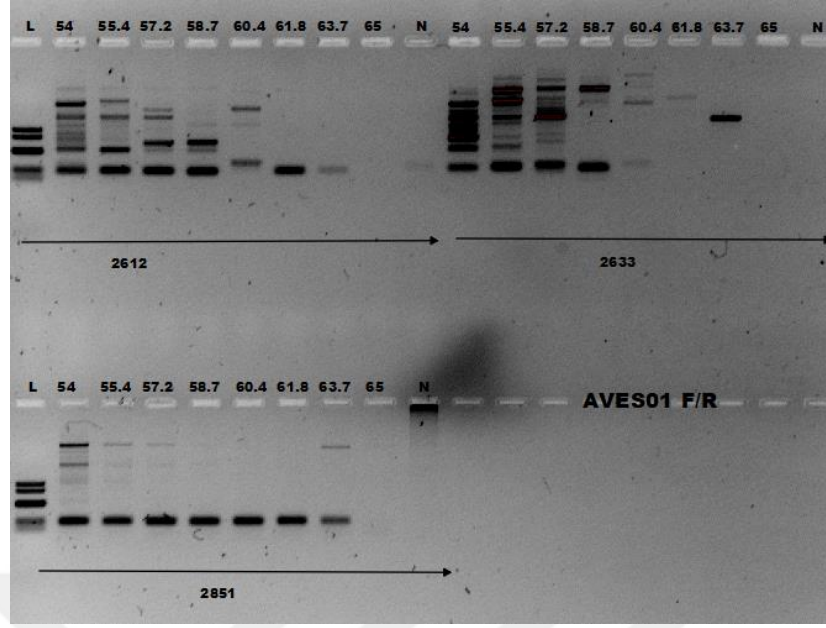


Şekil 4.22 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder



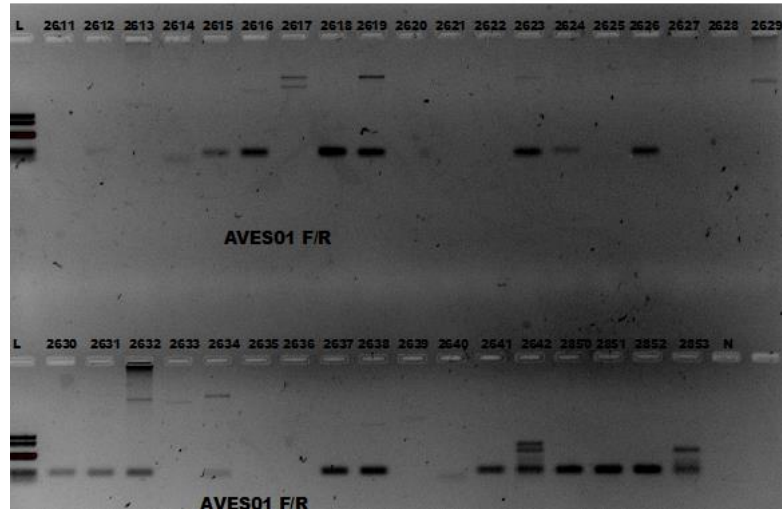
Şekil 4.23 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder

Aves01-F/ Aves01-R primer çifti ile anspesifik bağlanmaları elimine etmek için gradient PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5). “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak örneklerin PCR’ı hazırlanır. (1:2 dilüsyon DNA ve 2612, 2633, 2851 numaralı örnekler kullanıldı). Termal döngü protokolü 45 döngüye ayarlandı. Bağlanma sıcaklığı 54°C.

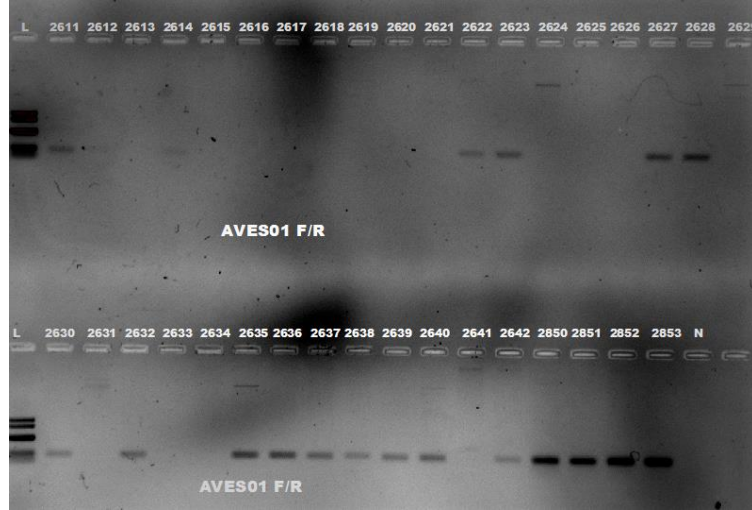


Şekil 4.24 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder

Gerçekleştirilen gradient PCR sonucunda örneklerin anspesifik bağlanmasını azaltmak için yeni bağlanma sıcaklığı 62°C olarak belirlendi. Tüm örneklerde 62°C ile “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4-4.5). 1:5 ve 1:2 dilüsyon DNA ile reaksiyon gerçekleştirildi. Termal döngü protokolü 45 döngüye ayarlanır. Bağlanma sıcaklığı 62°C.



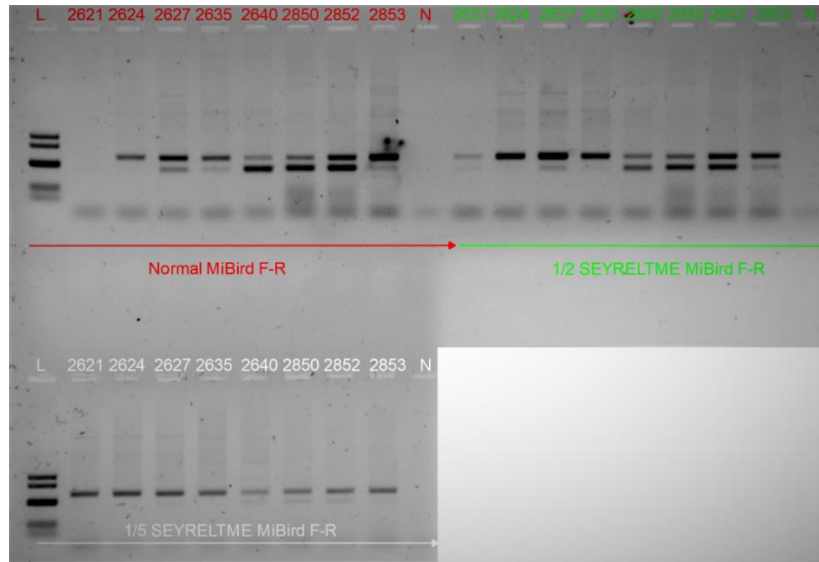
Şekil 4.25 Aves01-F/ Aves01-R, 1:5 konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder



Şekil 4.26 Aves01-F/ Aves01-R, 1:2 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder

62°C bağlanma sıcaklığında örneklerin çoğunda istenilen band uzunluğunda ürün elde edildi. Sonuç alınamayan örnekler için ileride optimizasyon gerçekleştirilecektir.

Daha önce PCR optimizasyonları MiBird-U-F/MiBird-U-F primer çifti ile 30 döngüde gerçekleştirilen örneklerin, sonuç alınamayan örnekler için 45 döngü ve farklı seyreltme konsantrasyonlarında (normal, 1:2, 1:5 konsantrasyon DNA) “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4-4.5). Bağlanma sıcaklığı 54°C.



Şekil 4.27 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal, 1:2 ve 1:5 Konsantrasyon DNA, N: Negatif kontrol, L: Ladder

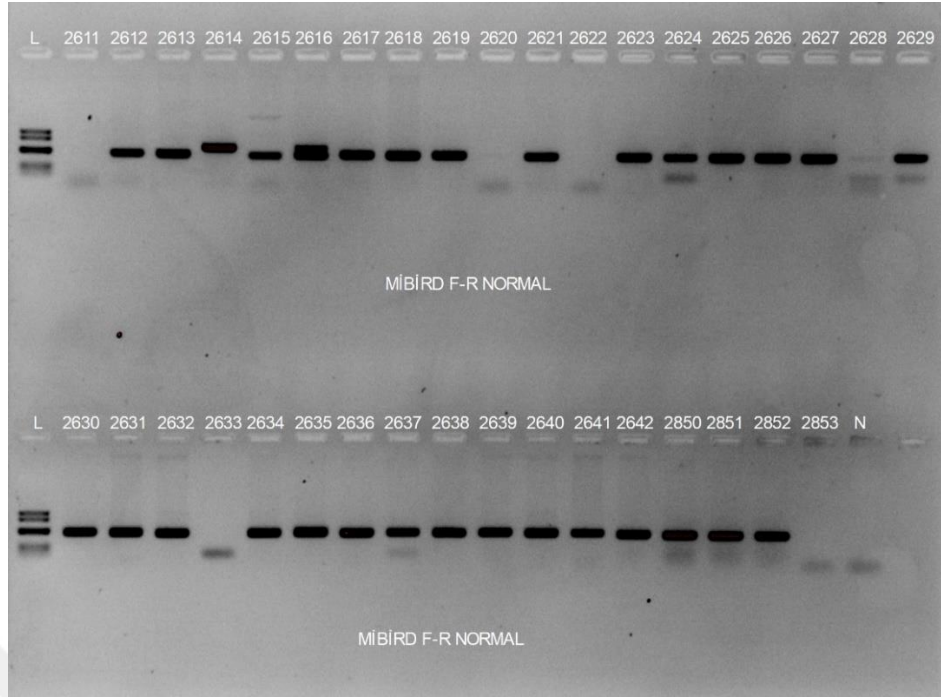
Anspesifik bağlanan PCR örneklerinden jelden pürifikasyon yapıldı. Optimizasyon için iki farklı kit denemesi gerçekleştirildi. Promega marka “Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System” kiti ve MN marka jel saflaştırma protokolü “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.3.9 PCR Ürünü Pürifikasyonu).

Silik bant veren örnekler 45 döngüde farklı seyreltme konsantrasyonlarında (normal, 1:2, 1:5 konsantrasyon DNA) “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5). Bağlanma sıcaklığı 54°C.

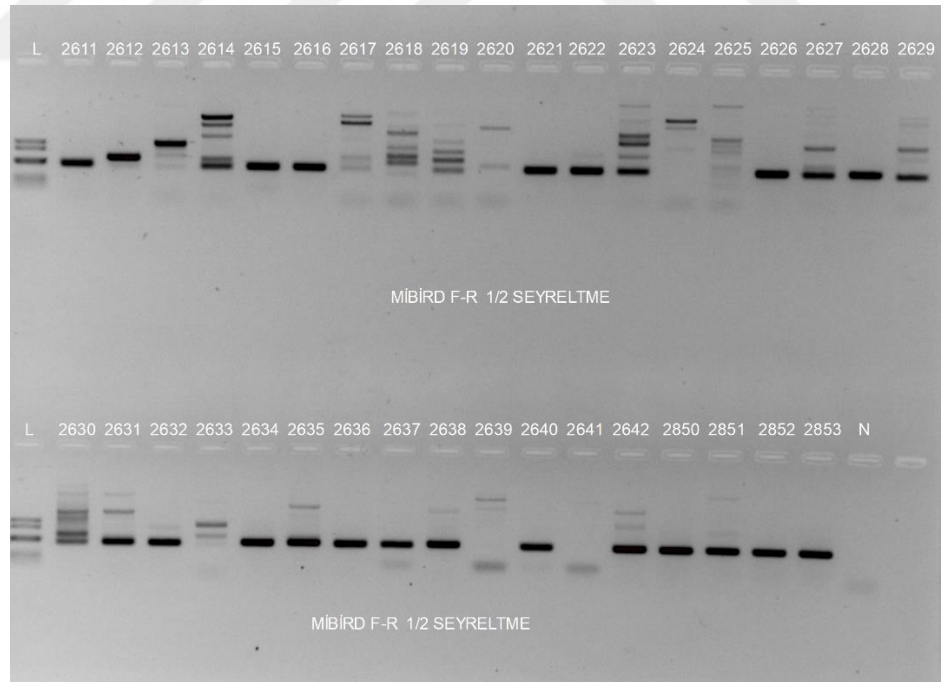


Şekil 4.28 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal, 1:2 ve 1:5 Konsantrasyon DNA ve Jel Pürifikasyon Sonrası Jel Görüntüsü, N: Negatif kontrol, L: Ladder

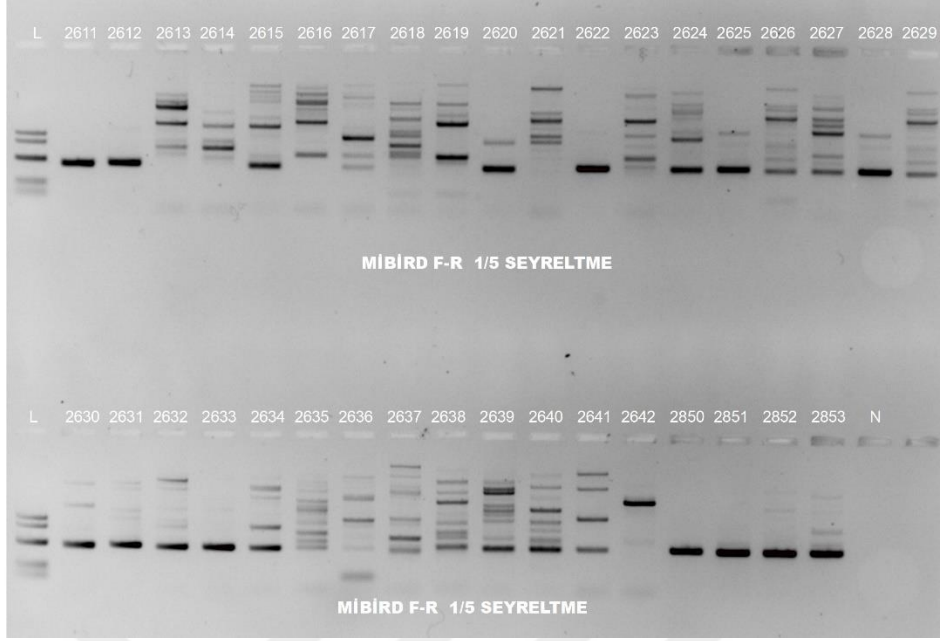
Daha önce PCR optimizasyonları MiBird-U-F/MiBird-U-F primer çifti ile 45 döngüde ve 54°C’de gerçekleştirilen örneklerin, 45 döngü, 64°C ve farklı seyreltme konsantrasyonlarında (normal, 1:2, 1:5 konsantrasyon DNA) “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak PCR’ları gerçekleştirildi (Çizelge 4.4- 4.5).



Şekil 4.29 MiBird-U-F/MiBird-U-F, Normal Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder



Şekil 4.30 MiBird-U-F/MiBird-U-F, 1:2 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder



Şekil 4.31 MiBird-U-F/MiBird-U-F, 1:5 Konsantrasyon, N: Negatif kontrol, L: Ladder

Gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucunda her örnekten pozitif sonuç elde edildi. Fakat “5x Hot Firepol Blend Master Mix (12,5 mm)” marka PCR reaktifinin NGS platformunda uygun olmadığına karar verildi. Tez örnekleri için literatürlerde sıklıkla kullanılan 3 farklı PCR karışımı için optimizasyon denemesi 2850-2851-2852 nolu örnekler ile yapıldı. Reaksiyonlar örnek başına 25 µl kuruldu.

Çizelge 4.16 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, PCR Reaksiyon Protokolü

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	10 µl	25 ul
5X Q5 Reaction Buffer	2 µl	5 µl
10 Mm dNTPs	0.2 µl	0.5 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.5 µl	1.25 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.5 µl	1.25 µl
DNA	0.5 µl	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.1 µl	5 µl
5X Q5 High GC Enhancer	2 µl	0.25 µl
Su	4.4 µl	11.25 µl

Çizelge 4.17 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, Termal Döngü Protokolü

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase			
Ön Denatürasyon	98°C	30 sn.	35 ve 45 Döngü
Denatürasyon	98°C	5 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	64°C	10 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	20 sn.	
Son Sentez	72°C	2 dk.	
	4°C	∞	

Çizelge 4.18 Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Reaksiyon Protokolü

Phusion® Hot Start PCR Mix	10 µl	25 µl
Su	2.7 µl	6.75 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.5 µl	1.25 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.5 µl	1.25 µl
DNA	1 µl	1 µl
DMSO	(0.3 µl)	0.75 µl
Phusion Mix	5 µl	12.5 µl
Toplam	10 µl	25 µl

Çizelge 4.19 Phusion® Hot Start PCR Mix, Termal Döngü Protokolü

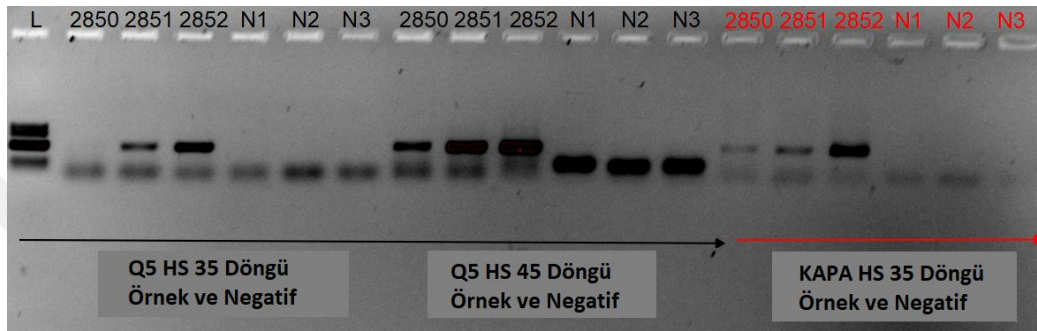
Phusion® Hot Start PCR Mix			
Ön Denatürasyon	98°C	30 sn.	35 ve 45 Döngü
Denatürasyon	98°C	5 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	64°C	10 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	15 sn.	
Son Sentez	72°C	5 dk.	
	4°C	∞	

Çizelge 4.20 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR Reaksiyon Protokolü

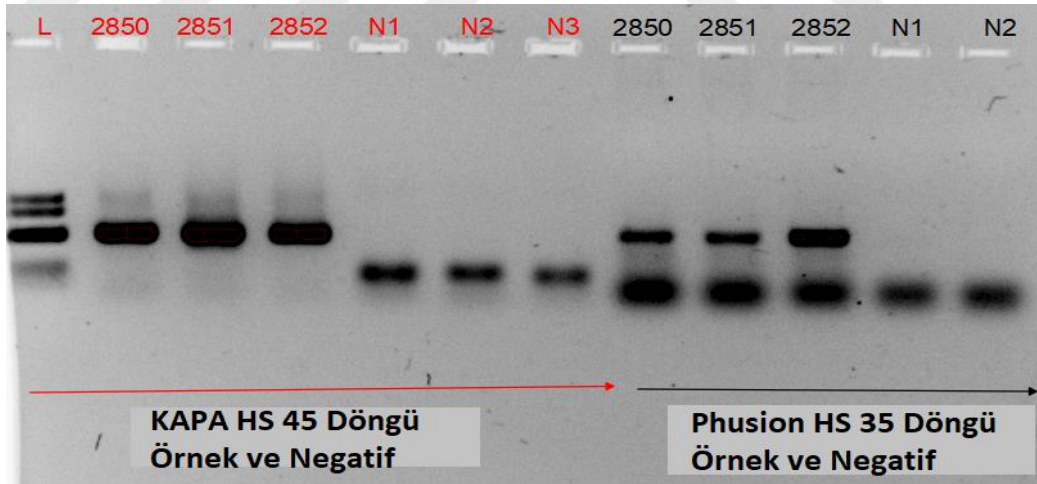
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	10 µl	25 µl
Su	3.4 µl	10 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.3 µl	0.75 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.3 µl	0.75 µl
DNA	1 µl	1 µl
Kapa Mix	5 µl	12.5 µl
Toplam	10 µl	25 µl

Çizelge 4.21 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Termal Döngü Protokolü

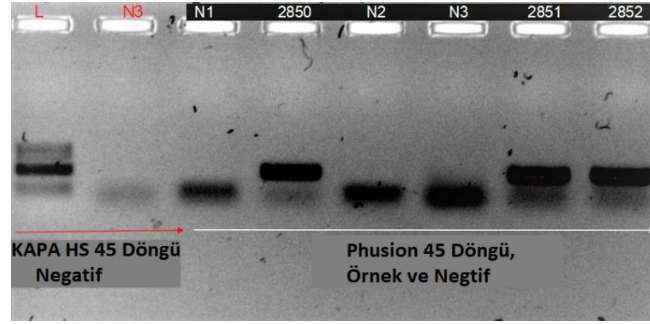
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR			
Ön Denatürasyon	98°C	3 dk.	
Denatürasyon	98°C	20 sn.	35 ve 45 Döngü
Bağlanma Sıcaklığı	64°C	15 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	15 sn.	
Son Sentez	72°C	1 dk.	
	4°C	∞	



Şekil 4.32 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder



Şekil 4.33 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder

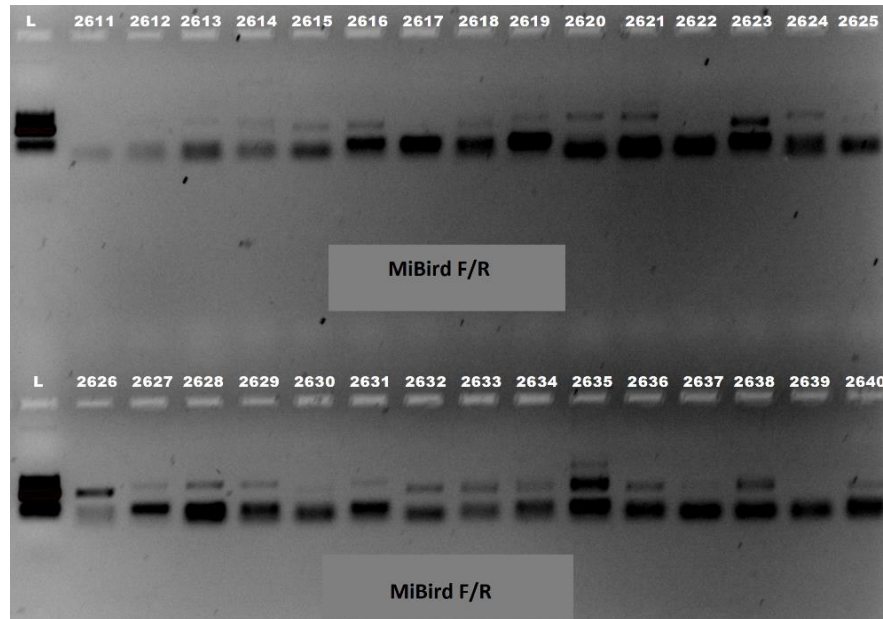


Şekil 4.34 MiBird-U-F/MiBird-U-F, N: Negatif kontrol, L: Ladder

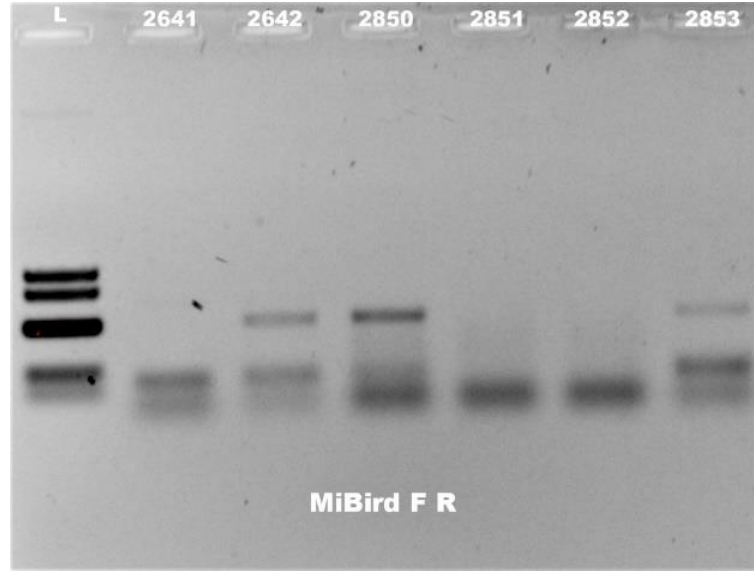
2850, 2851 ve 2852 numaralı örneklerin optimizasyonları 3 ayrı PCR karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonlar sonrasında örnekler NGS hazırlığı için NGS primerleri ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tag dizilerinin (Çizelge 3.5 ve bölüm 3.3.10), Çizelge 3.8- 3.9 ve Çizelge 3.12- 3.13 verilen MiBird-U-F/ MiBird-U-R ve AVES01-U-F/AVES01-U-R primer çiftlerinin ileri ve geri dizilerine eklenmesi ile oluşturulan primerler kullanılacaktır.

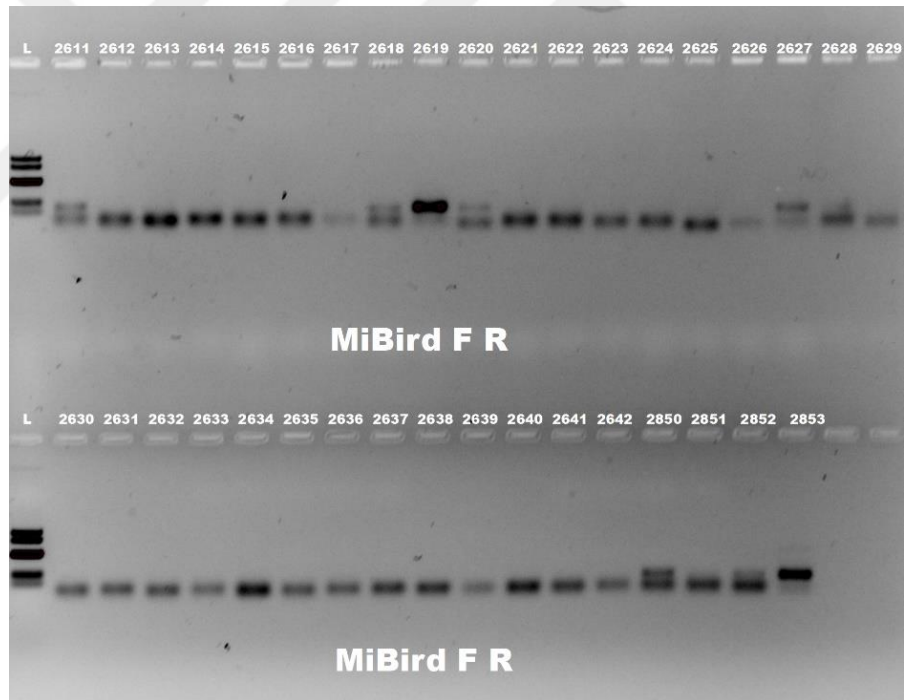
Çizelge 4.16- 4.17- 4.18- 4.19- 4.20- 4.21 verilen koşullarla, tüm örneklerden ikişerli tekrarlar halinde ayrı PCR'ları gerçekleştirilecektir. Her bir primer dizisi farklı olduğu için her bir PCR reaksiyonu için negatif kontrol reaksiyonu kurulacaktır.



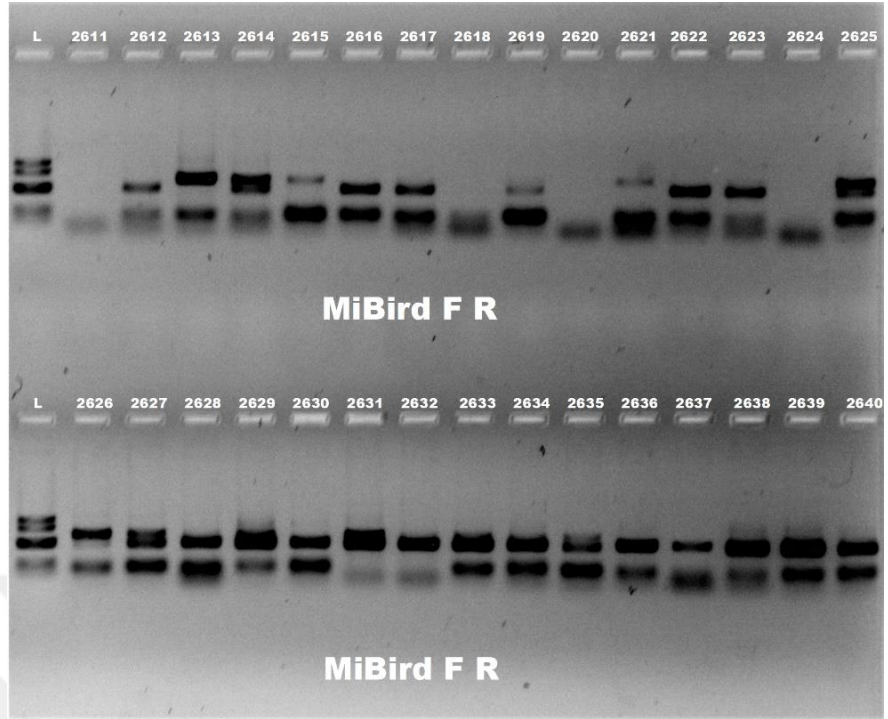
Şekil 4.35 MiBird-U-F/MiBird-U-R, High-Fidelity DNA Polymerase, L: Ladder



Şekil 4.36 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, L: Ladder



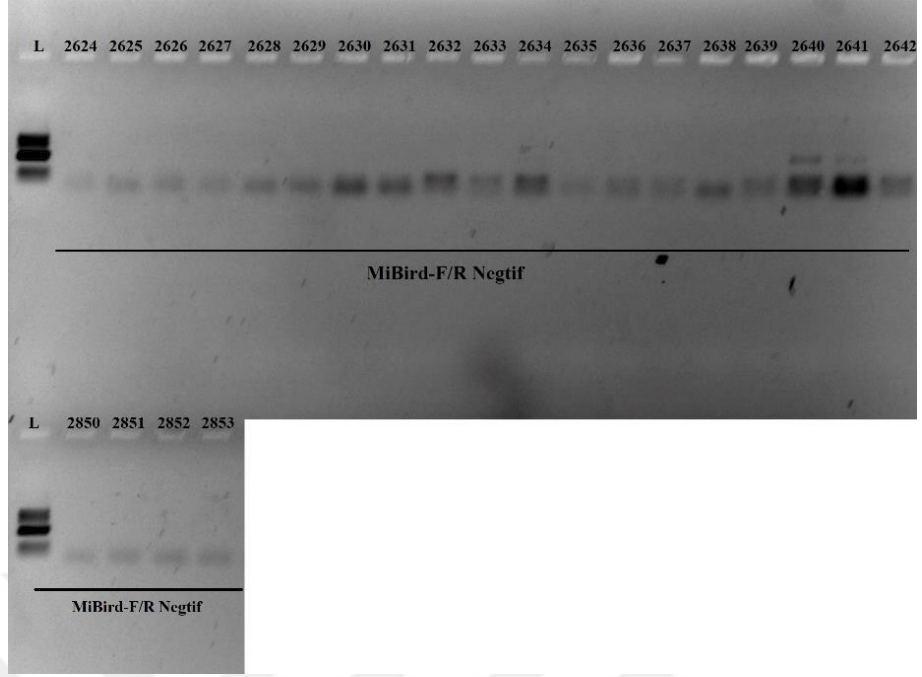
Şekil 4.37 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, PCR Negatif, L: Ladder



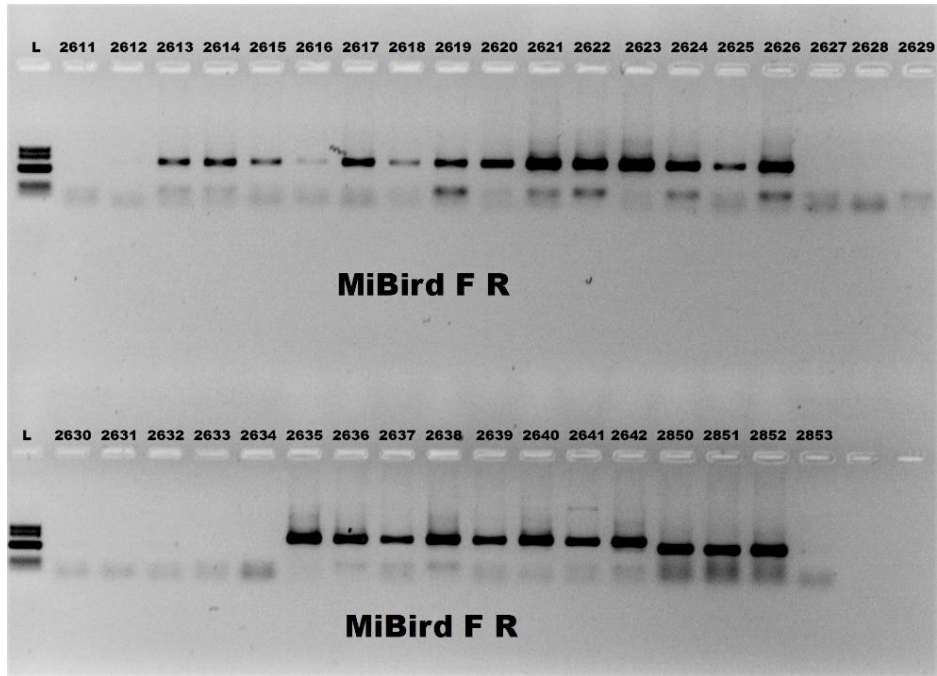
Şekil 4.38 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder



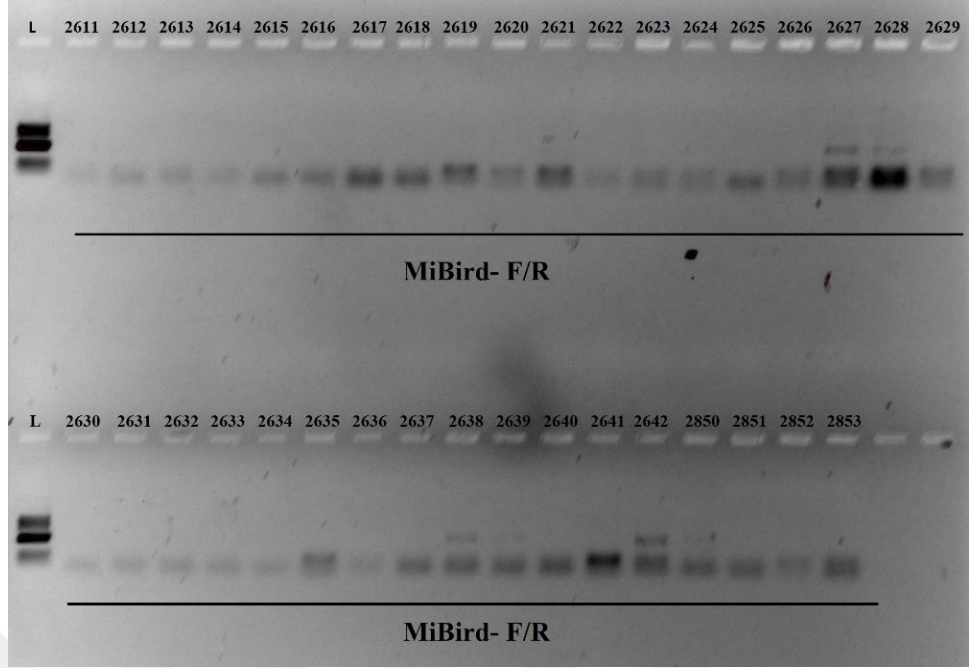
Şekil 4.39 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder



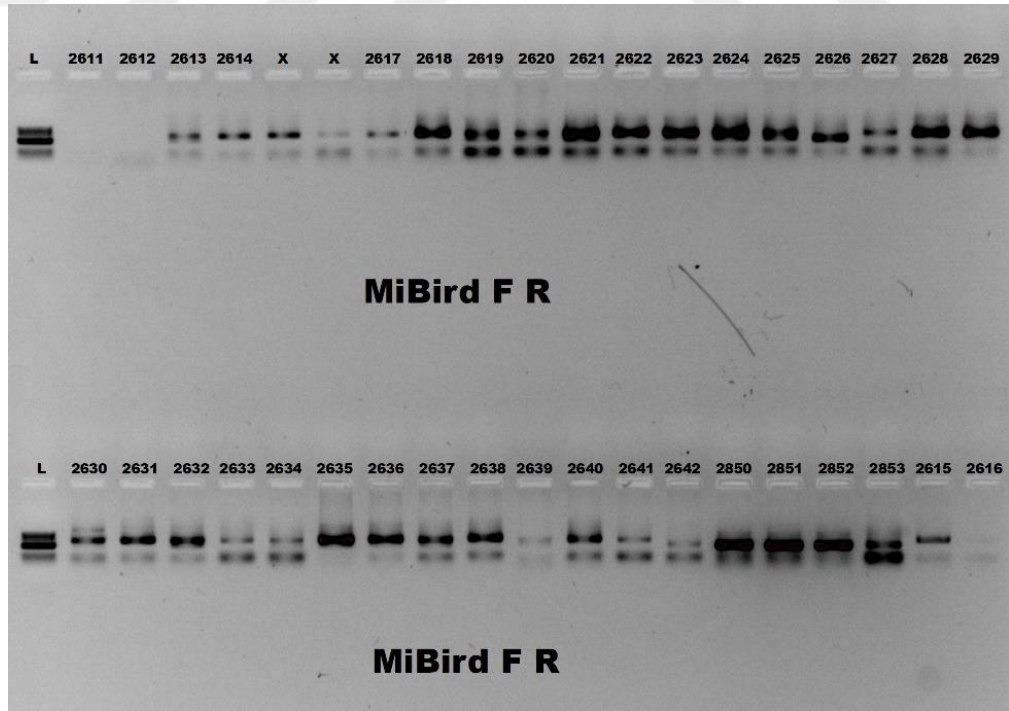
Şekil 4.40 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder



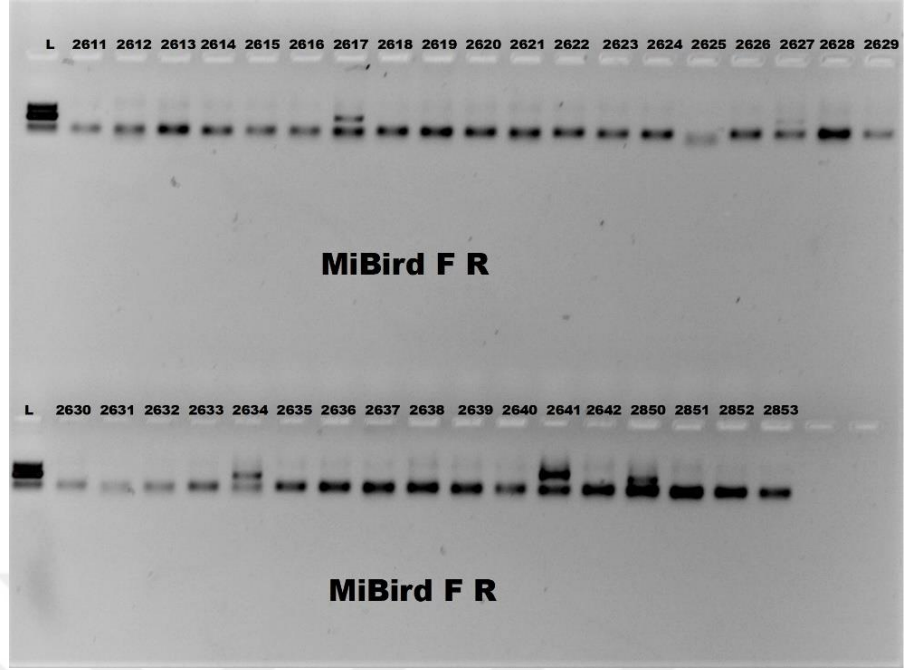
Şekil 4.41 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, 35 Döngü



Şekil 4.42 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, 35 Döngü



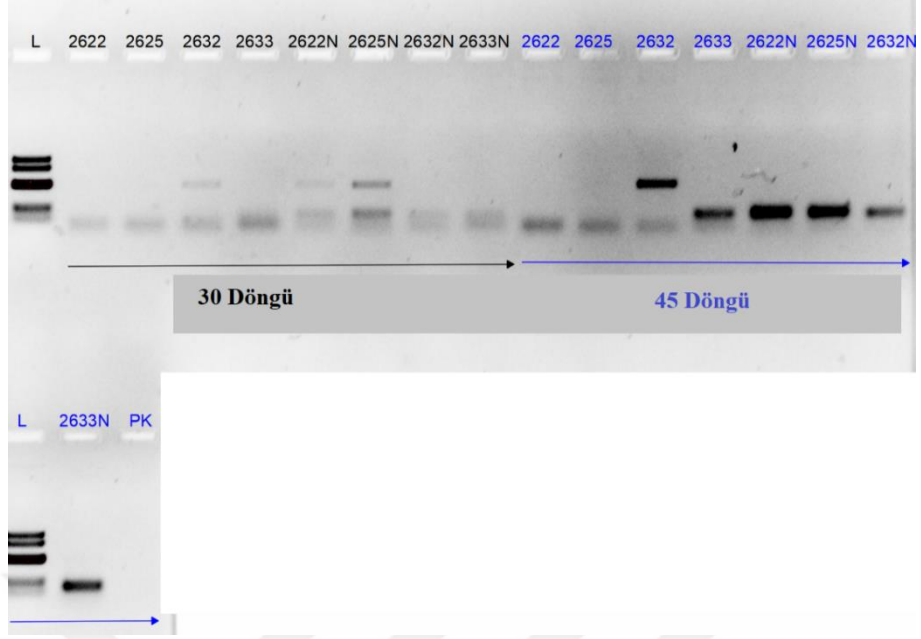
Şekil 4.43 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, 45 Döngü



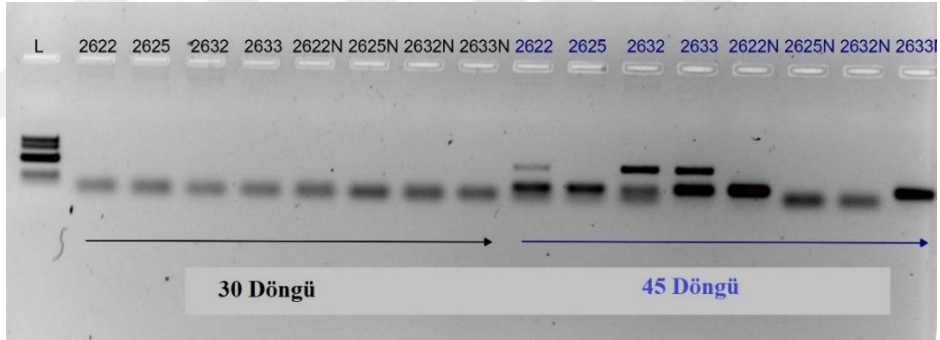
Şekil 4.44 MiBird-U-F/MiBird-U-R, KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, 45 Döngü

Yapılan denemeler sonucunda en iyi optimizasyon sonucu “KAPA HIFI HotStart Ready Mix” ile gerçekleştirildi.

“KAPA HiFi HotStart ReadyMix” stoklarda tükenmesi üzerine rastgele seçilen tez örneklerinin optimizasyonları “Phusion® HOT START Mix” ile gerçekleştirildi. Daha önceki optimizasyonlarda PCR sonuçlarında primer dimeri olmasından dolayı hem primer konsantrasyonu yarıya seyreltilerek (5 μ M) hem de normal (10 μ M) konsantrasyonunda deneme yapıldı (Çizelge 4.18- 4.19). Termal döngü protokolü 45 döngüye ayarlandı. Bağlanma sıcaklığı 64°C.



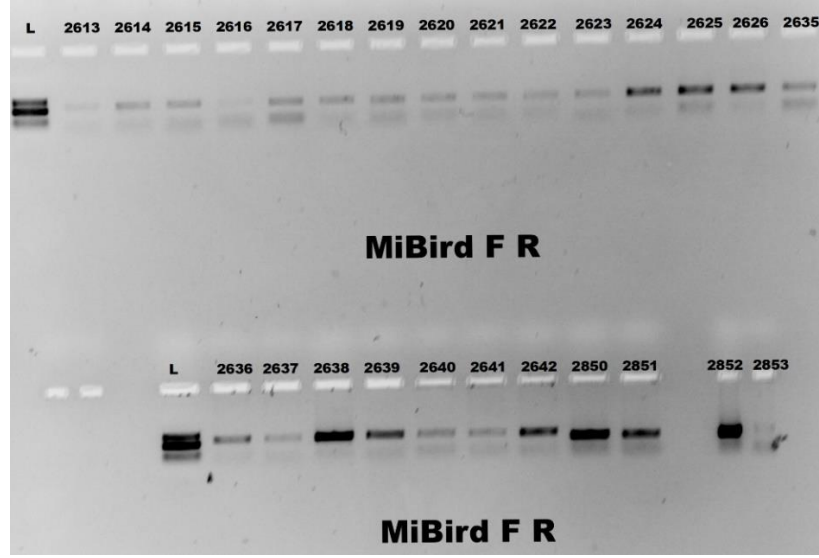
Şekil 4.45 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, 5 uM Primer Konsantrasyonu, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder



Şekil 4.46 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Phusion® Hot Start PCR Mix, 10 uM Primer Konsantrasyonu, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

“Phusion® Hot Start PCR Mix” ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda tekrar primer dimeri elde edildi.

Stokta az miktarda bulunan “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” ile daha önce ön denemesi yapılan ve pozitif sonuç alınan tez örnekleri ile tekrar PCR gerçekleştirildi (Çizelge 4.20-4.21). Termal döngü protokolü 35 döngüye ayarlandı. Bağlanma sıcaklığı 64°C.



Şekil 4.47 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder



Şekil 4.48 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif PCR, L: Ladder

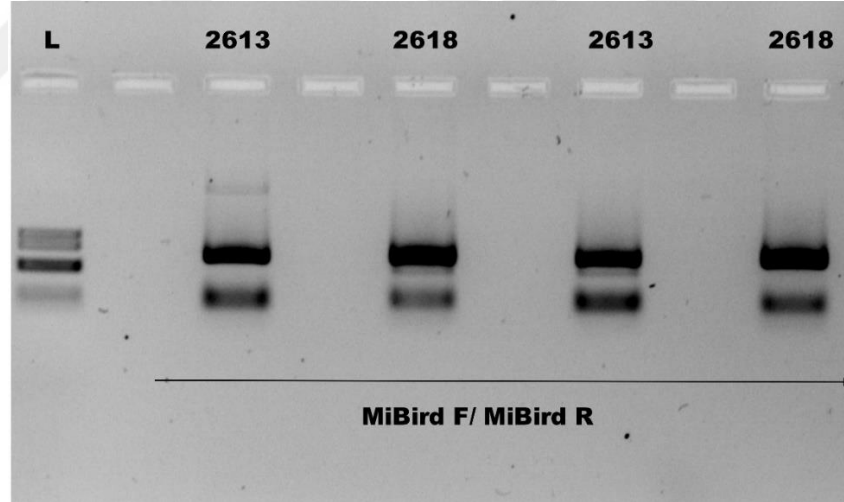
“KAPA HiFi HotStart ReadyMix” stoklarda kalmadığı için reaktif ve reaksiyon protokolü (Çizelge 4.20 ve Çizelge 4.21) “Phusion® Hot Start PCR Mix” ile kullanıldı. Daha önceki optimizasyonlarda primer dimeri sonucu verdiği için jelden saflaştırma yapıldı. 2 örnek kullanılarak deneme gerçekleştirildi. Deneme için normal konsantrasyonda ve 1/2 konsantrasyonda DNA kullanıldı (2613 ve 2618 numaralı örnekler).



Şekil 4.49 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, PCR Negatif, L: Ladder

Sonuçlarda konsantrasyon arasında fark görülmedi.

Jelden ekstraksiyon için örnekler jele tekrar yüklendi (bölüm 3.3.9.1).



Şekil 4.50 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder

Tez örneklerinin “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” harici denenen hiçbir PCR karışımı ile istenilen sonucu vermemesi üzerine farklı bir karışım olan Takara marka “PrimeSTAR® HS (Premix)” ile deneme gerçekleştirildi. Normal ve 1:2 konsantrasyon DNA kullanıldı.

Çizelge 4.22 PrimeSTAR ® HS (Premix), PCR Reaksiyon Protokolü

PrimeSTAR ® HS (Premix)	10 µl
Su	3.8 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.1 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.1 µl
DNA	1 µl
Kapa Mix	5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 4.23 PrimeSTAR ® HS (Premix), Termal Döngü Protokolü

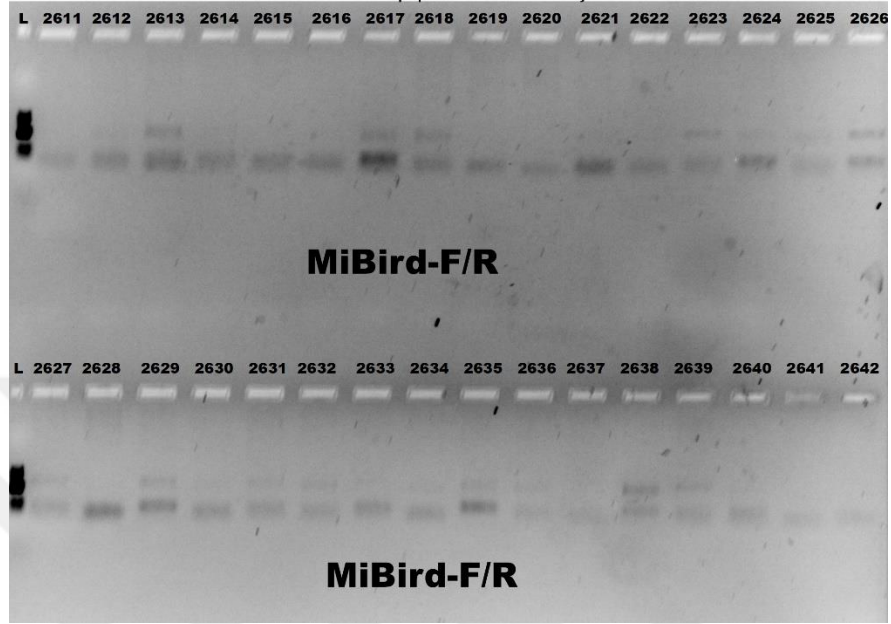
PrimeSTAR ® HS (Premix)			
Ön Denatürasyon	98°C	10 sn.	40 Döngü
Denatürasyon	98°C	10 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	64°C	5 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	5 sn.	
	4°C	∞	



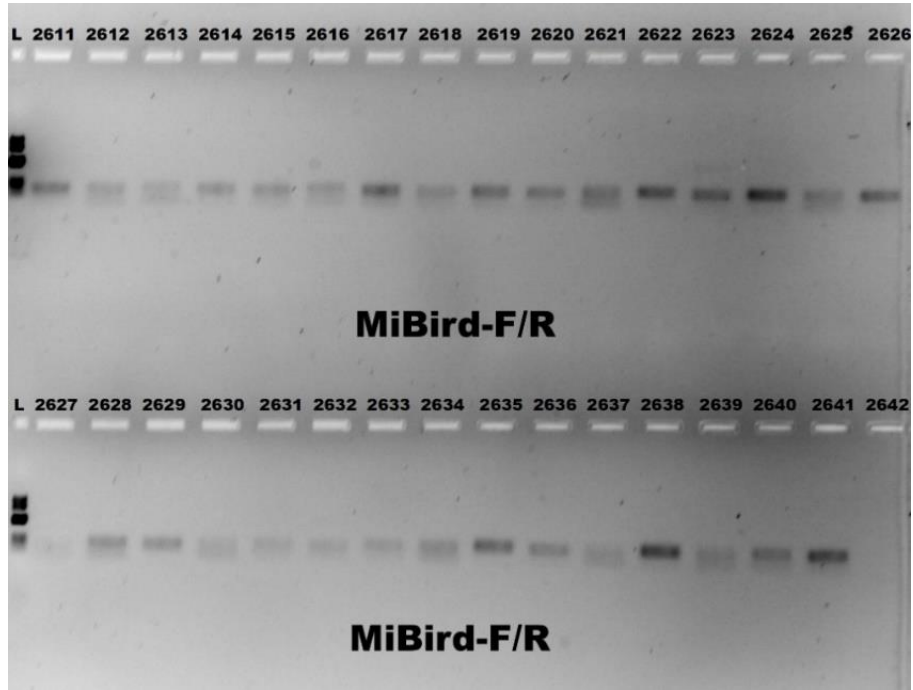
Şekil 4.51 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. Negatif PCR, L: Ladder

Jelden kesim protokolü ile istenilen sonuçlar elde edildi.

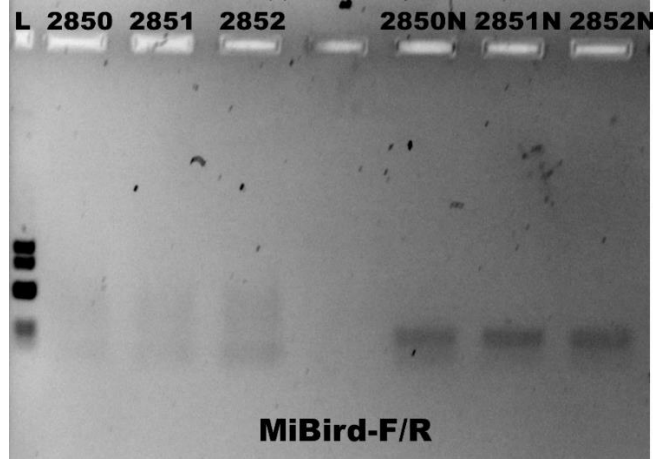
Takara marka “PrimeSTAR ® HS (Premix)” ile sonuç elde edilemedi. “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” reaktif ve reaksiyon protokolü ile “PrimeSTAR ® HS (Premix)” tekrar edildi (Çizelge 4.20- 4.21).



Şekil 4.52 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder



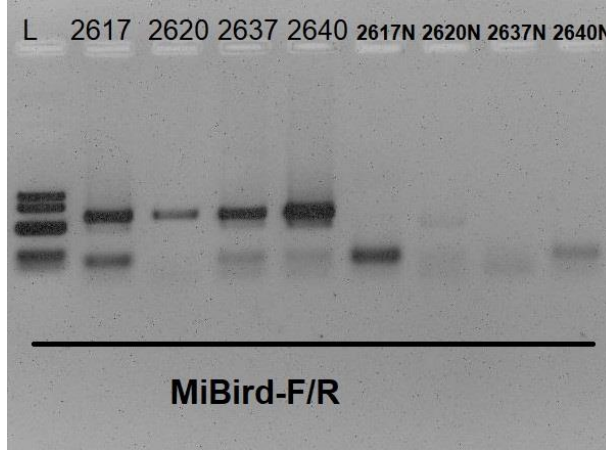
Şekil 4.53 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder



Şekil 4.54 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder

Takara marka PCR karışımı ile sonuç elde edilemedi.

Stoklara tekrar alınan “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” ile 2617, 2620, 2637, 2640 numaralı örneklerin PCR’ı kuruldu. Daha önce güçlü bant verip daha sonraki denemelerde (şekil 4.47) silik bant veren bu örneklerin rastgele seçilerek PCR’ları tekrar edildi. Çizelge 4.20- 4.21 ‘de verilen protokole göre PCR’ları gerçekleştirildi.



Şekil 4.55 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder

“KAPA HiFi HotStart ReadyMix” ile 2617, 2620, 2637, 2640 numaralı örneklerin sonuçlarının istenildiği gibi çıkmasından dolayı tüm örneklerin PCR’ı her örnekten çift reaksiyon kurularak tekrar edildi. 15 µl’lik reaksiyon hazırlandı (Çizelge 4.24- 4.25).

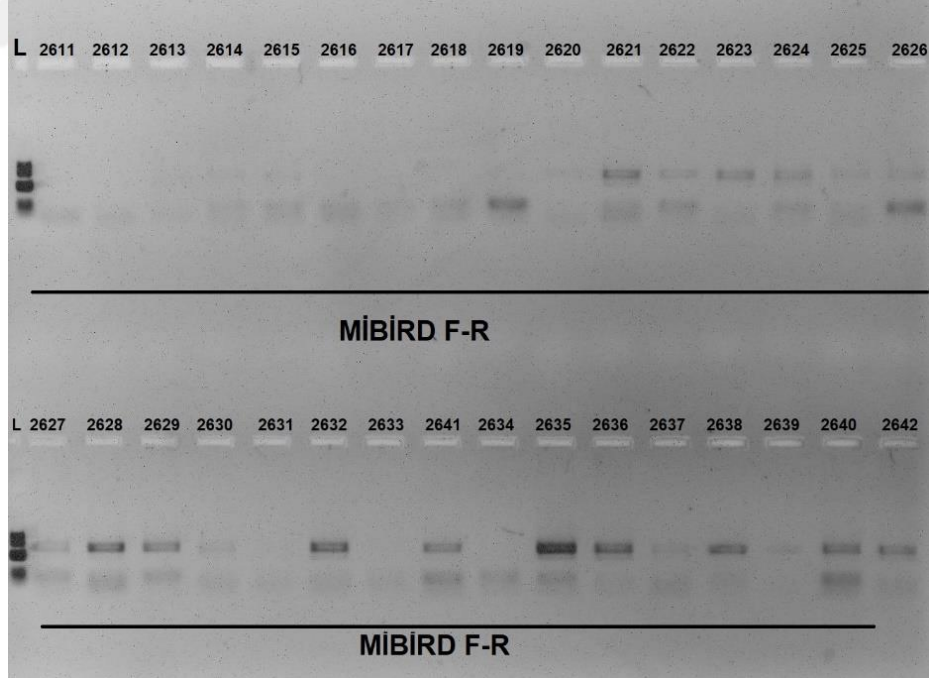
Pozitif sonuç alınan tez örnekleri ile tekrar PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 4.24 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR Reaksiyon Protokolü

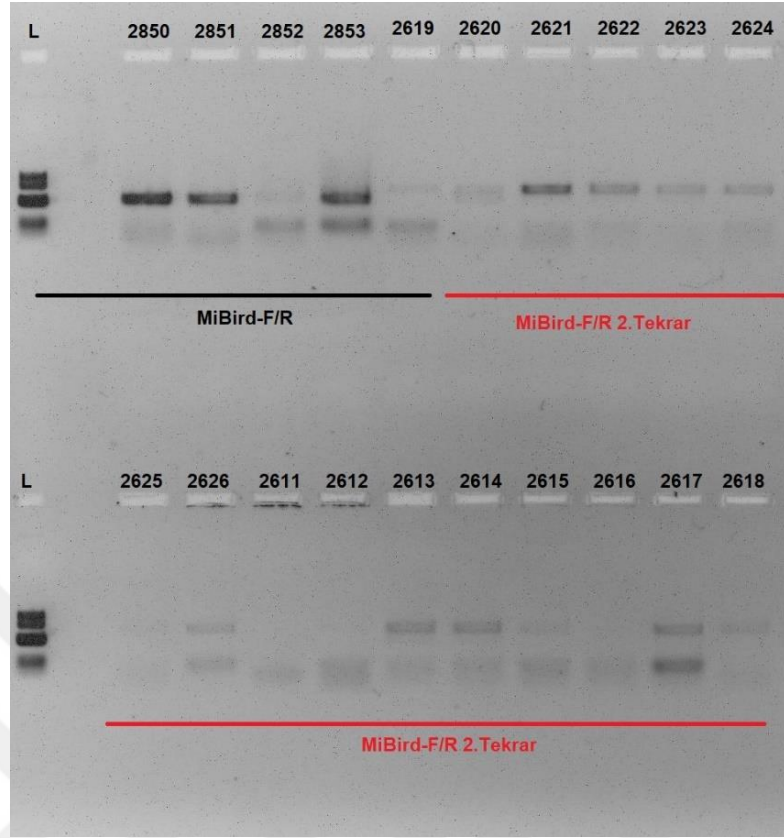
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR	15 µl
Su	5.1 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.45 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.45 µl
DNA	1 µl
Kapa Mix	7.5 µl
Toplam	15 µl

Çizelge 4.25 KAPA HiFi HotStart Ready Mix, Termal Döngü Protokolü

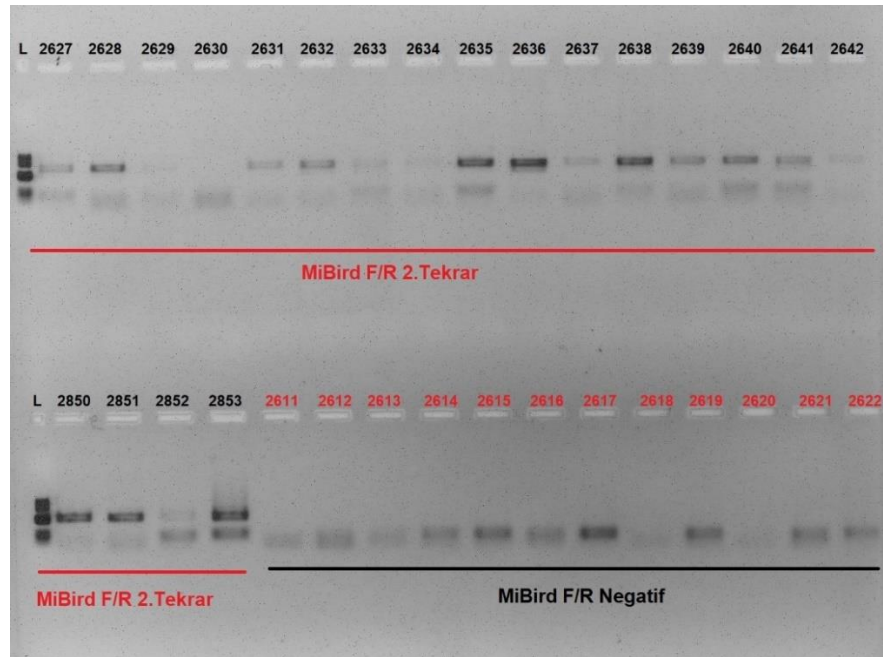
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR			
Ön Denatürasyon	98°C	3 dk.	35 Döngü
Denatürasyon	98°C	20 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	64°C	15 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	15 sn.	
Son Sentez	72°C	1 dk.	
	4°C	∞	



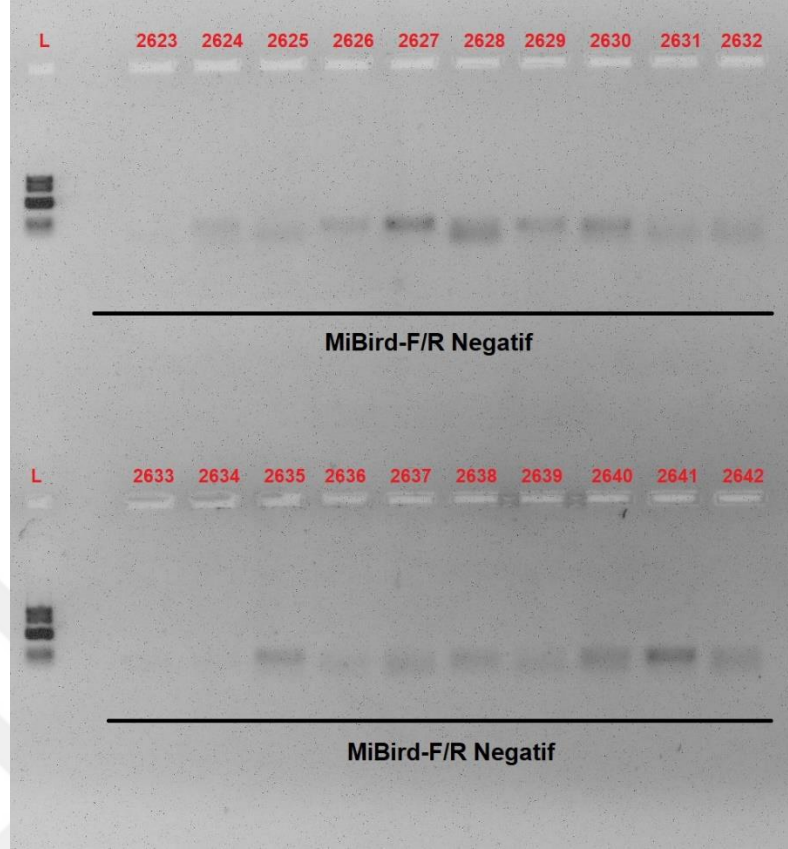
Şekil 4.56 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü. N: Negatif Kontrol, L: Ladder



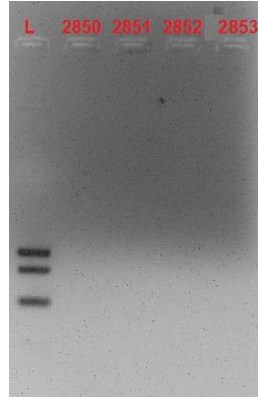
Şekil 4.57 MiBird-U-F/MiBird-U-R, 1. ve 2. Tekrar PCR, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder



Şekil 4.58 MiBird-U-F/MiBird-U-R, 2. Tekrar PCR ve Negatif Reaksiyon PCR Jel Görüntüsü. L: Ladder



Şekil 4.59 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder

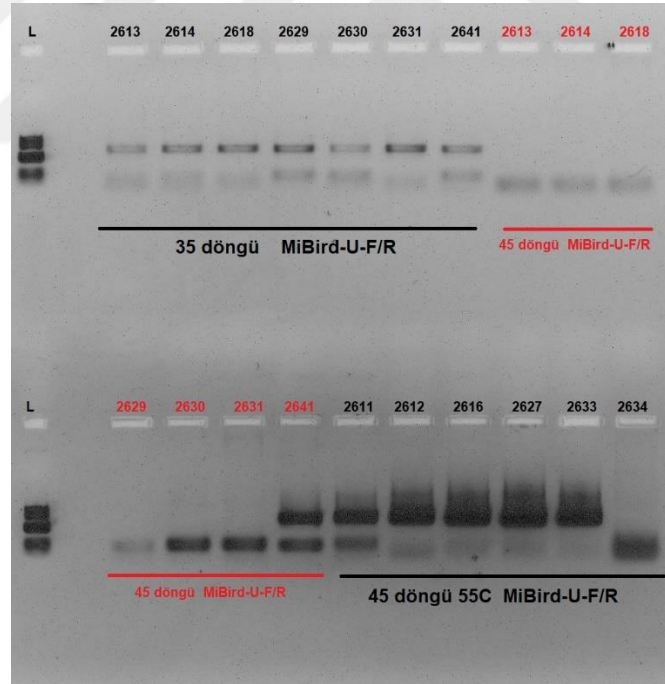


Şekil 4.60 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Negatif Reaksiyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder

Yapılan tüm denemeler sonunda aşağıda verilen Çizelge 4.26’da optimizasyonları çıkmayan ve eksik olan örnekler için tekrarlandı. PCR reaksiyonları Çizelge 4.24- 4.25’e göre gerçekleştirildi

Çizelge 4.26 PCR Optimizasyon Çizelgesi

Örnek No	Gerçekleştirilecek PCR Protokolü
2611	54°C ve 45 DÖNGÜ
2612	54°C ve 45 DÖNGÜ
2613	35 ve 45 DÖNGÜ
2614	35 ve 45 DÖNGÜ
2616	54°C ve 45 DÖNGÜ
2618	35 ve 45 DÖNGÜ
2627	54°C ve 45 DÖNGÜ
2629	35 ve 45 DÖNGÜ
2630	35 ve 45 DÖNGÜ
2631	35 ve 45 DÖNGÜ
2633	54°C ve 45 DÖNGÜ
2634	54°C ve 45 DÖNGÜ
2641	35 ve 45 DÖNGÜ



Şekil 4.61 MiBird-U-F/MiBird-U-R, PCR Jel Görüntüsü, N: Negatif Kontrol, L: Ladder

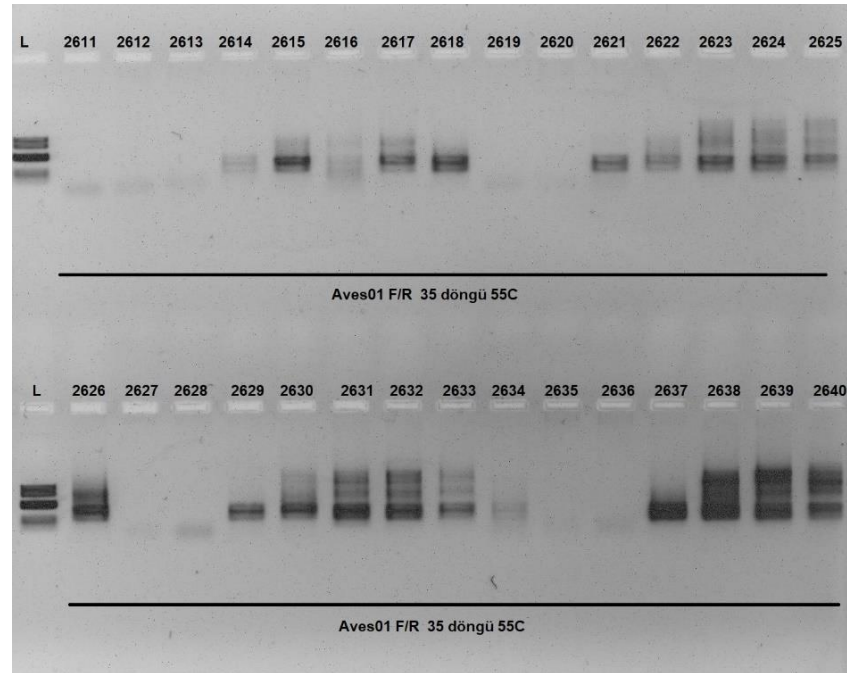
2611, 2612, 2616, 2627(2 tekrar), 2633, 2634 numaralı örneklerin PCR'ı Çizelge 4.24-4.25 'e göre tekrar edildi. 2621 ve 2651 numaralı örneklerin “ExoSap” pürifikasyonu

(bölüm 3.3.7.1) denendi. 2624 ve 2651 numaralı örneklerin “PCR Clean-up” (bölüm 3.3.9.4) pürifikasyonu denendi.

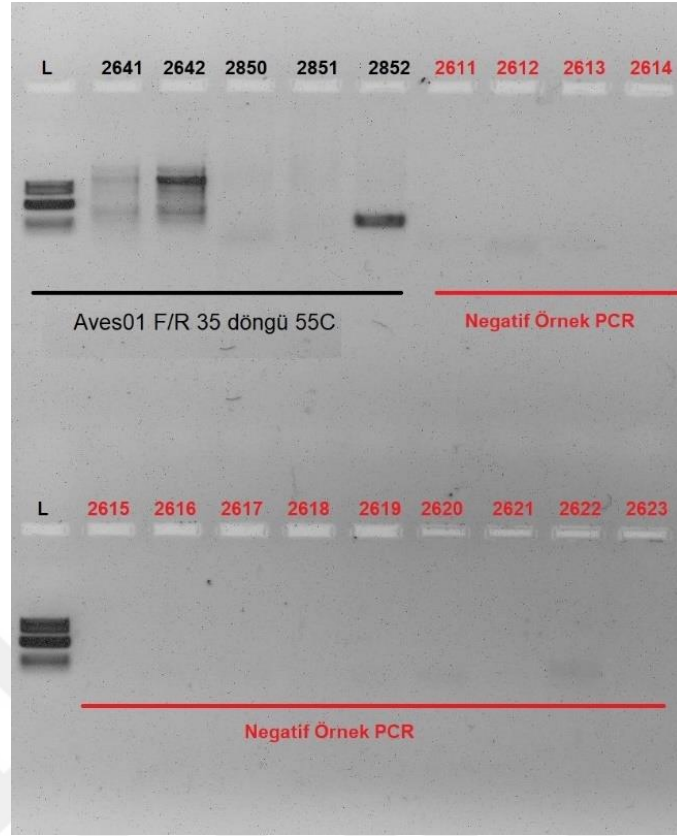


Şekil 4.62 MiBird-U-F/MiBird-U-F, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder

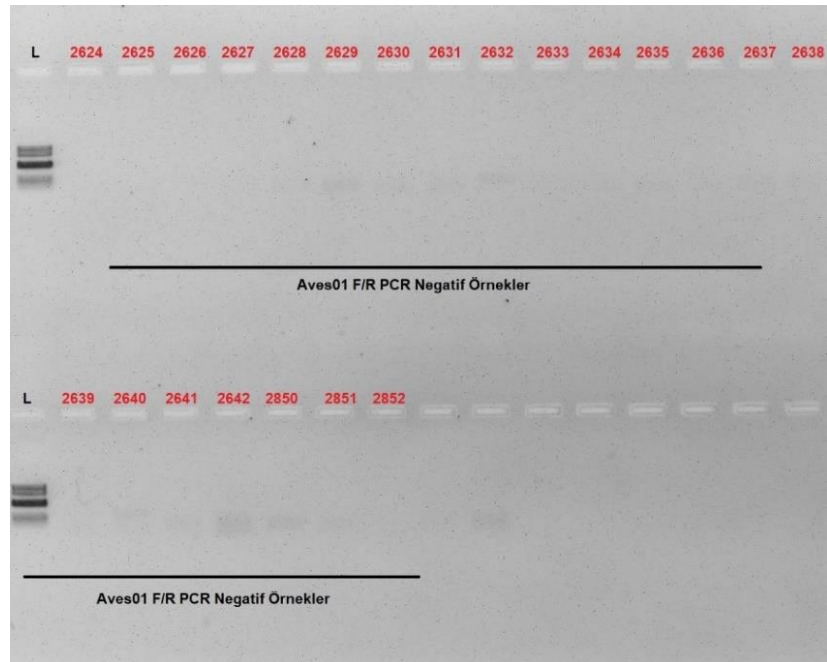
MiBird-U-F/MiBird-U-F primer çiftleri ile gerçekleştirilen optimizasyonlar ile tüm örnekler ile sonuçlar elde edildi. AVES01-F/ AVES01-R primer çifti kullanılarak “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” ile PCR optimizasyonları gerçekleştirildi (Çizelge 4.24- 4.25). Bağlanma sıcaklığı 54 °C.



Şekil 4.63 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder



Şekil 4.64 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif Reaksiyon, L: Ladder

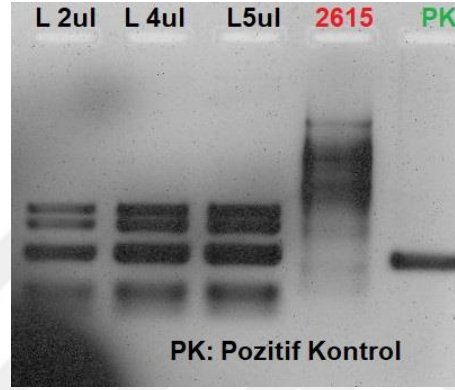


Şekil 4.65 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü, Negatif Reaksiyon, L: Ladder

Gerçekleştirilen optimizasyonlardan sonra PCR sonuçlarında anspesifik bağlanma sonuçları elde edilmesinden dolayı bu primer çifti ile optimizasyonlar daha sonra gerçekleştirildi.

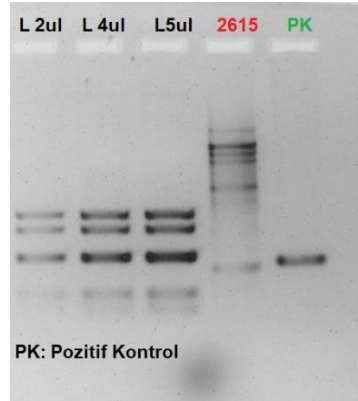
AVES0-F/AVES01-R primer çiftleri ile doğru uzunlukta çoğalan ürünü elde etmek için jelden kesim gerçekleştirildi. Ladder'ın iyi açılması için elektroforez aşamasında bazı optimizasyonlar uygulandı.

50V, 300 akım, 85 dakika yürütüldü;



Şekil 4.66 Jel Görüntüsü, P: Pozitif Kontrol, L: Ladder

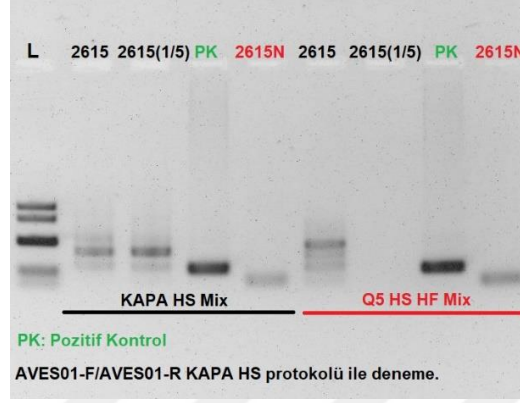
80V, 300 akım, 65 dakika yürütüldü;



Şekil 4.67 Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder

Tez örneklerinde tagli AVES01-F/AVES01-R primer çiftleri ile optimizasyon aşamasına geçildi. Primerler istenilen uzunluktan (100-110 baz çiftlik bölge) farklı bölgeleri de çoğalttığı için hem “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” hem de “Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix” PCR karışımları kullanılarak hem de bir pozitif kontrollü (kuş

doku DNA izolatı) PCR gerçekleştirildi. PCR’da “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” protokolü (Çizelge 4.24- 4.25) her iki mix içinde kullanıldı. Jelden kesim öncesi hangi bölgenin kesilmesi gerektiği kontrol edildi. 2615 numaralı örnek optimizasyon için kullanıldı. Bağlanma sıcaklığı 54 °C. Termal döngü protokolü 45 döngüye ayarlandı.



Şekil 4.68 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

İstenilen uzunlukta bant elde edilememesi üzerine mix protokollerine ön denatürasyon basamağına 15 dakika eklenerek PCR karışımlarının kendi protokolleri kullanıldı (Çizelge 4.27- 4.28- 4.29- 4.30).

Çizelge 4.27 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, PCR PCR Reaksiyon Protokolü

KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR	10 µl
Su	3.4 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.3 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.3 µl
DNA	1 µl
Kapa Mix	5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 4.28 KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Termal Döngü Protokolü

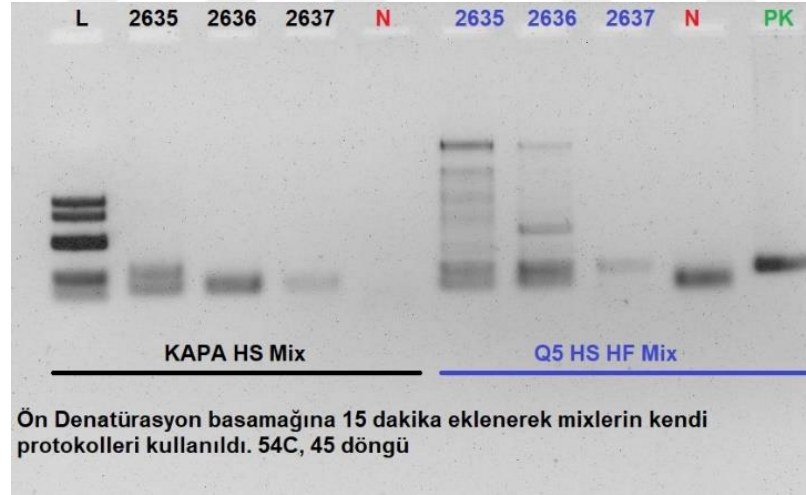
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR			
Ön Denatürasyon	98°C	15 dk.	45 Döngü
Denatürasyon	98°C	20 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	54°C	15 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	15 sn.	
Son Sentez	72°C	1 dk.	
	4°C	∞	

Çizelge 4.29 Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, PCR Reaksiyon Protokolü

Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	10 µl
Su	3 µl
10 uM İleri Yön Pimer	0.5 µl
10 uM Geri Yön Pimer	0.5 µl
DNA	1 µl
Kapa Mix	5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 4.30 Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, Termal Döngü Protokolü

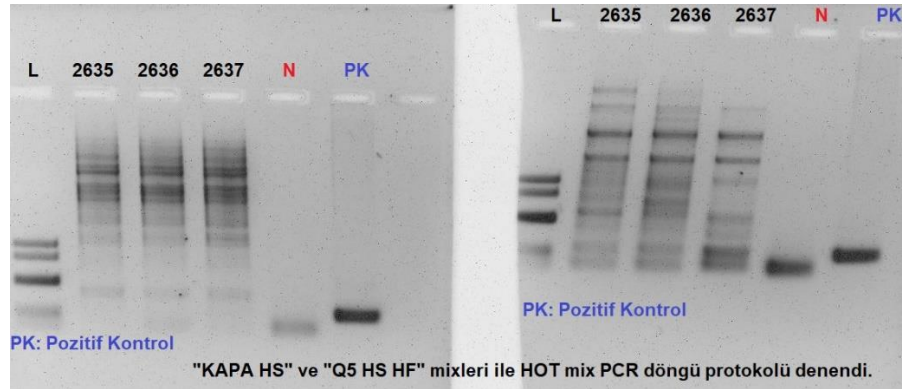
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix			
Ön Denatürasyon	98°C	15 dk.	
Denatürasyon	98°C	5 sn.	45 Döngü
Bağlanma Sıcaklığı	54°C	10 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	20 sn.	
Son Sentez	72°C	2 dk.	
	4°C	∞	



Şekil 4.69 AVES01-F/AVES01-R, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

Ön denatürasyon aşamasına 15 dakika eklenmesi ile örneklerden istenilen uzunlukta ürün elde edilemedi. “5x Hot Firepol Blend Master Mix” termal döngü protokolü (Çizelge 4.4-4.5) kullanılarak “KAPA HiFi HotStart ReadyMix” ve “Q5® Hot Start High-Fidelity 2X

Master Mix” termal döngü protokolleri değiştirilerek deneme yapıldı. Reaksiyon protokolleri değiştirilmedi (Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.29).



Şekil 4.70 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

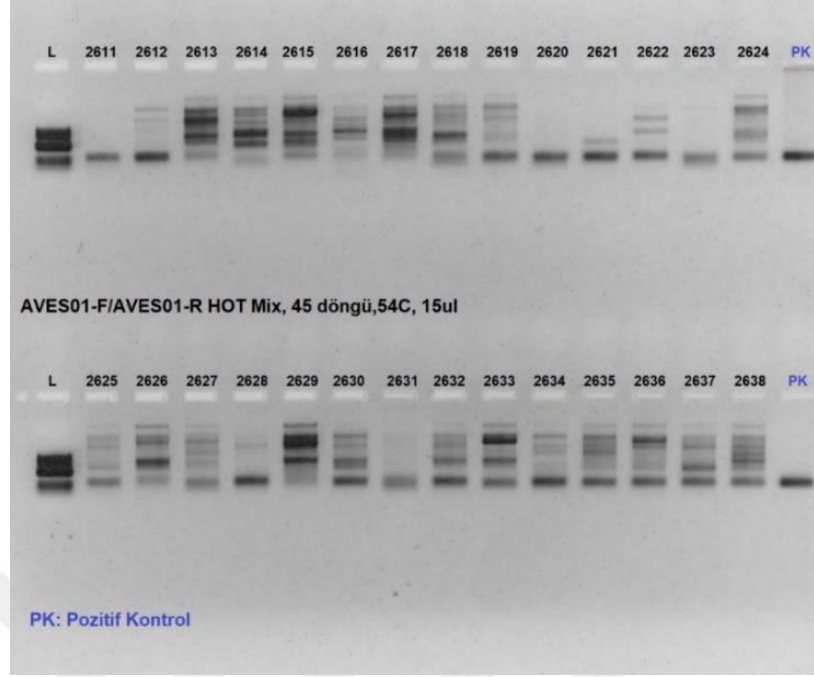
Yapılan optimizasyon denemeleri sonucunda sonuç elde edilemedi. “5x Hot Firepol Blend Master Mix” ile optimizasyonları gerçekleştirildi. 54°C ve 62°C bağlanma sıcaklıklarında optimizasyonları denendi. Reaksiyon 15 µl kuruldu.

Çizelge 4.31 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg) PCR Reaksiyon Protokolü

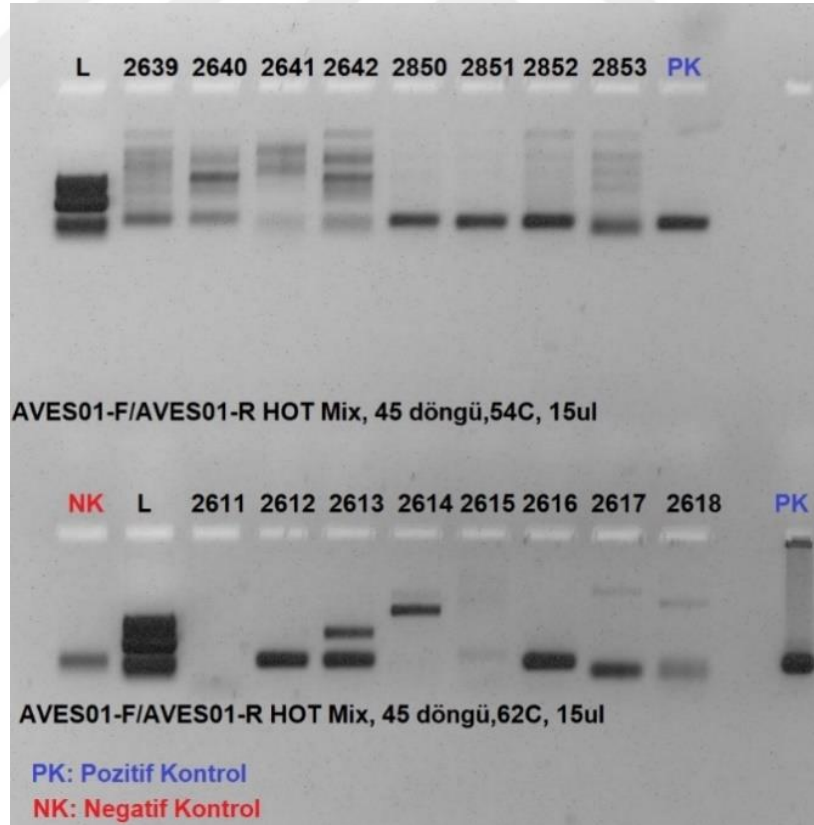
5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)	1X
Karışım	3 µl
İleri Yön	0.25 µl
Geri Yön	0.25 µl
Su	10.5 µl
DNA	1 µl
TOPLAM	15 µl

Çizelge 4.32 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg) Termal Döngü Protokolü

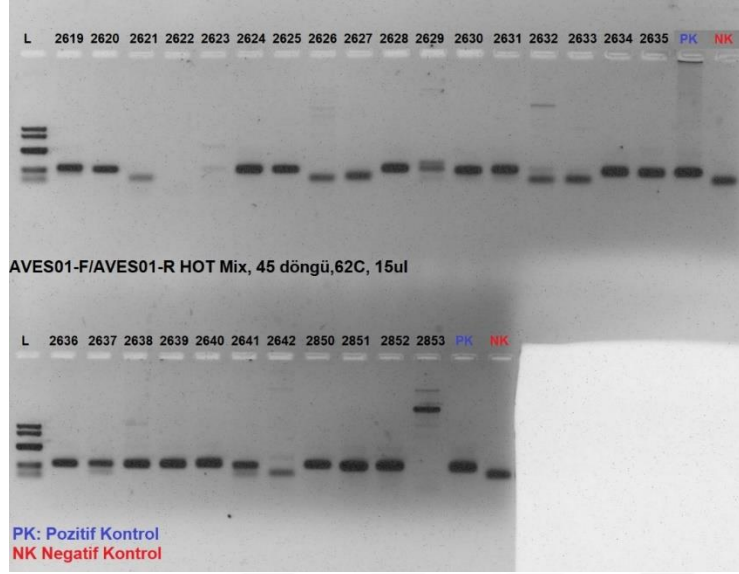
5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)- PCR Döngü Protokolü			
Ön Denatürasyon	95°C	15 dk.	45 Döngü
Denatürasyon	95°C	15 sn.	
Bağlanma Sıcaklığı	54°C	45 sn.	
Zincir Sentezi	72°C	2 dk.	
Son Sentez	72°C	10 dk.	
	4°C	∞	



Şekil 4.71 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder



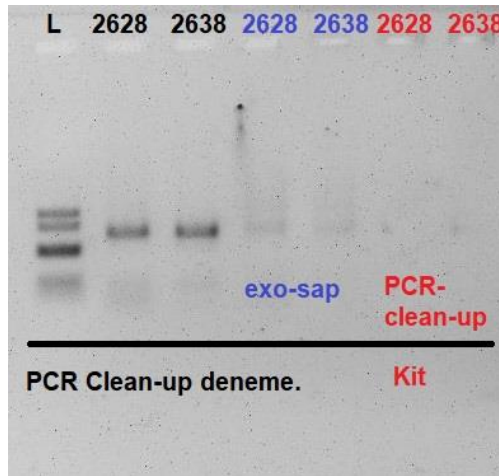
Şekil 4.72 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder



Şekil 4.73 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder

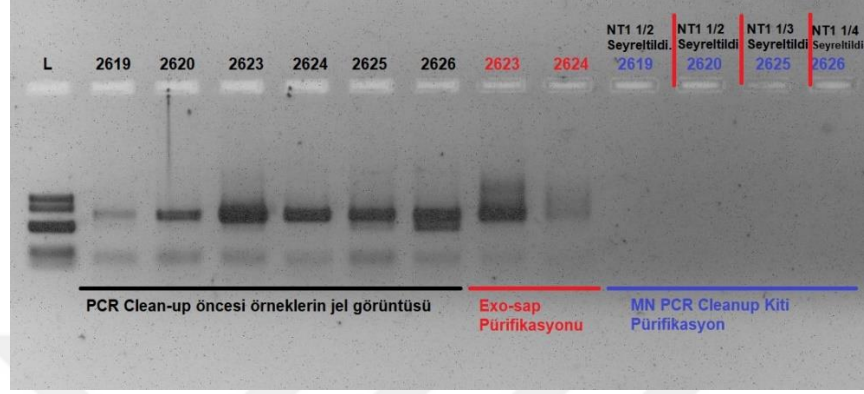
MiBird-U-F/MiBird-U-F Tagli primer çiftleri ile PCR pürifikasyon optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon için 2628 numaralı örnek kullanıldı ve daha sonra jele yüklenerek görüntülendi.

Pürifikasyon için ExoSAP-IT™ ticari reaktifi kullanılmıştır (bölüm 3.3.7.1 Saflaştırma (Pürifikasyon)). PCR saflaştırma protokolü MN marka “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kiti protokolüne göre optimize edilip gerçekleştirilmiştir (bölüm 3.3.9 PCR Ürünü Pürifikasyonu).



Şekil 4.74 Jel Görüntüsü, Pürifikasyondan Önce, Exosap ve PCR-Clean-Up Kiti

Gerçekleştirilen pürifikasyon sonrası PCR ürünleri (bandları) kaybedildi. Bunun üzerine farklı optimizasyon denemeleri yapıldı. PCR saflaştırma protokolü MN marka “NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up” kitinin NT1 solüsyonu 1:2, 1:3 ve 1:4 oranlarında seyreltildi (bölüm 3.3.9 PCR Ürünü Pürifikasyonu).



Şekil 4.75 Jel Görüntüsü, Pürifikasyondan Önce, Exosap ve PCR Temizleme Kiti

MiBird-U-F/MiBird-U-R tagli primer çiftleri ile daha önce bütün optimizasyonları gerçekleştirilen ve NGS’e hazır olan örneklerin konsantrasyonları yetersiz olduğu için tekrar edildi (Çizelge 4.24- 4.25). Termal döngü protokolü 40 döngüye ayarlandı.

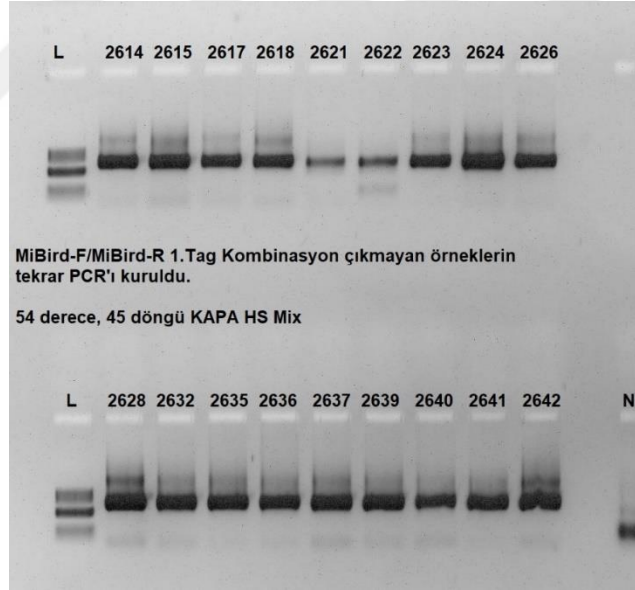


Şekil 4.76 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, Jel Görüntüsü, L: Ladder



Şekil 4.77 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü,
N: Negatif Kontrol, L: Ladder

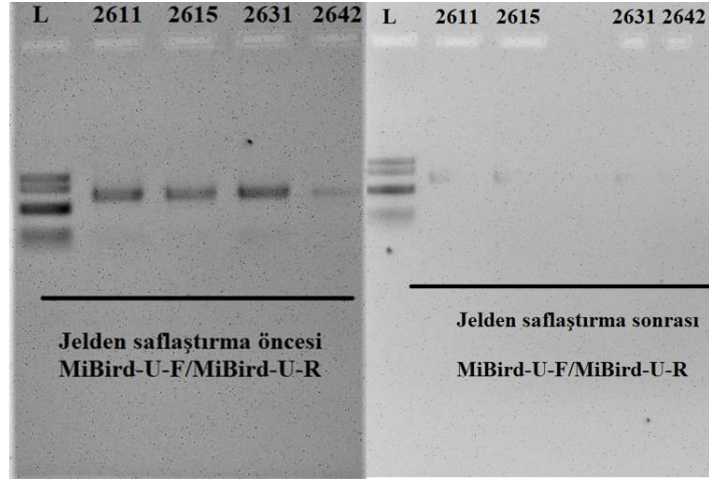
Gerçekleştirilen PCR sonucunda sonuç alınamayan örneklerin PCR'ı Çizelge 4.24-4.25'de verilen protokoller kullanılarak gerçekleştirildi. Döngü sayısı 45 ve bağlanma sıcaklığı 54°C olacak şekilde protokol optimize edildi.



Şekil 4.78 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü,
L: Ladder, N: Negatif Kontrol

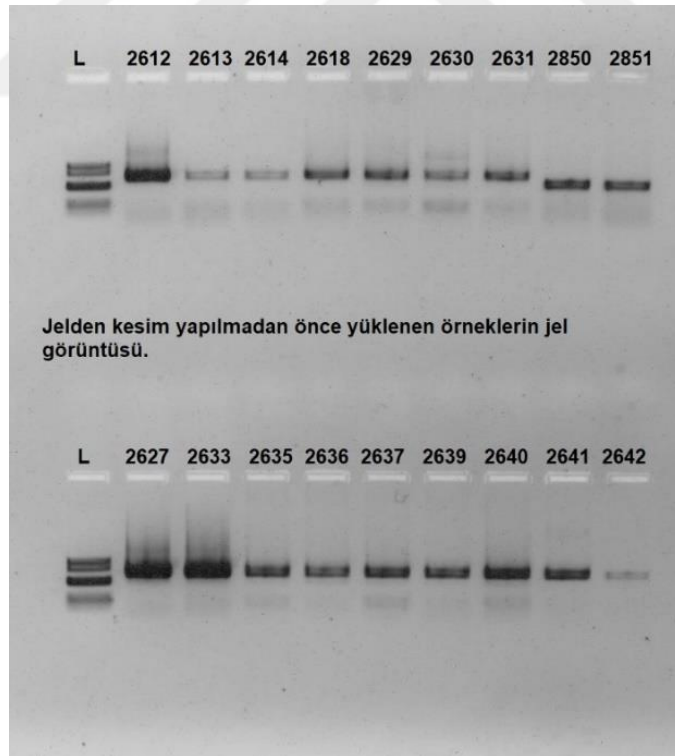
Gerçekleştirilen PCR sonucunda bütün örneklerden sonuç elde edildi.

MiBird-U-F/MiBird-U-R primer çiftinde optimizasyonu gerçekleştirilen tez örneklerinin PCR saflaştırması için jelden ekstraksiyonu gerçekleştirildi (bölüm 3.3.10.3 ve 3.3.10.4).

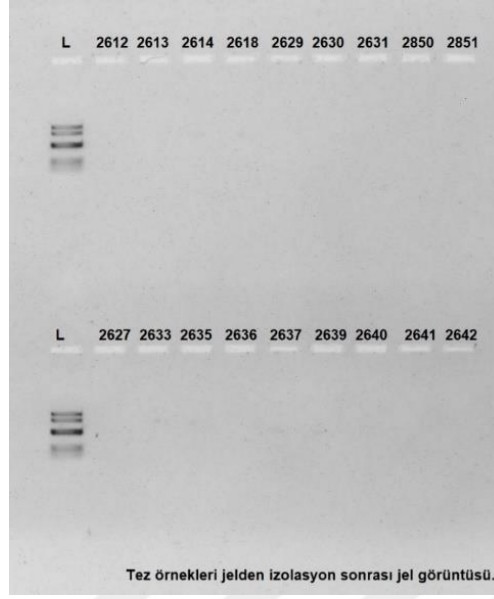


Şekil 4.79 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

Gerçekleştirilen saflaştırma sonrasında PCR ürünleri kaybedildi. Daha önce UV ışık altında kesim yapılarak istenilen sonuç elde edilen örneklerin. EtBr'li jel ve UV ışık altında denemesi yapıldı (bölüm 3.3.9.1).



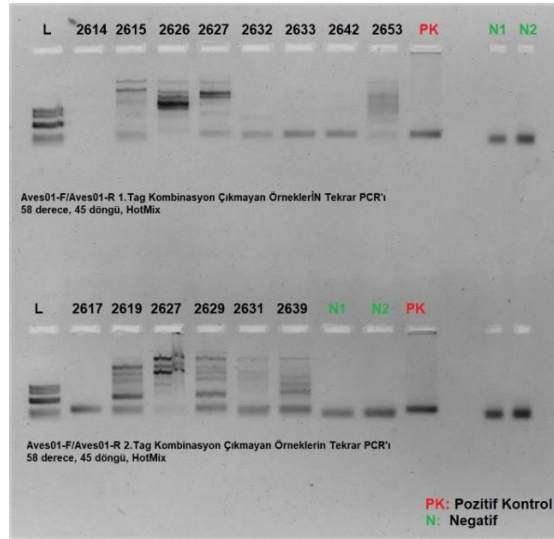
Şekil 4.80 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, Jelden Kesim Yapılmadan Önce



Şekil 4.81 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, Jelden Kesim Yapıldıktan Sonra

Hem mavi ışık altında hem de UV ışık altında PCR ürünleri saflaştırma aşamasında kaybedildi.

“5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg)” kullanılarak AVES01-F/AVES01-R primer çiftiyle gerçekleştirilen Tag Kombinasyon PCR’ları için çıkmayan örneklerin PCR’ı iki tekerrürlü tekrar edildi (Çizelge 4.31- 4.32).



Şekil 4.82 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

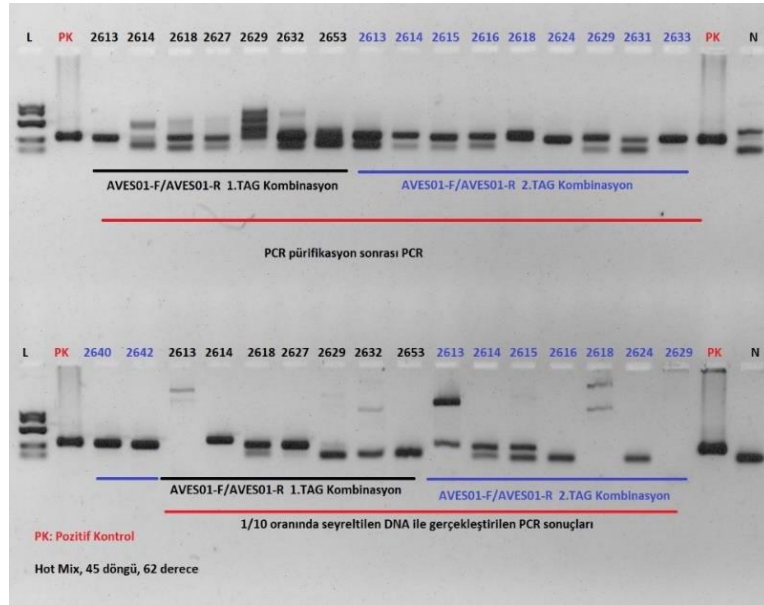
AVES01-F/AVES01-R primer çiftlerinin tez örnekleri PCR sonucunda anspesifik bağlanma vermesi üzerine sonuç alınamayan örneklerde optimizasyonlar gerçekleştirildi.

AVES01-F/AVES01-R 1. Tekrar Tag Kombinasyon: 2613, 2614, 2618, 2627, 2629, 2632, 2853 numaralı örnekler şekil 2.78-79-80-90'da verilen PCR jel görüntülerine göre jelden kesim yapılarak elde edilen izolattan tekrar PCR gerçekleştirildi.

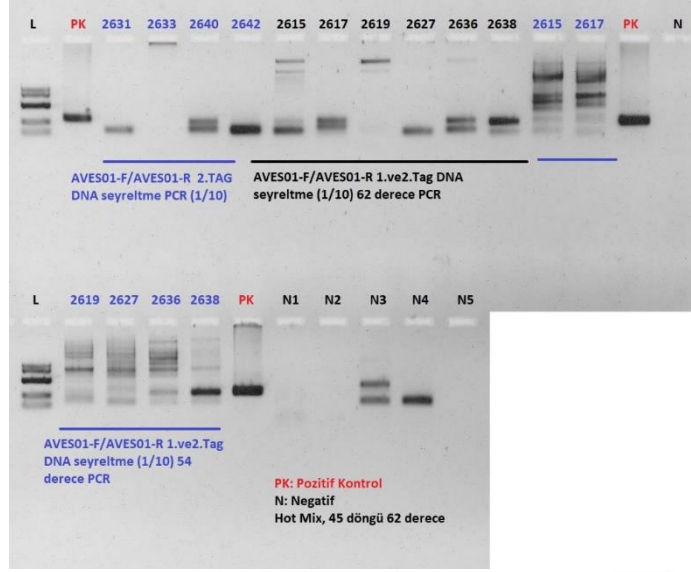
AVES01-F/AVES01-R 1. Tekrar Tag Kombinasyon: 2613, 2614, 2618, 2627, 2629, 2632, 2853 numaralı örneklerin DNA izolatu 1:10 oranında seyreltilerek PCR'ı gerçekleştirildi.

AVES01-F/AVES01-R 2. Tekrar Tag Kombinasyon: 2613, 2614, 2615, 2616, 2618, 2624, 2629, 2631, 2633, 2640, 2642 numaralı örnekler şekil 2.83-84-90'da verilen PCR jel görüntülerine göre jelden kesim yapılarak elde edilen izolattan tekrar PCR gerçekleştirildi.

AVES01-F/AVES01-R 2. Tekrar Tag Kombinasyon: 2613, 2614, 2615, 2616, 2618, 2624, 2629, 2631, 2633, 2640, 2642 numaralı örneklerin DNA izolatu 1:10 oranında seyreltilerek PCR'ı gerçekleştirildi (Çizelge 4.31- 4.32).



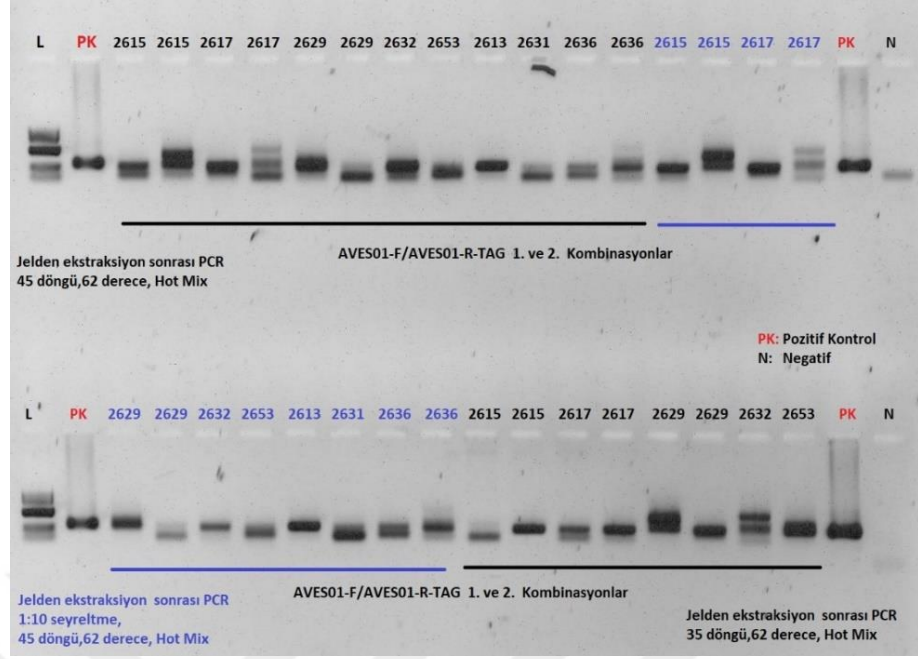
Şekil 4.83 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol



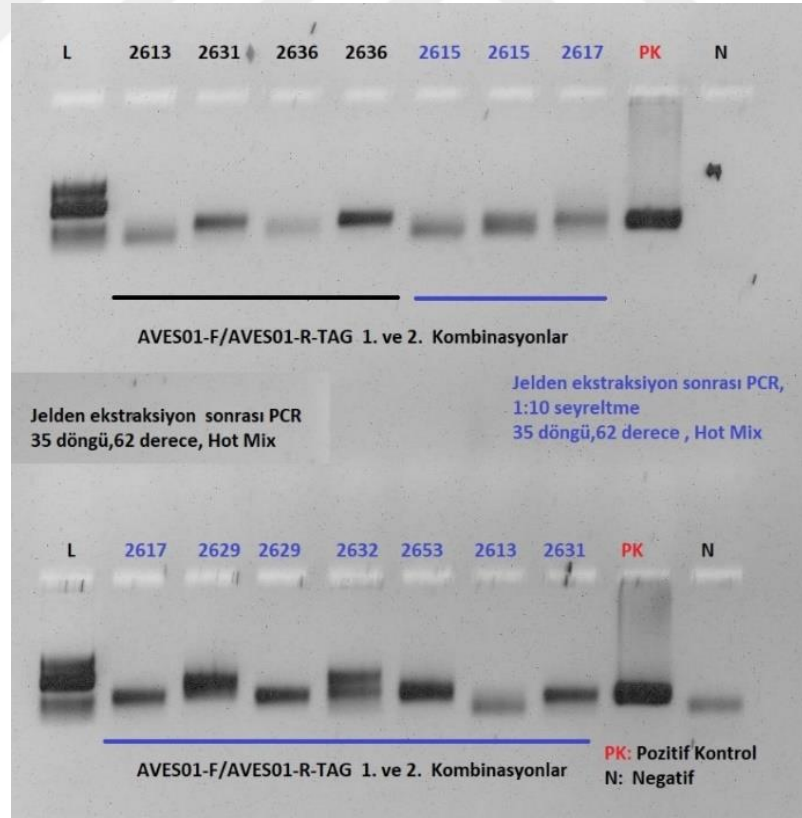
Şekil 4.84 AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

AVES01-F/AVES01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon: 2615, 2617, 2629, 2632, 2853 (1. tekrar tag örnekler), 2613, 2631, 2636 (2. tekrar tag örnekler) numaralı örnekler şekil 4.86- 4 87-4.88- 4.91- 4.92’de verilen PCR jel görüntülerine göre jelden kesim yapılarak elde edilen izolattan tekrar PCR gerçekleştirildi. 45 döngü ve 62°C’de optimizasyon gerçekleştirildi. 35 döngü ve 62°C’de optimizasyon gerçekleştirildi. 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg) kullanıldı (Çizelge 4.31- 4.32).

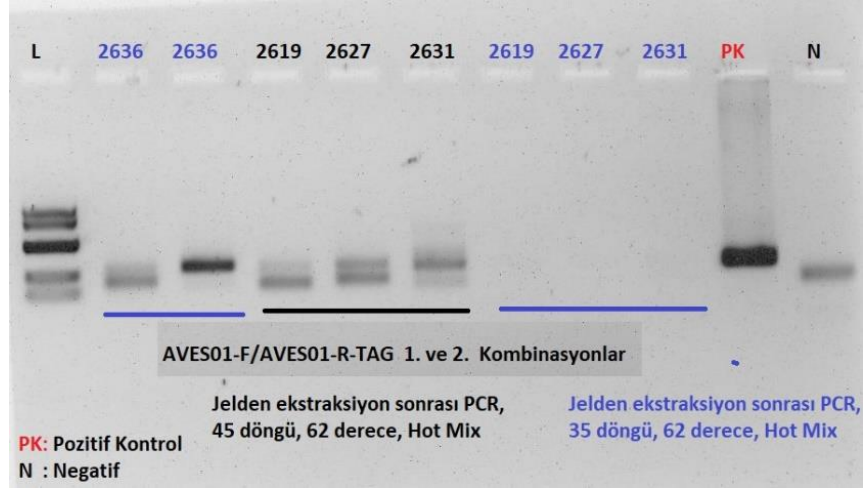
AVES01-F/AVES01-R 1. Tekrar Tag Kombinasyon: 2615, 2617, 2629, 2632, 2853 (1. tekrar tag örnekleri), 2613, 2631, 2636 (2. tekrar tag örnekleri) numaralı örnekler şekil 2.78-79-80-90’da verilen PCR jel görüntülerine göre jelden kesim yapılarak elde edilen izolattan tekrar PCR gerçekleştirildi. PCR 1:10 oranında seyreltildi. 45 döngü ve 62°C’de optimizasyon gerçekleştirildi. 35 döngü ve 62°C’de optimizasyon gerçekleştirildi. 5x Hot Firepol Blend Master Mix (12.5 Mg) kullanıldı (Çizelge 4.31- 4.32).



Şekil 4.85 AVE01-F/AVE01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol



Şekil 4.86 AVE01-F/AVE01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol



Şekil 4.87 AVE01-F/AVE01-R 1. ve 2. Tekrar Tag Kombinasyon, PCR Jel Görüntüsü, PK: Pozitif Kontrol, L: Ladder, N: Negatif Kontrol

Gerçekleştirilen optimizasyonlar sonunda hem MiBird-U-F/MiBird-U-R ve AVE01-F/AVE01-R primer çiftleri ile bütün optimizasyonlar gerçekleştirildi. Örneklerin NGS aşaması için kütüphane basamağının bir sonraki aşamasına geçildi.

Örneklerin kütüphane basamağı bölüm 3.3.11 ve bölüm 3.3.12 biyoinformatik analizler kısmında açıklandığı gibi hazırlandı. Elde edilen hesaplama sonuçları Çizelge 4.33- 4.34- 4.35- 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4.33 AVES01-F/AVES01-R, Tag Kombinasyon, 1. Kütüphane Karışım Hesaplama Tablosu

Primer Adı	Konsantrasyon (1008 ng/ µl)	Eklenecek PCR Ürünü Miktarı	Örnek Numarası
Aves01_F/R_1	4,89	5,7 µl	2611
Aves01_F/R_2	7,63	3,7 µl	2612
Aves01_F/R_3	8,46	3,3 µl	2613
Aves01_F/R_4	8,29	3,4 µl	2614
Aves01_F/R_5	9,96	2,8 µl	2615
Aves01_F/R_6	6,01	4,7 µl	2616
Aves01_F/R_7	7,71	3,6 µl	2617
Aves01_F/R_8	6,1	4,6 µl	2618
Aves01_F/R_9	5,85	4,8 µl	2619
Aves01_F/R_10	5,48	5,1 µl	2620
Aves01_F/R_11	4,96	5,6 µl	2621
Aves01_F/R_12	6,46	4,3 µl	2622
Aves01_F/R_13	5,09	5,5 µl	2623
Aves01_F/R_14	5,81	4,8 µl	2624
Aves01_F/R_15	7,08	4,0 µl	2625
Aves01_F/R_16	5,56	5,0 µl	2626
Aves01_F/R_17	6,57	4,3 µl	2627
Aves01_F/R_18	4,71	5,9 µl	2628
Aves01_F/R_19	3,12	9,0 µl	2629
Aves01_F/R_20	5,14	5,4 µl	2630
Aves01_F/R_21	5,67	4,9 µl	2631
Aves01_F/R_22	2,65	10,6 µl	2632
Aves01_F/R_23	6,12	4,6 µl	2633
Aves01_F/R_24	4,88	5,7 µl	2634
Aves01_F/R_25	4,82	5,8 µl	2635
Aves01_F/R_26	5,9	4,7 µl	2636
Aves01_F/R_27	3,94	7,1 µl	2637
Aves01_F/R_28	5,69	4,9 µl	2638
Aves01_F/R_29	5,4	5,2 µl	2639
Aves01_F/R_30	4,49	6,2 µl	2640
Aves01_F/R_31	3,52	8,0 µl	2641
Aves01_F/R_32	5,74	4,9 µl	2642
Aves01_F/R_33	4,3	6,5 µl	2850
Aves01_F/R_34	7,8	3,6 µl	2851
Aves01_F/R_35	6,79	4,1 µl	2852
Aves01_F/R_36	3,22	8,7 µl	2853
		Toplam = 191,2 µl	

Çizelge 4.34 MiBird-U-F/MiBird-U-R, Tag Kombinasyon, 2. Kütüphane Karışım Hesaplama Tablosu

Primer Adı	Konsantrasyon (1908 ng/ µl)	Eklenecek PCR Ürünü Miktarı	Örnek Numarası
MiBird_F/R_01	9,96	5,32 µl	2611
MiBird_F/R_02	10,8	4,91 µl	2612
MiBird_F/R_03	22,8	2,32 µl	2613
MiBird_F/R_04	28,2	1,88 µl	2614
MiBird_F/R_05	39,8	1,33 µl	2615
MiBird_F/R_06	15,3	3,46 µl	2616
MiBird_F/R_07	19,6	2,70 µl	2617
MiBird_F/R_08	24,9	2,13 µl	2618
MiBird_F/R_09	12,3	4,31 µl	2619
MiBird_F/R_10	17,2	3,08 µl	2620
MiBird_F/R_11	12,3	4,31 µl	2621
MiBird_F/R_12	14,5	3,66 µl	2622
MiBird_F/R_13	19,1	2,77 µl	2623
MiBird_F/R_14	20,1	2,64 µl	2624
MiBird_F/R_15	23,1	2,29 µl	2625
MiBird_F/R_16	23,3	2,27 µl	2626
MiBird_F/R_17	18,7	2,83 µl	2627
MiBird_F/R_18	45,8	1,16 µl	2628
MiBird_F/R_19	16,8	3,15 µl	2629
MiBird_F/R_20	18,2	2,91 µl	2630
MiBird_F/R_21	11,5	4,61 µl	2631
MiBird_F/R_22	23,5	2,26 µl	2632
MiBird_F/R_23	14,2	3,73 µl	2633
MiBird_F/R_24	15,5	3,42 µl	2634
MiBird_F/R_25	23,3	2,27 µl	2635
MiBird_F/R_26	17,6	3,01 µl	2636
MiBird_F/R_27	24	2,21 µl	2637
MiBird_F/R_28	9,58	5,53 µl	2638
MiBird_F/R_29	24,7	2,15 µl	2639
MiBird_F/R_30	11,4	4,65 µl	2640
MiBird_F/R_31	20,1	2,64 µl	2641
MiBird_F/R_32	26,2	2,02 µl	2642
MiBird_F/R_33	30,8	1,72 µl	2850
MiBird_F/R_34	29,2	1,82 µl	2851
MiBird_F/R_35	29,3	1,81 µl	2852
MiBird_F/R_36	12,3	4,31 µl	2853
		Toplam 107,61 µl	

Optimizasyonu gerçekleştirilen her bir PCR ürünü Qubit cihazı ile florometrik ölçümü yapıldıktan sonra karışımlar hazırlandı (Çizelge 4.33- 4.34- 4.35- 4.36). Örneklerin adaptör ligasyonu gerçekleştirildi protokoller bölüm 3.3.11’de verilmiştir. Bu aşamadan sonra örnekler dizilenmek üzere cihaza yüklendi.

4.2 Kuş Gözlem Veri Bulguları

Gözlem sonuçları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 4.35- 4.57). IUCN’nin (Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği) tür kategorisine göre kodlanmıştır. EN: (Tehlikede), VU: (Hassas), NT: (Neredeyse tehdit altında), LC: (Asgari endişe).

Çizelge 4.35 22.03.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	22.03.2018				
Ordo	Familya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Pelecaniformes	Ardeidae	Küçük ak balıkçıl	<i>Egretta garzetta</i>	Little Egret	LC
		Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Passeriformes	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC

Çizelge 4.36 02.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	2.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Dikkuyruk	<i>Oxyura leucocephala</i>	White-headed Duck	EN
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC

Çizelge 4.37 03.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	3.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Sığır balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	Cattle Egret	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılibıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Laniidae	Kızılsırtlı Örümcekkuşu	<i>Lanius collurio</i>	Red-backed Shrike	LC

Çizelge 4.38 04.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	4.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Sığır balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	Cattle Egret	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Pasbaş Patka	<i>Aythya nyroca</i>	Ferruginous Duck	NT
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC

Çizelge 4.39 05.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	5.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Sığır balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	Cattle Egret	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgağa	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC

Çizelge 4.40 06.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	6.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Sığır balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	Cattle Egret	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgağa	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
		Macar ördeği	<i>Netta rufina</i>	Red-crested Pochard	LC
		Pasbaş Patka	<i>Aythya nyroca</i>	Ferruginous Duck	NT
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Passeridae	Serçe	<i>Passer domesticus</i>	House Sparrow	LC

Çizelge 4.41 07.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	7.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbit	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Laniidae	Kızılsırtlı Örtümcekkuşu	<i>Lanius collurio</i>	Red-backed Shrike	LC
	Passeridae	Serçe	<i>Passer domesticus</i>	House Sparrow	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.42 08.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	8.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkçaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
		Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.43 10.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	10.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgağa	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.44 11.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	11.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.45 12.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	12.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.46 16.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	16.04.2018				
Ordo	Familya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşık gaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuşu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC
		Küçük kum kuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
		Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılibıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Sturnidae	Sığircık	<i>Sturnus vulgaris</i>	Common Starling	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.47 17.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	17.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılback	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunback	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Sturnidae	Siğircik	<i>Sturnus vulgaris</i>	Common Starling	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.48 18.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	18.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
		Mahmuzlu kızkuşu	<i>Vanellus spinosus</i>	Spur-winged Lapwing	LC
	Scolopacidae	Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC
		Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılback	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunback	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Sturnidae	Sığırcık	<i>Sturnus vulgaris</i>	Common Starling	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC
Gruiformes	Gruidae	Telli Turna	<i>Anthropoides virgo</i>	Demoiselle Crane	LC

Çizelge 4.49 19.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	19.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
		Küçük ak balıkçıl	<i>Egretta garzetta</i>	Little Egret	LC
		Büyük Ak Balıkçıl	<i>Ardea alba</i>	Great White Egret	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılacak	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC

Çizelge 4.50 20.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	20.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılbacak	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC
	Alaudidae	Boğmaklı Toygar	<i>Melanocorypha calandra</i>	Calandra Lark	LC
		Bozkur Toygarı	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Greater Short-toed Lark	LC
		Tarla kuşu	<i>Alauda arvensis</i>	Eurasian Skylark	LC
	Emberizidae	Tarla Çintesi	<i>Emberiza calandra</i>	Corn Bunting	LC
		Kirazkuşu	<i>Emberiza hortulana</i>	Ortolan Bunting	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.51 23.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	23.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormorant	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC
		Orman Düdükçünü	<i>Tringa glareola</i>	Wood Sandpiper	LC
		Yeşil Düdükçün	<i>Tringa ochropus</i>	Green Sandpiper	LC
		Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövuşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılbacak	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC
	Alaudidae	Boğmaklı Toygar	<i>Melanocorypha calandra</i>	Calandra Lark	LC
		Bozkur Toygarı	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Greater Short-toed Lark	LC
		Tarla kuşu	<i>Alauda arvensis</i>	Eurasian Skylark	LC
	Emberizidae	Tarla Çintesi	<i>Emberiza calandra</i>	Corn Bunting	LC
		Kirazkuşu	<i>Emberiza hortulana</i>	Ortolan Bunting	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.52 24.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	24.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
Ciconiiformes	Ciconiidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgağa	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Dikkuyruk	<i>Oxyura leucocephala</i>	White-headed Duck	EN
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC
		Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövuşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızbacak	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC
	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
		Bozkur Toygarı	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Greater Short-toed Lark	LC
		Kirazkuşu	<i>Emberiza hortulana</i>	Ortolan Bunting	LC
	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC

Çizelge 4.53 25.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	25.04.2018				
Ordo	Familya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
		Kara boyunlu batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC
Suliformes	Phalacrocoracidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
		Erguvani balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC
		Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
	Threskiornithidae	Kaşıkçı	<i>Platalea leucorodia</i>	Eurasian Spoonbill	LC
Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	Filamingo	<i>Phoenicopiterus roseus</i>	Greater Flamingo	LC
Anseriformes	Anatidae	Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkçaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
		Çamurcun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC
		Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC

Çizelge 4.54 26.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	26.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC
	Passeridae	Serçe	<i>Passer domesticus</i>	House Sparrow	LC
Anseriformes	Anatidae	Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC

Çizelge 4.55 27.04.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	27.04.2018				
Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
Anseriformes	Anatidae	Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC
		Boz kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC
		Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC
		Elmabaş patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU
		Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC
		Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Charadriidae	Halkalı Küçük Cılbıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC
	Scolopacidae	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC
		Bataklık düdükünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Dere düdükünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Recurvirostridae	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
	Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC
	Laridae	Sumru	<i>Sterna hirundo</i>	Common Tern	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC

Çizelge 4.56 16.08.2018 Tarihli Örnek Eşleşmeleri.

Gözlem Tarihi	16.08.2018				
Ordo	Familya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN
Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC
		Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC
Pelecaniformes	Ardeidae	Alaca balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC
		Gri balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC
Accipitriformes	Accipitridae	Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC
Gruiformes	Rallidae	Sutavuşu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC
		Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC
Charadriiformes	Scolopacidae	Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC
		Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC
		Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT
		Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC
		Kara kızılback	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC
		Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC
	Laridae	Sumru	<i>Sterna hirundo</i>	Common Tern	LC
	Recurvirostridae	Uzunback	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC
Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC
		Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC
Passeriformes	Alaudidae	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC
	Motacillidae	Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC
		Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC
	Corvidae	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC
		Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC
	Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC
	Panuridae	Bıyıklı baştankara	<i>Panurus biarmicus</i>	Bearded Reedling	LC
	Emberizidae	Bataklık Çintesi	<i>Emberiza schoeniclus</i>	Common Reed Bunting	LC
Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	Filamingo	<i>Phoenicopus roseus</i>	Greater Flamingo	LC
Anseriformes	Anatidae	Çıkıkçım	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC

Çizelge 4.57' de 22 günlük arazi süresince gözlemlenen tüm kuş türleri verilmiştir. Arazi süresince toplamda 67 farklı kuş türü gözlemlenmiştir. Her türün göçmenlik statüsü yanında kodlanarak belirtilmiştir. Kodlamaya göre toplamda 36 tür göçmen, 8 yerli, 23 tür ise hem her daim görülebilen hem de göçmen olan türlerimizdir. Göçmenlik kodlamaları ve açıklamaları;

H: Her mevsim, yerli, Türkiye'de yuvalayan ve yaz kış aynı bölgede kalan türler.

Y: Yaz, göçmeni, üremek için Türkiye'ye gelen ve kışı başka ülkelerde geçiren türler.

K: Kış göçmeni, sadece kışı Türkiye'de geçirmek üzere gelen türler.

G: Geçit türü, üreme alanı ile kışlama alanı arasında gidip gelirken sadece göç döneminde ülkemizde görülen türler.

Küçük harf: Nadir ancak düzenli olarak görülenler.

r: Rastlantısal konuk, Türkiye'de çok nadir olarak kaydedilen türler.

Çizelge 4.57 Kuş Gözlemi ile Tespit Edilen Aves Sınıfı Tür Listesi.

Gözlemlenen Kuş Türleri							
	Ordo	Familiya	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	İngilizce Adı	IUCN	Göç
1	Anseriformes	Anatidae	Kaşıkçaga	<i>Anas clypeata</i>	Northern Shoveler	LC	G, H, K
2			Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	Garganey	LC	k, Y, G
3			Boz Kaz	<i>Anser anser</i>	Greylag Goose	LC	H, K
4			Elmabaş Patka	<i>Aythya ferina</i>	Common Pochard	VU	G, H, K
5			Dikkuyruk	<i>Oxyura leucocephala</i>	White-headed Duck	EN	G, H, K
6			Macar Ördeği	<i>Netta rufina</i>	Red-crested Pochard	LC	H, K
7			Pasbaş Patka	<i>Aythya nyroca</i>	Ferruginous Duck	LC	G, H, K
8			Çamurçun	<i>Anas crecca</i>	Eurasian Teal	LC	h, K
9			Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	Mallard	LC	H, K
10			Angıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	Ruddy Shelduck	LC	H, K
11	Podicipediformes	Podicipedidae	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Little Grebe	LC	H, K
12			Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	Great Crested Grebe	LC	H, K
13			Kara Boyunlu Batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	Black-necked Grebe	LC	H, K
14	Gruiformes	Rallidae	Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	Eurasian Coot	LC	H, K
15		Gruidae	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	Common Moorhen	LC	G, H, K
16	Suliformes	Phalacrocoracidae	Telli Turna	<i>Grus virgo</i>	Demoiselle Crane	LC	g, y
17	Ciconiiformes	Ciconiidae	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Great Cormoran	LC	H, K
18	Pelecaniformes	Ardeidae	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	White Stork	LC	G, k, Y
19			Erguvani Balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	Purple Heron	LC	G, Y
20			Gri Balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	Grey Heron	LC	G, H, K
21			Büyük Ak Balıkçıl	<i>Ardea alba</i>	Great White Egret	LC	G, K, y
22			Küçük Ak Balıkçıl	<i>Egretta garzetta</i>	Little Egret	LC	G, H, K
23			Alaca Balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	Squacco Heron	LC	G, Y
24			Sığır Balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	Cattle Egret	LC	g, k, y
25		Threskiornithidae	Kaşıkçı	<i>Platalea leucorodia</i>	Eurasian Spoonbill	LC	G, H, K
26	Charadriiformes	Scolopacidae	Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	Black-tailed Godwit	NT	G, K
27			Suçulluğu	<i>Gallinago gallinago</i>	Common Snipe	LC	G, K
28			Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	Marsh Sandpiper	LC	G
29			Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	Black-winged Stilt	LC	k, Y
30			Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	Ruff	LC	G, K
31			Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	Common Sandpiper	LC	G, k, Y
32			Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	Pectoral Sandpiper	LC	r
33			Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	Little Stint	LC	G, K
34			Kara kızılback	<i>Tringa erythropus</i>	Spotted Redshank	LC	G, K
35			Yeşilback	<i>Tringa nebularia</i>	Common Greenshank	LC	G, K
36			Orman düdükçünü	<i>Tringa glareola</i>	Wood Sandpiper	LC	G
37			Yeşil düdükçin	<i>Tringa ochropus</i>	Green Sandpiper	LC	G, K, y?
38			Ak kum kuşu	<i>Calidris alba</i>	Sanderling	LC	G, k
39			Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	Red Knot	NT	g, k
40		Charadriidae	Büyük Cıvıt	<i>Charadrius leschenaultii</i>	Greater Sand Plover	LC	g, Y
41			Halkalı Küçük Cıvıt	<i>Charadrius dubius</i>	Little Ringed Plover	LC	G, Y
42			Mahmuzlu Kızkuşu	<i>Vanellus spinosus</i>	Spur-winged Lapwing	LC	Y
43		Laridae	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	Black-headed Gull	LC	h, K
44			Sumru	<i>Sterna hirundo</i>	Common Tern	LC	G, Y
45	Accipitriformes	Accipitridae	Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	Western Marsh-harrier	LC	G, H, k
46			Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	Long-legged Buzzard	LC	H
47	Columbiformes	Columbidae	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	Rock Dove	LC	H
48			Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	Eurasian Collared Dove	LC	H
49	Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	Filamingo	<i>Phoenicopeterus roseus</i>	Greater Flamingo	LC	r
50	Bucerotiformes	Upupidae	İbibik	<i>Upupa epops</i>	Eurasian Hoopoe	LC	G, Y
51	Passeriformes	Muscicapidae	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	Isabelline Wheatear	LC	G, Y
52			Kuyrukkakan	<i>Oenanthe oenanthe</i>	Northern Wheatear	LC	G, Y
53			Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	Western Yellow Wagtail	LC	G, Y
54		Motacillidae	Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	White Wagtail	LC	G, H, K
55		Laniidae	Kızıl Sırtlı Örümcekkuşu	<i>Lanius collurio</i>	Red-backed Shrike	LC	G, Y
56		Alaudidae	Boğmaklı Toygar	<i>Melanocorypha calandra</i>	Calandra Lark	LC	H
57			Bozkır Toygarı	<i>Calandrella brachydactyla</i>	Greater Short-toed Lark	LC	G, Y
58			Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	Crested Lark	LC	H
59		Hirundinidae	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	Barn Swallow	LC	G, Y
60		Panuridae	Bıyıklı başankara	<i>Panurus biarmicus</i>	Bearded Reedling	LC	H, K, Y
61		Emberizidae	Tarla Çintesi	<i>Emberiza calandra</i>	Corn Bunting	LC	G, H, K
62			Kirazkuşu	<i>Emberiza hortulana</i>	Ortolan Bunting	LC	G, Y
63		Passeridae	Serçe	<i>Passer domesticus</i>	House Sparrow	LC	H
64		Corvidae	Saksağan	<i>Pica pica</i>	Eurasian Magpie	LC	H
65			Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	Western Jackdaw	LC	H
66		Sturnidae	Sığircık	<i>Sturnus vulgaris</i>	Common Starling	LC	H, K
67		Alaudidae	Tarla kuşu	<i>Alauda arvensis</i>	Eurasian Skylark	LC	G, H, K

4.3 Yeni Nesil Dizileme Bulguları

NGS sonucunda 12S gen bölgesini çoğaltan MiBird-U-F/MiBird-U-R primer çifti ile ileri ve geri okumalar birleştirildikten sonra toplamda 82.546.892 okuma elde edilmiştir. Ham veriler temizlendikten sonra toplamda 345.265 dizi okuması kalmıştır. 1 tür başına 10'dan fazla elde edilen okuma sayısı 4.743. 1 tür başına 1-10 arası okuma dizisi ise 228.780 olarak elde edilmiştir.

NGS sonucunda AVES01-F/AVES01-R primer çifti ile ileri ve geri okumalar birleştirildikten sonra toplamda 56.939.293 okuma elde edilmiştir. Ham veriler temizlendikten sonra toplamda 13.140.784 dizi okuması kalmıştır. 1 tür başına 10'dan fazla elde edilen okuma sayısı 13.832. 1 tür başına 1-10 arası okuma dizisi ise 380.848 olarak elde edilmiştir.

Gözlemlenen 67 kuş türünün gen bankasında 12S gen bölgesi giriş kaydı bilgisi Çizelge 4.58 'de verilmiştir. 11 kuş türünün 12S veri girişi bulunmamaktadır.

Temizlenen ve okuma sayısına (1-10 arası ve 10 'dan fazla okuma sayısı) göre ayrılan diziler, gen bankasından omurgalı veri tabanı indirilerek ecoPCR kodu ile bu tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerinin çoğalttığı diziler ile 12S referans veri tabanı oluşturulmuştur. Oluşturulan referans veri tabanı ile okuma sayısına göre ayrılan NGS verileri eşleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.59 ve 4.60 'da verilmiştir.

Referans veri tabanı ile eşleştirilen AVES01-F/AVES01-R dizileri ile mikroorganizma seviyesinde sonuç elde edilmiştir. Bu veri sonucunda hiçbir şekilde kuş ve diğer omurgalı, omurgasız türler ile eşleşme sağlanamamıştır.

Referans veri tabanı ile eşleştirilen MiBird-U-F/MiBird-U-R primer çifti ile 30 kuş türünde eşleşme elde edildi. Bunlardan 13 tanesi gözlemlenen türler arasında, 17 tür ise gözlem datasında bulunmayan fakat Konya ve civarında gözlemlenmesi yüksek ihtimalli türler ya da gen bankasında kuş türleri için 12S gen bölgesinin yetersiz veri girişinden dolayı en yakın türü ile eşleşen türlerdir.

Elde edilen veri setinden kuş türleri dışında eşleşen diğer türler çıkartılmıştır. Veri setimizde Uyuz Gölü 'nde bulunması yüksek ihtimal olan balık, kurbağa, kaplumbağa gibi türlerden sonuç elde edilmiştir.

Çizelge 4.58 Gözlemlenen Türler 12S Veri Tabanı Bilgisi

	Türkçe Adı	Bilimsel Adı	12S Veri Tabanı	Not
1	Kaşıkgaga	<i>Anas clypeata</i>	✓	
2	Çıkrıkçın	<i>Anas querquedula</i>	✓	1 veri girişi.
3	Boz Kaz	<i>Anser anser</i>	✓	
4	Elmabaş Patka	<i>Aythya ferina</i>	✓	1 veri girişi.
5	Dikkuyruk	<i>Oxyura leucocephala</i>	✓	1 veri girişi.
6	Macar Ördeği	<i>Netta rufina</i>	✓	1 veri girişi.
7	Pasbaş Patka	<i>Aythya nyroca</i>	X	
8	Çamurçun	<i>Anas crecca</i>	✓	1 veri girişi.
9	Yeşilbaş	<i>Anas platyrhynchos</i>	✓	
10	Anıt	<i>Tadorna ferruginea</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
11	Küçük Batağan	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	✓	2 giriş fakat gen bölgesi çok kısa
12	Bahri	<i>Podiceps cristatus</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
13	Kara Boyunlu Batağan	<i>Podiceps nigricollis</i>	✓	1 veri girişi.
14	Sakarmeke	<i>Fulica atra</i>	✓	
15	Sutavuğu	<i>Gallinula chloropus</i>	✓	
16	Telli Turna	<i>Grus virgo</i>	✓	
17	Karabatak	<i>Phalacrocorax carbo</i>	✓	
18	Leylek	<i>Ciconia ciconia</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
19	Erguvani Balıkçıl	<i>Ardea purpurea</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
20	Gri Balıkçıl	<i>Ardea cinerea</i>	✓	
21	Büyük Ak Balıkçıl	<i>Ardea alba</i>	✓	1 veri girişi.
22	Küçük Ak Balıkçıl	<i>Egretta garzetta</i>	✓	
23	Alaca Balıkçıl	<i>Ardeola ralloides</i>	X	
24	Sığır Balıkçılı	<i>Bubulcus ibis</i>	✓	
25	Kaşıkcı	<i>Platalea leucorodia</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
26	Çamurçulluğu	<i>Limosa limosa</i>	✓	
27	Suçulluğu	<i>Gallinago gallinago</i>	✓	
28	Bataklık düdükçünü	<i>Tringa stagnatilis</i>	✓	1 veri girişi.
29	Uzunbacak	<i>Himantopus himantopus</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
30	Dövüşkenkuş	<i>Philomachus pugnax</i>	✓	
31	Dere düdükçünü	<i>Actitis hypoleucos</i>	✓	1 veri girişi.
32	Çizgili kum kuşu	<i>Calidris melanotos</i>	✓	1 veri girişi.
33	Küçük kumkuşu	<i>Calidris minuta</i>	✓	1 veri girişi.
34	Kara kızbacak	<i>Tringa erythropus</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
35	Yeşilbacak	<i>Tringa nebularia</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
36	Orman Düdükçünü	<i>Tringa glareola</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
37	Yeşil Düdükçün	<i>Tringa ochropus</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
38	Ak kum kuşu	<i>Calidris alba</i>	✓	1 veri girişi.
39	Büyük kumkuşu	<i>Calidris canutus</i>	✓	
40	Büyük Cılıbt	<i>Charadrius leschenaultii</i>	X	
41	Halkalı Küçük Cılıbt	<i>Charadrius dubius</i>	X	
42	Mahmuzlu Kızkuşu	<i>Vanellus spinosus</i>	X	
43	Karabaş martı	<i>Larus ridibundus</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
44	Sumru	<i>Sterna hirundo</i>	✓	1 giriş ve tüm genom verileri.
45	Saz delicesi	<i>Circus aeruginosus</i>	✓	1 veri girişi.
46	Kızıl Şahin	<i>Buteo rufinus</i>	✓	
47	Kaya Güvercini	<i>Columba livia</i>	✓	
48	Kumru	<i>Streptopelia decaocto</i>	✓	
49	Filamingo	<i>Phoenicopterus roseus</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
50	İbibik	<i>Upupa epops</i>	✓	
51	Boz kuyrukkakan	<i>Oenanthe isabellina</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut
52	Kuyrukkakan	<i>Oenanthe oenanthe</i>	✓	1 veri girişi.
53	Sarı Kuyruksallayan	<i>Motacilla flava</i>	✓	
54	Akkuyruksallayan	<i>Motacilla alba</i>	✓	
55	Kızıl Sırtlı Örümcekkuşu	<i>Lanius collurio</i>	✓	
56	Boğmaklı Toygar	<i>Melanocorypha calandra</i>	X	
57	Bozkır Toygarı	<i>Calandrella brachydactyla</i>	X	
58	Tepeli Toygar	<i>Galerida cristata</i>	X	
59	Kır kırlangıcı	<i>Hirundo rustica</i>	✓	
60	Bıyıklı baştankara	<i>Panurus biarmicus</i>	✓	1 veri girişi.
61	Tarla Çintesi	<i>Emberiza calandra</i>	X	
62	Kirazkuşu	<i>Emberiza hortulana</i>	X	
63	Serçe	<i>Passer domesticus</i>	✓	
64	Saksağan	<i>Pica pica</i>	✓	
65	Küçük Karga	<i>Coloeus monedula</i>	X	
66	Sığırcık	<i>Sturnus vulgaris</i>	✓	
67	Tarla kuşu	<i>Alauda arvensis</i>	✓	Sadece tüm genom verisi mevcut

Çizelge 4.59 1-10 Okuma Sayısı ile Eşleşen Tür Listesi

1-10 Arası Kopya Sayısı ile Eşleşen Kuş Türleri				
	Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Okuma Sayısı	Eşleşme Yüzdesi
1	<i>Actitis macularia</i>	Benekli düdükçün	5	93.8%
2	<i>Alopochen aegyptiaca</i>	Nil Kazı	1	96.8%
3	<i>Anas acuta</i>	Kıl kuyruk	1	97.3%
4	<i>Anas clypeata</i>	Kaşıkgaga	4	100%
5	<i>Anas crecca</i>	Çamurcun	1	98.3%
6	<i>Anas platyrhynchos</i>	Yeşilbaş	1	99.4%
7	<i>Anser albifrons</i>	Sakarca	1	97.8%
8	<i>Anser anser</i>	Boz Kaz	9	99.4%
9	<i>Anser fabalis</i>	Tarla Kazı	1	97.8%
10	<i>Ardea cinerea</i>	Gri Balıkçıl	9	99.4%
11	<i>Ardea purpurea</i>	Erguvani Balıkçıl	2	96%
12	<i>Branta bernicla</i>	Yosun Kazı	9	98.9%
13	<i>Calamospiza melanocorys</i>	Amerikan Serçesi	2	76.6%
14	<i>Cephus grylle</i>	Kara Dalıcı Martı	1	76.6%
15	<i>Cygnus columbianus</i>	Küçük Kuğu	2	97.8%
16	<i>Cygnus cygnus</i>	Ötücü Kuğu	1	98.4%
17	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	9	99.5%
18	<i>Gallinula chloropus</i>	Su Tavuğu	9	99%
19	<i>Gallus gallus</i>	Orman Tavuğu	9	98.8%
20	<i>Numenius phaeopus</i>	Sürmeli Kervan Çulluğu	1	87.8%
21	<i>Phalaropus lobatus</i>	Deniz düdükçünü	1	86.8%
22	<i>Platalea alba</i>	Afrika Kaşıkçısı	7	87.7%
23	<i>Plegadis chihi</i>	Ak Başlı Aynak	2	76.6%
24	<i>Porzana pusilla</i>	Küçük Su Yelvesi	9	88.8%
25	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	9	100%
26	<i>Tringa erythropus</i>	Karakızıl Bacak	7	89.4%
27	<i>Tringa glareola</i>	Orman Düdükçünü	6	88.8%
28	<i>Tringa nebularia</i>	Yeşil Bacak	6	89.3%
29	<i>Tringa ochropus</i>	Yeşil Düdükçün	6	88.8%
30	<i>Tringa totanus</i>	Kızılback	5	88.2%

Çizelge 4.60 10 ve Üzeri Okuma Sayısı ile Eşleşen Tür Listesi

	Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Okuma Sayısı	Eşleşme Yüzdesi
1	<i>Anser anser</i>	Boz Kaz	163.247	99.4%
2	<i>Branta bernicla</i>	Yosun Kazı	7.375	98.9%
3	<i>Anser fabalis</i>	Tarla Kazı	674	98.4%
4	<i>Anser albifrons</i>	Sakarca	209	98.9%
5	<i>Cygnus columbianus</i>	Küçük Kuğu	22	98.8%
6	<i>Ardea cinerea</i>	Gri Balıkçıl	26577	100%
7	<i>Fulica atra</i>	Sakarmeke	70702	100%
8	<i>Gallinula chloropus</i>	Su Tavuğu	196	100%
9	<i>Gallus gallus</i>	Orman Tavuğu	2588	99.4%
10	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	44295	100%
11	<i>Tringa glareola</i>	Orman Düdükçünü	105910	100%

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Arazi çalışmaları sırasında çevresel DNA çalışmaları için su örneklemeleri alındıktan sonra kuş gözlem aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada, göl çok sığ ve balık açısından zengin olduğu için hemen hemen her gün olta ve elle balık tutan balıkçılar gözlemlenmiştir. Yerel halk ile görüşüldüğünde daha önceki yıllarda gölün içerisinde sülüklerin bulunduğu ve farklı kuş türleri ve yoğun popülasyonlarını gözlemlediklerini ancak köy muhtarının isteği ile göl içerisine balık atılarak gölün ekolojik dengesinin tamamen bozulduğu aktarılmıştır. Ayrıca gölün etrafında bulunan tarım arazilerini sulamak için gölden sürekli su çekilmektedir. Bu durum dalıcı ve sazlık alanlarda yuva yapan kuş türlerimiz için tehdit oluşturmaktadır. Göl sığlaştıkça sazlık alanlara ulaşım kolaylaşmaktadır. Balık ve kuş türleri için avlanmaya gelen kaçak avcılarının ve yırtıcı hayvanların göle olan ulaşım ve avlama mesafesi kısalmaktadır.

Habitat tahribatı, günümüzde sayıları küresel ölçekte azalan kuş türlerinin karşılaştıkları önemli bir sorundur. Böylelikle beslenme, yuvalama ve konaklama alanı olarak Uyuz Gölü'ne gelen kuş türlerimiz ve özellikle nesli küresel ölçekte tehdit altında olan iki türümüz Dikkuyruk ve Elmabaş Patka ördek türlerimiz için habitat kaybına yol açmaktadır.

22.03.2018, 02- 27.04.2018 ve 16.08.2018 tarihlerinde gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucunda 12 takım ve 26 familya içerisinde 67 tür gözlemlenmiştir. Kuş gözlemi deneyimsizliğinden dolayı bazı türlerden emin olunmadığı için gözlem verisinde yer verilmemiştir. eBird (eKuşBank) verilerine göre toplamda 69 tür bu bölge için kayıt edilmiştir fakat tez arazi tarihlerinden önce 30 tür bu göl ve çevresinde gözlemlenmiştir. Gözlemlenen 67 kuş türünden 11 türün gen bankasında 12S veri girişi bulunmamaktadır. Gözlemlenen 45 tane tür su ile direkt bağlantılı türlerdir. Bu türler arasından 5 türün gen bankasında 12S gen bölgesi girişi bulunmamaktadır. 24 türün ise 12S gen bölgesi için sadece bir tane referans dizileri bulunmaktadır. Bu referans dizilerin çoğu 12S gen bölgesinin tamamını kapsamamaktadır. 4 türün ise sadece tüm genom referans dizileri bulunmaktadır.

Gen bankasında girişleri yapılan bu kadar az referans veri dizileri içerisinde çalışmamızda 30 tür ile eşleşme elde edilmiştir. Bu türlerden 13 tanesi gözlem yolu ile de tespit edilmiştir (*Anas clypeata* (Kaşıkga), *Anas crecca* (Çamurcun), *Anas platyrhynchos*

(Yeşilbaş), *Anser anser* (Boz kaz), *Ardea cinerea* (Gri balıkçıl), *Ardea purpurea* (Erguvani balıkçıl), *Fulica atra* (Sakarmeke), *Gallinula chloropus* (Su tavuğu), *Sturnus vulgaris* (Sığırcık), *Tringa erythropus* (Karakızıl bacak), *Tringa glareola* (Orman düdükünü), *Tringa nebularia* (Yeşil bacak), *Tringa ochropus* (Yeşil düdükünü)).

Tespit edilen diğer 17 tür ise gözlemlenmeyen fakat Konya ve civarında gözlemlenmesi yüksek türler arasındadır veya gen bankasında referans girişi olmadığı ya da kullandığımız primer çiftimizin çoğaltmadığı bir bölgenin dizi verisi olduğu için en yakın türü ile eşleşme sonucu veren türlerdir.

Actitis macularia, gözlem kayıtlarında bulunmayan bir tür olan Benekli düdükün ülkemiz için rastlantısal bir türdür. Bu nedenle, arazi gözlem çalışmaları sırasında her gün gözlemlenen dere düdükünü verisi ile dizi setimiz eşleşme ihtimali üzerinde durulmuştur. Dere düdükünü türü için bir adet referans dizisi ve kısa olan bir bölgenin 12S veri kaydı bulunmaktadır.

Porzana pusilla (Küçük su yelvesi), *Tringa totanus* (Kızıl bacak), *Cygnus columbianus* (Küçük kuğu), *Cygnus cygnus* (Ötücü kuğu), *Anas acuta* (Kıl kuyruk), *Anser albifrons* (Sakarca), *Anser fabalis* (Tarla kazı), *Phalaropus lobatus* (Deniz düdükünü) kuş türleri gözlem tarihleri boyunca gözlemlenmemiş olmakla beraber hem habitat uygunluğu hem de Konya ve civarında gözlemlenebilen türlerdir. Gözlem kayıtlarında olmayan bu veriler çevresel DNA yöntemi ile gözlem dışı kayıt edilmiş olabilir.

NGS sonuçlarında, Angıt gibi melez kazsı tür olan *Alopochen aegyptiaca* (Nil kazı) ile eşleşen veri setimiz, 12S gen bölgesi sadece tüm genom verisinde bulunan ve gözlem tarihleri boyunca neredeyse her gün ve birey sayısı yüksek (10+) gözlemlenen Angıt türü ile eşleşmiş olduğu ihtimali üzerinde durulmaktadır.

Branta bernicla (Yosun kazı) gözlem tarihleri boyunca gözlemlenmemiş olup veri setinde elde edilen yüksek okumalı eşleşmelerden dolayı bu türün Uyuz Gölü ve çevresinde bulunabileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca Boz kaz ile yakın bir tür olan Yosun kazı da veri setinde Boz kaz sonuçları ile eşleşmiş olabilir.

Calamospiza melanocorys (Amerikan serçesi), ülkemizde bulunmayan bir serçe türüdür. Ötücü kuş türlerinin gen veri bankasında bulunan çok az sayıda referans veri kayıtlarından dolayı en yakın bu tür ile eşleşmiş olduğu ihtimali üzerinde durulmaktadır.

(*Cepphus grylle*) Kara dalıcı martı, ülkemizde bulunmayan bu martı türü gözlem tarihleri boyunca gözlenen ve gen veri bankasında sadece tüm genom kaydı bulunan veri setimizde en yakın tür olan Karabaş martı ile eşleşme sonucu vermiş olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır.

Gallus gallus (Orman tavuğu), bölgedeki yerleşim yerlerinde çok sayıda yetiştiriciliği yapıldığı için veri setimizde tespit edilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Numenius phaeopus (Sürmeli kervan çulluğu), gözlem tarihleri boyunca gözlemlenmeyen bir tür olup hem habitat uygunluğu hem de Konya ve civarında gözlemlenebilen bir tür olduğu için bu veri, gözlem datasında olmayan ve çevresel DNA ile gözlem dışı kayıt edilmiş olabilir. Ayrıca gözlem boyunca tespit edilen Çamurçulluğu ile veri setimizde en yakın tür olarak eşleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Platalea alba (Afrika kaşıkçısı), ülkemizde bulunmayan bu kuş türü gözlem kayıtlarında bulunan hem habitat uygunluğu hem de Konya ve civarında gözlemlenebilen Kaşıkçı (*Platalea leucorodia*) ile veri setimizde en yakın tür olarak eşleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Plegadis chihi (Ak başlı aynak), ülkemizde bulunmayan bu kuş türü gözlem kayıtlarında bulunan hem habitat uygunluğu hem de Konya ve civarında gözlemlenebilen Çeltikçi (*Plegadis falcinellus*) ile veri setimizde en yakın tür olarak eşleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

eDNA yöntemi sunduğu cazip avantajların yanında değerlendirilmesi gereken birçok koşul ve kısıtlamalara da sahiptir. Değerlendirilmesi gereken koşullar arasında en önde gelenler örneklemenin planlanması, filtrasyon ve filtre tipine karar verilmesi, saklama koşulu ve/veya solüsyonunun belirlenmesi, DNA ekstraksiyon yönteminin optimize edilmesi, hedef gen bölgesinin belirlenmesi ve ilgili veri tabanının yeterliliğinin kontrolü, pozitif ve negatif kontrollerin kullanılması, inhibitörlerin uzaklaştırılması, kütüphane oluşturma yöntemi şeklinde özetlenebilir. Kısıtlamalar değerlendirildiğinde ise en önde gelen kısıtlama kuşkusuz yerel veri tabanları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışma sonucunda da görülmektedir ki yöntemi ne kadar kusursuz olarak optimize etmiş olsanız bile sonuçta sahip olduğunuz referans veri tabanı ölçeğinde tanımlama yapılabilinmektedir.

Günümüzde özellikle biyoçeşitlilik çalışmalarında sıklıkla kullanılan eDNA yöntemi ile birçok türün tespiti yapılabilmektedir. Birçok ülke bu tür çalışmaları yaparken kendi oluşturdukları yerel veri tabanlarını kullanmaktadırlar. Bu tez çalışmasında moleküler veri sonuçlarında karşılaştığımız en büyük sorun gözlemlediğimiz türlerin hem yerel dizi kayıtlarının olmaması hem de referans dizi girişlerinin çok az sayıda tür için tespit edilebilir olmasıdır. Çalışmamızda su ile direkt bağlantılı kuş türlerini referans verilerinin kısıtlı olmasına karşın birçok tür başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Yerel veri tabanı ve referans dizilerinin varlığında bu sonuçların güvenilirliğinin daha da artacağı düşünülmektedir. Bu sayede, sayıları her yıl küresel ölçekte azalan kuş türlerini görsel tanımlamaya ihtiyaç olmaksızın çevresel DNA yöntemi ile tespit edebilmek mümkün olacaktır

KAYNAKLAR

- Anonim 2004. Ramsar Akılcı Kullanım Kitapları 1. Kitapçık, 2004 Sulak Alanların Akılcı Kullanımı Glve,İsviçre.
- Anonim 2017. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü. 2016 Yılı Resmi Korunan Alan İstatistikleri. Son erişim: 25/12/2017
- Arslangündoğdu, Z., 2006. İstanbul Boğazı Kış Ortası Sukuşu Sayımı. İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, B 56 (1): 141-147.
- Barnes, M.A. and Turner, C.R. 2016. The Ecology of Environmental DNA and Implications for Conservation Genetics. Conservation Genetics 17(1), 1-17.
- Belon, Pierre. 1555. Les Observations de Plusieurs Singularitez et Choses Memorables: Trouvées en Grece, Asie, Judée, Egypte, Arabie et Autres Pays Estranges. Benoit Prevost pour Gilles Corrozet chez Guillaume Cavellat. 20-40, Paris.
- Bibby C., Jones M., Marsden S., 1998. Expedition Field Techniques Bird Surveys. Royal Geographical Society. London. 134.
- Bilgin, R., Ebeoğlu, N., İnak, S., Kırpık, M.A., Horns, J.J. and Şekercioğlu, Ç.H. 2016. DNA Barcoding of Birds at a Migratory Hotspot in Eastern Turkey Highlights Continental Phylogeographic Relationships. PloS one 11(6), e0154454.
- Bista, I., Carvalho, G.R., Walsh, K., Seymour, M., Hajibabaei, M., Lallias, D., Christmas, M. and Creer, S. 2017. Annual Time-Series Analysis of Aqueous eDNA Reveals Ecologically Relevant Dynamics of Lake Ecosystem Biodiversity. Nature Communications 8, 14087.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W. and de Bruyn, M. 2014. Environmental DNA for Wildlife Biology and Biodiversity Monitoring. Trends in Ecology & Evolution 29(6), 358-367.
- Boussarie, G., Bakker, J., Wangenstein, O.S., Mariani, S., Bonnin, L., Juhel, J.-B., Kiszka, J.J., Kulbicki, M., Manel, S., Robbins, W.D., Vigliola, L. and Mouillot, D. (2018) Environmental DNA Illuminates the Dark Diversity of Sharks. Science Advances 4(5), eaap9661.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. and Coissac, E. 2016. Obitools: A Unix-Inspired Software Package for DNA Metabarcoding. Molecular Ecology Resources 16(1), 176-182.
- Boyla, KA 2018. Türkiye Kuşları Tür Listesi. <http://www.kustr.org/kuskayitkomitesi/turlistesi>. Son erişim tarihi: 10 Eylül 2018.
- Carew, M.E., Pettigrove, V.J., Metzeling, L. ve Hoffmann, A.A. 2013. Environmental Monitoring Using Next Generation Sequencing: Rapid Identification of Macroinvertebrate Bioindicator Species. Frontiers in Zoology 10(1), 45.

- Clout, M. and Hay, R. 1989. The Importance of Birds as Browsers, Pollinators and Seed Dispersers in New Zealand Forests. N. Z. J. Ecol. (Suppl.) 12.
- Cowardin, L. M., Carter, V., Golet, F. C., La Roe, E. T., 1979. Classification of Wetlands and Deepwater Habitats of the United States. U. S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D. C. Jamestown, ND: Northern Prairie Wildlife Research Center Home Page, Washington Dc, USA.
- DOĞAL HAYATI KORUMA VAKFI (WWF-Türkiye), 2008. Türkiye'deki Ramsar Alanları Değerlendirme Raporu.
- Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. and Minamoto, T. 2017. Environmental DNA Analysis for Estimating the Abundance and Biomass of Stream Fish. *Freshwater Biology* 62(1), 30-39.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J. and Sullivan, C.A. 2006. Freshwater Biodiversity: Importance, Threats, Status and Conservation Challenges. *Biological Reviews* 81(2), 163-182.
- Edgar, R.C. 2010. Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19), 2460-2461.
- Eken G, Bozdoğan M, İsfendiyaroğlu S, Kılıç DT, ve Lise Y. (Ed.) .2006. Türkiye'nin Önemli Doğa Alanları. Ankara: Doğa Derneği.
- Elbrecht, V., Vamos, E.E., Meissner, K., Aroviita, J. ve Leese, F. 2017. Assessing Strengths and Weaknesses of DNA Metabarcoding-Based Macroinvertebrate Identification for Routine Stream Monitoring. *Methods in Ecology ve Evolution* 8(10), 1265-1275.
- Epp, L.S., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., ErsÉUs, C., Gusarov, V.I., Edwards, M.E., Johnsen, A., StenØIen, H.K., Hassel, K., Kauserud, H., Yoccoz, N.G., BrÅThen, K.A., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E. and Brochmann, C. 2012. New environmental Metabarcodes for Analysing Soil DNA: Potential for Studying Past and Present Ecosystems. *Molecular Ecology* 21(8), 1821-1833.
- Ergene S., 1945. Türkiye Kuşları. İst. Ün. Fen Fak. Monografileri 4: 361. İstanbul.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. and Taberlet, P. 2008. Species Detection Using Environmental DNA from Water Samples. *Biology Letters* 4(4), 423-425.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R. 2003a. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings. Biological Sciences* 270(1512), 313-321.

- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. 2003b. Barcoding Animal Life: Cytochrome C Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceedings. Biological sciences* 270 Suppl 1(Suppl 1), S96-S99.
- Hebert, Paul D. N.; Stoeckle, Mark Y.; Zemplak, Tyler S.; Francis, Charles M. 2004. Identification of Birds Through DNA Barcodes. In *Plos Biology* 2 (10), E312.
- Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F. and Schröder, W. 1992. Excrement Analysis by PCR [4]. *Nature* 359, 199.
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S., Edwards, D., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P., Woodcock, P., Edwards, F., Larsen, T., Hsu, W., Benedick, S., Hamer, K., Wilcove, D., Bruce, K., Wang, X., Levi, T., Lott, M. and Yu, D. 2013. Reliable, Verifiable and Efficient Monitoring of Biodiversity via Metabarcoding. *Ecology letters* 16.
- Johnsen, Arild; Rindal, Eirik; Ericson, Per G. P.; Zuccon, Dario; Kerr, Kevin C. R.; Stoeckle, Mark Y.; Lifjeld, Jan T. 2010. DNA Barcoding of Scandinavian Birds Reveals Divergent Lineages in Trans-Atlantic Species. In *Journal of Ornithology* 151 (3), Pp. 565–578.
- Jones, J. 2001. Bird Census Techniques. Colin J. Bibby , Neil D. Burgess , David A. Hill , Simon Mustoe. *The Quarterly Review of Biology* 76(3), 363-363.
- Keskin, E. 2014. Detection of Invasive Freshwater Fish Species Using Environmental DNA Survey. *Biochemical Systematics and Ecology* 56, 68-74.
- Kowalczyk, R., Wójcik, J.M., Taberlet, P., Kamiński, T., Miquel, C., Valentini, A., Craine, J.M. ve Coissac, E. 2019. Foraging Plasticity Allows a Large Herbivore to Persist in a Sheltering Forest Habitat: DNA Metabarcoding Diet Analysis of the European Bison. *Forest Ecology ve Management* 449, 117474.
- Longmire, J.L., Maltbie, M., Baker, R.J. and Texas Tech University, M. 1997. Use of "Lysis Buffer" in DNA Isolation and Its Implication for Museum Collections, Museum of Texas Tech University, Lubbock, TX. :.
- Magnin, G. ve Yazar, M. 1997. Important Bird Areas in Turkey. *DHKD*, 314, İstanbul.
- McFadden, T.N., Herrera, A.G. and Navedo, J.G. 2017. Waterbird Responses to Regular Passage of a Birdwatching Tour Boat: Implications for Wetland Management. *Journal for Nature Conservation* 40, 42-48.
- McInnes, J.C., Alderman, R., Deagle, B.E., Lea, M.-A., Raymond, B. and Jarman, S.N. 2017. Optimised Scat Collection Protocols for Dietary DNA Metabarcoding in Vertebrates. *Methods in Ecology ve Evolution* 8(2), 192-202.
- Meriç, B. T., Çağırankaya, S., 2013. Sulak Alanlar. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü. Ankara.

- Metzker, M.L. 2010. Sequencing Technologies — The Next Generation. *Nature Reviews Genetics* 11(1), 31-46.
- Miller, S.E. 2007. DNA Barcoding and the Renaissance of Taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(12), 4775-4776.
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N. and Taberlet, P. 2012. Who is Eating What: Diet Assessment Using Next Generation Sequencing. *Molecular Ecology* 21(8), 1931-1950.
- Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. 2007. Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes* 7(3), 355-364.
- Robinson, Scott K. 2006. Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques. *Techniques in Ecology and Conservation Series*. By William J Sutherland, Ian Newton, and Rhys E Green. *The Quarterly Review of Biology* 81(1), 83-84.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12), 5463-5467.
- Schmieder, R., Lim, Y.W., Rohwer, F. and Edwards, R. 2010. TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* 11(1), 341.
- Schnell, I.B., Bohmann, K. and Gilbert, M.T.P. 2015. Tag Jumps Illuminated - Reducing Sequence-to-Sample Misidentifications in Metabarcoding Studies. *Molecular Ecology Resources* 15(6), 1289-1303.
- Sekercioğlu, C.H. 2006. Increasing awareness of avian ecological function. *Trends Ecol Evol* 21:464–471.
- Şekercioğlu, Ç.H., Anderson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö.E., Semiz, G., Tavşanoğlu, Ç., Yokeş, M.B., Soyumert, A., İpekdağ, K., Sağlam, İ.K., Yücel, M. and Nüzhet Dalfes, H. 2011. Turkey's Globally Important Biodiversity in Crisis. *Biological Conservation* 144(12), 2752-2769.
- Şekercioğlu, Ç.H., Daily, G.C. and Ehrlich, P.R. 2004. Ecosystem Consequences of Bird Declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(52), 18042.
- Shogren, Ariel J.; Tank, Jennifer L.; Andruszkiewicz, Elizabeth; Olds, Brett; Mahon, Andrew R.; Jerde, Christopher L.; Bolster, Diogo. 2017. Controls on eDNA Movement in Streams: Transport, Retention, and Resuspension. In *Scientific Reports* 7 (1), P. 5065.

- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabaei, M. 2012. Next-generation Sequencing Technologies for Environmental DNA Research. *Molecular Ecology* 21(8), 1794-1805.
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E. and Hellström, M. 2017. Comparison of Capture and Storage Methods for Aqueous Microbial eDNA Using an Optimized Extraction Protocol: Advantage of Enclosed Filter. *Methods in Ecology and Evolution* 8(5), 635-645.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. and Coissac, É. (2018) *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*.
- Tabur, M. and Ayvaz, Y. 2010. *Ecological Importance of Birds*.
- Takahara, T., Ikebuchi, T., Doi, H. and Minamoto, T. 2019. Using Environmental DNA to Estimate the Seasonal Distribution and Habitat Preferences of a Japanese Basket Clam in Lake Shinji, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 221, 15-20.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10), 2731-2739.
- Thacker, R.W. 2004. *Biodiversity* by Christian Lévêque (CNRS) and Jean-Claude Mounolou (Université d'Orsay). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. 2004. ISBN 0-470-84957-6. *Journal of Natural Products* 67(9), 1636-1636.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic acids research* 22(22), 4673-4680.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. and Willerslev, E. 2012. Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE* 7(8), e41732.
- Thomsen, P.F. and Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An Emerging Tool in Conservation for Monitoring Past and Present Biodiversity. *Biological Conservation* 183, 4-18.
- Trakus 2018.
Web: https://www.trakus.org/kods_bird/uye/?fsx=gozlem&islem=oku&detay=7446
- Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiumi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W. and Miya, M. 2018. Demonstration of the Potential of Environmental DNA as a Tool for the Detection of Avian Species. *Scientific Reports* 8(1), 4493.

- Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Reece, J.B. and Campbell, N.A. 2017. Campbell biology.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. and Dejean, T. 2016. Next-generation Monitoring of Aquatic Biodiversity Using Environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4), 929-942.
- Willerslev, E., A. J. Hansen, J. Binladen, T. B. Brve, M. T. P. Gilbert, B. Shapiro, M. Bunce, C. Wiuf, D. A. Gilichinsky and A. Cooper. 2003. Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene ve Pleistocene Sediments. *Science* 300(5620): 791-795.
- Willerslev, E., Davison, J., Moora, M., Zobel, M., Coissac, E., Edwards, M.E., Lorenzen, E.D., Vestergård, M., Gussarova, G., Haile, J., Craine, J., Gielly, L., Boessenkool, S., Epp, L.S., Pearman, P.B., Cheddadi, R., Murray, D., Bråthen, K.A., Yoccoz, N., Binney, H., Cruaud, C., Wincker, P., Goslar, T., Alsos, I.G., Bellemain, E., Brysting, A.K., Elven, R., Sønstebo, J.H., Murton, J., Sher, A., Rasmussen, M., Rønn, R., Mourier, T., Cooper, A., Austin, J., Möller, P., Froese, D., Zazula, G., Pompanon, F., Rioux, D., Niderkorn, V., Tikhonov, A., Savvinov, G., Roberts, R.G., MacPhee, R.D.E., Gilbert, M.T.P., Kjær, K.H., Orlando, L., Brochmann, C. and Taberlet, P. 2014. Fifty Thousand Years of Arctic Vegetation and Megafaunal Diet. *Nature* 506, 47.
- Zizka, V.M.A., Elbrecht, V., Macher, J.-N. and Leese, F. 2019. Assessing the Influence of Sample Tagging and Library Preparation on DNA Metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 19(4), 893-899.
- Zulkefli, N.S., Kim, K.H. and Hwang, S.J. 2019. Effects of Microbial Activity and Environmental Parameters on the Degradation of Extracellular Environmental DNA from a Eutrophic Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(18).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşegül ER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 06.04.1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Cumhuriyet Lisesi (2010)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su ürünleri Anabilim Dalı (Şubat 2017- Ocak 2020)

A.Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

Er A, Ünal EM, Keskin E. 2017. Mock Community Analysis of Aquatic Plants using Environmental DNA (eDNA). ISEEP-2017: VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, 4-7 October, Çanakkale, Turkey (Poster Presentation).

Ünal EM, **Er A**, Çiftçi O, Keskin E. 2017. Identification of Aquatic Plant Species of Kamilet Valley using rbcL, matK and ITS Genes for DNA Barcoding. ISEEP-2017: VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, 4-7 October, Çanakkale, Turkey (Oral Presentation).

Er A, Ünal EM, Keskin E. 2018. Species Level Molecular Identification of Bird Species Using Environmental DNA. EEBST 2018: 5th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 18-20 July, Izmir, Turkey

Ünal EM, **Er A**, Garcia-Raventós A, Oğuzhan Z, Taş P, Keskin E. 2019. Bio-monitoring Hypersaline Lake Environments for Different Taxa. EEBST 2019: 6th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 10-12 July, Ankara, Turkey

Er A, Arıkan M, Bilgin F, Keskin E. 2019. Environmental DNA: a tool for estimation of fish biomass/abundance? EEBST 2019: 6th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 10-12 July, Ankara, Turkey

Er A, Atar HH, Şahoğlu V, Tuğcu I, Erkal H, Keskin E. 2019. Species Level Identification of Marine Fishes and Crustaceans using Ancient DNA Gathered from Underwater Excavations. EEBST 2019: 6th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 10-12 July, Ankara, Turkey

Ünal EM, Çelik I, Tarkan AS, Ciftci O, **Er A**, Kaynar S, Atar HH, Keskin E. 2019. Establishing National Early Warning and Monitoring System for Available and Potential Non-native Freshwater Fish Species in Turkey. EEBST 2019: 6th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 10-12 July, Ankara, Turkey

Aldığı Eğitimler ve Kurslar

Molecular Diagnostic (6 ay) – University of Applied Science Leiden – Erasmus -2015

Bilkent Üniversitesi – Evrimde Yeni Ufuklar Sempozyumu- 2013

Workshop on Invasive Species - II. İstilacı Türler Çalıştayı Bodrum -2017

Ankara Üniversitesi: Biyoteknoloji Enstitüsü Filogenetik Analizler Kursu (Eğitmen) - 2017

Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Evrimsel Genomik Kursu-. 29.01 – 02.02.2018.

The Global Agriculture and Food Science Program (Short-Term Exchange Program)
At the Graduate School of Science and Technology Niigata University, JAPAN – Ağustos 2019

4 th Joint Danube Survey 2019 (JDS4)- STSM (Short Term Scientific Mission) CA15219
Developing New Genetic Tools for Bioassessment of Aquatic Ecosystems in Europe, STSM start and end date: 27/06/2019 to 06/07/2019

Projeler

Liman Tepe ve Çeşme-Bağlararası Yerleşimlerinde Ele Geçen Sucul Canlılara Ait Kalıntılardan Antik DNA Elde Edilmesi, Moleküler Evrimsel Analizi ve Bu Bölgelerin Uzak Kültür Bölgeleri ile İlişkileri

Görevi: Araştırmacı Bursiyer

Destekleyen: TÜBİTAK 116Y107 (2017-2020)

STAJ

Biyodizel Üretimi, TBU Test ve PLU Test

ChiralVision Company J.H. Oortweg 21 NL-2333CH Leiden The Netherlands –
Holland (2015)

