

**FARKLI İLLERDEN TOPLANAN EKŞİ HAMUR ÖRNEKLERİNDEN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUŞLARININ İZOLASYONU, MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE POPÜLASYON ANALİZLERİ***

Nilgün Koçak , Mustafa Ardıç***

Aksaray Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Aksaray, Türkiye

Geliş/Received: 09.11.2023; Kabul /Accepted: 01.02.2024; Online baskı /Published online: 12.02.2024

Koçak, N., Ardıç, M. (2024). Farklı illerden toplanan ekşi hamur örneklerinden *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve popülasyon analizleri. GIDA (2024) 49 (1) 179-192 doi: 10.15237/gida.GD23072

Koçak, N., Ardıç, M. (2024). Isolation, molecular characterization, and population analysis of Saccharomyces cerevisiae from sourdough collected from different provinces. GIDA (2024) 49 (1) 179-192 doi: 10.15237/gida.GD23072

ÖZ

Bu çalışmada 3 farklı ilden (Aksaray, Niğde ve Konya) toplanan 18 adet geleneksel ekşi hamur örneğinden *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının izolasyonu, farklı DNA markörleri ile genotipik karakterizasyonu ve popülasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. İzole edilen 72 adet endojen mayanın 58 tanesi *S. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır. Tür içi genetik varyasyonun belirlenmesinde SCoT 13 primeri, iPBS ve ISSR primerlerine göre daha faydalı sonuçlar vermiştir. Popülasyonlar arasındaki mesafe arttıkça genetik uzaklık dereceleri de artış göstermiştir ($R=0.74$). Popülasyonlar arası (%16) ve popülasyonlar içindeki (%84) genetik varyasyon dereceleri istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). UPGMA dendrogramı üzerinde suşlar birçok alt gruba ayrılmış olup STRUCTURE analizine göre anlamlı alt grup sayısı iki çıkmıştır ($\Delta K=2$). UPGMA ve PCoA'ya göre kümelenme suşların izole edildiği bölgelere göre gerçekleşmemiş olup rastgele dağılım gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ekşi hamur, mayalar, moleküler karakterizasyon, DNA markörleri

**ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, AND POPULATION
ANALYSIS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE FROM SOURDOUGH
COLLECTED FROM DIFFERENT PROVINCES**

ABSTRACT

It was aimed to isolate *Saccharomyces cerevisiae* strains from 18 traditional sourdough samples collected from 3 different provinces (Aksaray, Niğde, and Konya), and to conduct the genotypic characterization and population analyses using different DNA markers. In total, 58 of the 72 endogenous yeasts were identified as *S. cerevisiae*. In determining intraspecific genetic variation, SCoT 13 primer gave more useful results than iPBS and ISSR primers. As the distance between populations increased, the degree of genetic distance also increased ($R = 0.74$). The degree of genetic variation between populations (16%) and within populations (84%) was found to be statistically significant (P

*Bu çalışma Nilgün Koçak'ın yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. This paper was produced from MSc thesis study of Nilgün Koçak

**Yazışmadan sorumlu yazar/Corresponding author

✉: nilgunkocak6@gmail.com

☎: 0 (382) 217 2207

Nilgün Koçak; ORCID: 0000-0002-2136-786X

Mustafa Ardıç; ORCID: 0000-0002-4193-1990

<0.001). Strains were divided into many subgroups on the UPGMA dendrogram, and according to STRUCTURE analysis, the number of significant subgroups was two ($\Delta K = 2$). According to UPGMA and PCoA, clustering did not occur according to the regions where the strains were isolated, and random distribution was observed.

Keywords: Sourdough, yeasts, molecular characterization, DNA markers

GİRİŞ

Ekşi hamur, un ve su karışımının spontan bir şekilde ortamda bulunan mikroorganizmalar tarafından fermantasyonu sonucunda oluşur. Fermantasyonu sağlayan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri (LAB) ile mayalardır. Bu mikroorganizmalar havadan, sudan ve undan gelmektedir (De Vuyst ve Neysens, 2005). Ekşi hamurda bulunan mikroorganizmaların üç temel görevi vardır. Bunlar ortamın asitliğini artırmak (LAB), aroma oluşumu (mayalar ve LAB) ve hamurun kabarması (mayalar ve LAB) olarak bildirilmiştir (De Vuyst vd., 2016). Mayalar temel olarak CO₂ üreterek hamurun kabarmasından sorumludurlar. Ayrıca, aldehit ve asetonlar gibi birçok aroma maddeleri de üreterek ekmeğin tat ve aromasına katkıda bulunurlar (Birch vd., 2013). Ekmekte meydana gelen bir takım yapısal problemler de sentezlenen glutatyon, gliserol ve pirüvik asit gibi bileşenler ile glüten ağını geliştirmek sureti ile iyileşmektedir (Lampignano vd., 2013).

Tip I ekşi hamur olarak da nitelendirilen geleneksel ekşi hamurdan en çok izole edilen maya türünün *Saccharomyces cerevisiae* olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Gül vd., 2005; Arıcı vd., 2018; Perricone vd., 2014; Yang vd., 2020). *Saccharomyces cerevisiae* suşlarından beklenen en önemli teknolojik özellik ekmeği hızlı bir şekilde kabartmasıdır. Bunun da mikroorganizmaların genetik farklılaşmalarından ileri geldiği bildirilmiştir (Huys vd., 2012). *S. cerevisiae* suşları arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinin farklı teknolojik özelliklere sahip suşların tespitinde kilit bir rol oynayacağı rapor edilmiştir (Aydın vd., 2023). Bu bağlamda farklı DNA markör yöntemleri DNA parmak izi üretmek suretiyle mayaların genetik yapısını incelemeye birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP; Esteve-Zarzoso vd., 1999), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD; Yang vd.,

2020), Simple Sequence Repeats (SSR; Börlin vd., 2020), Inter Simple Sequence Repeats (ISSR; Liu vd., 2021), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP; Gallego vd., 2005), Inter-primer binding site (iPBS; Aydın vd., 2020) ve Start Codon Targeted (SCoT; Aydın vd., 2022a) yer almaktadır.

Her bir markör tekniğinin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte uygun yöntemin seçimi çoğunlukla çalışılacak mikroorganizma türüne ve laboratuvar alt yapısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Doğru yöntemin seçimi genetik olarak farklı uzaklığa sahip suşların belirlenmesinde önem arz etmektedir (Yeken vd., 2022). Günümüzde birçok mikroorganizmada sıklıkla kullanılan RFLP yönteminin tür içi genetik varyasyonu belirlemede yetersiz düzeyde olması ve bazı maya türlerini birbirinden ayırmadaki yetersizliği, RAPD yönteminin ise düşük bağlanma sıcaklığı ve kısa primer boyundan dolayı tekrar edilebilirliğinin düşük olması her iki yöntemin de kullanımını kısıtlayan en büyük unsurlardır (Esteve-Zarzoso vd., 1999; Pathania vd., 2010).

ISSR markörleri tekrarlayan oligonükleotid motifleri arasında kalan bölgeyi hedef almaktadır. Bu teknik; RFLP, RAPD gibi tekniklerle kıyaslandığında, uygulaması kolay ve ekonomik olması ile yüksek polimorfizm göstermesinden dolayı farklı maya türlerinin türler arası ve tür içi genetik varyasyonunu belirlemek suretiyle kullanılmaktadır (Gallardo vd., 2014; Liu vd., 2021). Genomun bir yerinden diğer yerine kopyala yapıştır modeli ile çalışan ve genom boyunun uzamasına yol açan retrotranspozonlar genetik varyasyonun oluşmasında kritik bir öneme sahiptir (Feschotte ve Pritham, 2007). Retrotranspozon temelli olan universal iPBS markörleri de genetik varyasyonun belirlenmesinde oldukça faydalı bir araç olarak nitelendirilmektedir (Kalendar vd., 2010). Son yıllarda mayaların tanımlanması ile türler arası ve

tür içi genetik varyasyonun belirlenmesinde oldukça faydalı bilgiler sağladığı da bildirilmiştir (Aydın vd., 2020; Aydın vd., 2022b; Kahve vd., 2022; Kahve, 2023). Son olarak, SCoT markörleri DNA başlangıç kodonunun (ATG) etrafındaki bölgeyi hedef almaktadır. Bu yöntem ilk olarak Collard ve Mackill (2009) tarafından bitki genomu baz alınarak tasarlanmış olmasına karşın aralarında maya ve küf türlerinin de bulunduğu birçok mikroorganizma için kullanılmıştır (Aydın vd., 2022a; Palacıoğlu vd., 2023). Mevcut SCoT markörleri maya genomu baz alınarak tasarlanmadığından dolayı spesifik bağlantılar gerçekleşmemektedir. Ancak yüksek bağlanma sıcaklıkları ile uzun primer boyu sayesinde tekrar edilebilirliği çok yüksektir (Tikendra vd., 2021).

Mevcut literatür incelendiğinde DNA markörlerinin farklı popülasyonlardaki genetik varyasyonu belirleme faydalı sonuçlar verebileceği görülmektedir (Börlin vd., 2020; Drumonde-Neves vd., 2018). İç Anadolu bölgesindeki farklı illerden toplanan ekşi hamurlardan izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının yüksek genetik varyasyon gösterdiği bildirilmekle birlikte (Aydın vd., 2022b; 2023) farklı markör sistemlerini genetik varyasyonu belirlemede bir arada kullanımına ilişkin İç Anadolu popülasyonu ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada; Aksaray, Niğde ve Konya illerinden toplanan Tip I ekşi hamur örneklerinden *S. cerevisiae* suşlarının izolasyonu ile ISSR, iPBS ve SCoT markörlerinin bir arada kullanılması sureti ile genetik karakterizasyonun ve popülasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Ekşi hamur temini

Toplam 18 adet Tip I ekşi hamur örneği Aksaray ($n=6$), Konya ($n=6$) ve Niğde ($n=6$) illerinden temin edilmiştir. Numuneler soğuk zincir altında Aksaray Üniversitesi Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarına getirilerek ivedi bir şekilde analize alınmıştır.

LAB ve mayaların sayımı

Toplam 10 g ekşi hamur örneği 90 mL %0.85 oranında NaCl içeren steril fizyolojik tuzlu su içerisinde homojenize edilerek seri dilüsyonlar

hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan paralelli ve tekerrürlü bir şekilde yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Mayalar için Chloramphenicol Glucose Agar (CGA; Biokar, Fransa), LAB için de 100 mg/L oranında sikloheksimid içeren (Sigma, USA) MRS Agar (Biokar, Fransa) kullanılmıştır. İnkübasyon koşulları mayalar için aerobik şartlar altında 25 °C'de 48-72 saat, LAB için ise anaerobik olarak 28 °C'de 48-72 saat olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda her iki mikroorganizma grubu da sayılarak sonuçlar log KOB/g olarak ifade edilmiştir. Elde edilen LAB sayısı (KOB/g) maya sayısına (KOB/g) bölünerek LAB/maya oranı da hesaplanmıştır.

Mayaların izolasyonu

Sayımı yapılan petrilerden *S. cerevisiae* olduğu düşünülen koloniler rastgele seçilerek Sabouraud Dextrose Broth (SDB; Biokar, Fransa) besiyerine alınmıştır. Bir gece geliştirilen koloniler CGA besiyerine sürülmüştür. İnkübasyon sonucu elde edilen tek koloniler alınarak yatık agarlarda +4 °C'de depolanmıştır.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda Aydın vd. (2022a) tarafından önerilen yöntem minör modifikasyonlar ile kullanılmıştır. Yatık agarda stok olarak muhafaza edilen mayalar SDB kullanılarak aktifleştirilmiş olup, CGA besiyerine sürme yöntemi ile ekilmiştir. CGA üzerinde gelişen koloniler steril bir büstüri yardımı ile kazınarak içerisinde 200 µL'lik ddH₂O bulunan 2.0 mL'lik eppendorf tüplere aktararak 90 °C'de yarım saat boyunca bekletilmiştir. Üzerine 650 µL ekstraksiyon çözültüsü (200 mM Tris-HCl pH: 8.5, 25 mM NaCl, 25 mM EDTA, %0.5 SDS) eklenerek 65 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 650 µL kloroform izoamil alkol (24:1, v/v, AppliChem, Almanya) eklenerek 14000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Oluşan üst fazdan 500 µL alınarak üzerine 500 µL izopropanol (Merck, Almanya) eklenerek karışım 14000 rpm'de 20 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Oluşan pellet %70'lik etanol ile yıkanarak pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pelletin üzerine 50 µL ddH₂O eklenerek -20 °C'de depolamaya alınmıştır. DNA konsantrasyon tayini bir nanospektrofotometre

(DS-11 FX, DeNovix Inc., Wilmington, ABD) yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae suşlarının tanımlanması/doğrulaması

S. cerevisiae izolatlarının moleküler doğrulaması, türe özgü SC1 (5' – AAC GGT GAG AGA TTT CTG TGC – 3') ve SC2 (5' – AGC TGG CAG TAT TCC CAC AG – 3') primer çiftlerinden yararlanılarak yapılmıştır (Josepa vd., 2000). Pozitif kontrol olarak GenBank'ta MK358173 erişim numarasıyla saklanan *S. cerevisiae* suşu 105-E2 kullanılmıştır. PCR reaksiyonları, 1x PCR reaksiyon tamponu, 0,4 µM SC1 ve SC2 primerleri, her birinden 200 µM dNTP, 20 ng şablon DNA ve 1,5 birim Ampliçon TEMPase Hot Start DNA polimeraz (Berntsen, Rdovre, Danimarka). PCR amplifikasyonu, 94 °C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonu, daha sonra ise 94 °C'de 30 saniyelik denatüre edilerek 30 döngü, 50 °C'de 30 saniyelik tavlama, 72 °C'de 1 dakikalık uzatma ve 72 °C'de 7 dakikalık son uzatmadan oluşmuştur. Amplikonlar %1.4 agaroz jel üzerinde analiz edilmiş ve etidyum bromür ile boyanmıştır. Ardından bir UV altında jel görüntüleme sistemi (G:BOX F3, Syngene, Cambridge, İngiltere) kullanılarak görselleştirilmiştir.

Moleküler markör analizleri

Çalışmada farklı genetik uzalığa sahip *S. cerevisiae* izolatlarının belirlenmesinde etkili olduğu bildirilen iki dejenere ISSR primeri (ISSR-4; 5'-HVHTGTGTGTGTGTG-3', ISSR-7; 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGY-3') (Aydın vd., 2023), bir iPBS primeri (iPBS2078; 5'-GCGGAGTCGCCA-3') (Aydın vd., 2022b) ve bir SCoT primeri (SCoT13; 5'-ACGACATGGCGACCATCG-3') (Aydın vd., 2022a) kullanılmıştır. Primerlere ilişkin detaylar Çizelge 1'de sunulmuştur. PCR amplifikasyonları 25 µL reaksiyon karışımı içerisinde gerçekleştirilmiş olup karışım 25 ng DNA, 1 x MgCl₂, 0.24 mM dNTPs, 0.8 µM primer ve 1 ünite Dream Taq polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) içermiştir. PCR amplifikasyonlarında ISSR, iPBS ve SCoT markörleri için sırasıyla Aydın vd. (2023), Aydın vd. (2022b) ve Aydın vd. (2022a) tarafından önerilen koşullar kullanılmıştır. PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyanmıştır. Görüntüleme için bir görüntüleme cihazı (G:BOX F3, Syngene, Cambridge, İngiltere) kullanılmıştır. Farklı *S. cerevisiae* suşlarının iPBS-2078 primeri ile elde edilen bant desenleri Şekil 1'de sunulmuştur.

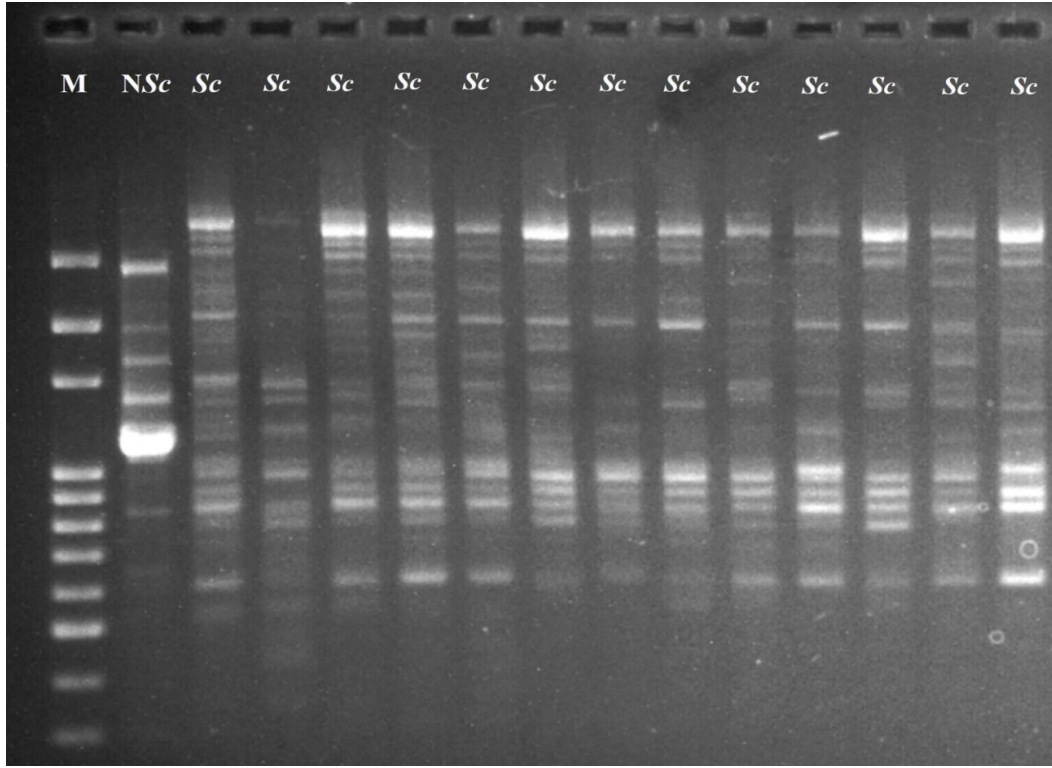
Çizelge 1. Kullanılan primerlere ilişkin bilgiler.

Table 1. Information on the primers used.

Primer	Dizilim (3'-5')	TB	PB	PPY	PIC	RP
ISSR-4	HVHTGTGTGTGTGTG	17	15	88.23	0.31	3.62
ISSR-7	AGAGAGAGAGAGAGAGY	14	12	85.71	0.34	3.97
iPBS-2078	GCGGAGTCGCCA	11	10	90.91	0.23	2.68
SCoT-13	ACGACATGGCGACCATCG	18	17	94.44	0.39	4.42

TB: toplam bant, PB: polimorfik bant, PPY: polimorfik bant yüzdesi, PIC: polimorfik bilgi indeksi, RP: çözme gücü.

TB: total band, PB: polymorphic band, PPY: percentage of polymorphic band, PIC: polymorphic information index, RP: resolving power.



Şekil 1. Farklı *S. cerevisiae* suşlarının iPBS-2078 primeri ile elde edilen bant desenleri. M: Marker, NSc: Non-*cerevisiae*, Sc: *S. cerevisiae*.

Figure 1. Band patterns obtained with iPBS-2078 primer of different *S. cerevisiae* strains. M: Marker, NSc: Non-*cerevisiae*, Sc: *S. cerevisiae*.

İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler PCR bantlarının var oluş pozisyonuna göre var (1) ve yok (0) olarak kodlanarak ikili bir veri matrisi oluşturulmuştur. İlk olarak kullanılan markörlerin kullanılabilirliğini test etmek için çözme gücü (RP) ve polimorfik bilgi indeksi (PIC) değerleri hesaplanmıştır. Markörlerin PIC değeri, $PIC=2f(1-f)$ formülü kullanılarak hesaplanmış olup f değeri amplifiye edilen allelin frekansını ifade etmektedir (Roldan-Ruiz vd., 2000). RP değerini hesaplamak için ise bant bilgisi $(I_b)=1 - (2 \times 10.5^{-p})$ ile hesaplanmıştır. Burada p değeri maya izolatlarının oranını temsil etmektedir. Son olarak her bir primer için elde edilen I_b toplamı (ΣI_b) hesaplanmıştır (Prevost ve Wilkinson, 1999).

Elde edilen ikili veri matrisi primerlerin paylaşılan alel oranına dayanan Jaccard'ın benzerlik katsayısı kullanılarak genetik benzerlik matrisine çevrilmiştir. R paket programı ile ağırlıklı olmayan

aritmetik ortalama eş grup metodu (UPGMA) analizi yapılarak dendrogram elde edilmiştir (Oksanen vd., 2017; R studio Team, 2020).

Tür içi genetik varyasyonun belirlenmesi amacı ile farklı popülasyonlara ilişkin gruplar belirlenmiştir. Tür içi genetik varyasyonun belirlenmesi amacıyla POPGENE v1.32 istatistik yazılımı kullanılmış olup gözlenen aleller sayısı, etkili allel sayısı, Nei'nin gen çeşitliliği ve Shannon'un bilgi indeksi değerleri belirlenmiştir (Yeh vd., 1999). Moleküler varyans analizi (AMOVA) ise GenA1EX 6.5 kullanılarak yapılmıştır (Peakall ve Smouse 2012).

Oluşan anlamlı alt popülasyon sayısının (ΔK) belirlenmesi için ikili veri matrisi Structure v2.3.4 ile analiz edilmiştir. Varsayımsal küme aralığı 1-10 arası seçilmiş olup analiz 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Burn-in-time ve MCMC verileri de 100.000'e 100.000 olarak ayarlanmış olup sonuçlar STRUCTURE HARVESTER v.

0.6.94 ara yüzü ile işlenerek ΔK değeri hesaplanmıştır (Earl, 2012; Evanno vd., 2005; Pritchard vd., 2020).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada 18 adet ekşi hamur numunesine ait LAB ve maya sayım sonuçları Çizelge 2'de

gösterilmiştir. Buna göre LAB sayısı 7.41 ± 0.35 ile 9.23 ± 0.20 log KOB/g arasında değişirken ortalama değerin 8.37 ± 0.58 log KOB/g olduğu saptanmıştır. Maya sayım sonuçlarının ise 5.27 ± 0.09 ile 7.60 ± 0.15 log KOB/g arasında değiştiği ve ortalama değerin 6.33 ± 0.78 log KOB/g olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Ekşi hamur numunelerine ilişkin mikrobiyolojik sayım sonuçları.

Table 2. Microbiological count results for sourdough samples.

No	LAB (Log KOB/g)	Maya (Log KOB/g)	LAB/Maya
N1	8.76 ± 0.18	6.78 ± 0.08	97
N2	7.69 ± 0.23	5.44 ± 0.17	178
N3	9.07 ± 0.17	7.27 ± 0.56	63
N4	8.25 ± 0.31	7.00 ± 0.15	18
N5	9.04 ± 0.15	7.60 ± 0.15	27
N6	9.23 ± 0.20	7.17 ± 0.28	113
N7	8.00 ± 0.14	5.95 ± 0.07	111
N8	7.95 ± 0.05	5.44 ± 0.14	321
N9	9.14 ± 0.19	6.77 ± 0.05	233
N10	8.30 ± 0.46	5.71 ± 0.09	384
N11	7.48 ± 0.37	5.39 ± 0.23	120
N12	8.88 ± 0.10	6.95 ± 0.15	84
N13	8.57 ± 0.48	5.27 ± 0.09	1995
N14	7.41 ± 0.35	5.40 ± 0.16	101
N15	7.58 ± 0.27	6.14 ± 0.41	27
N16	8.79 ± 0.09	5.89 ± 0.25	794
N17	8.08 ± 0.30	6.67 ± 0.13	25
N18	8.50 ± 0.07	7.14 ± 0.34	22

Tip 1 ekşi hamurlarda LAB/Maya oranının 1000:1-100:1 olması beklenmektedir. Bu oranlar Tip I ekşi hamurların analizinde belirleyici rol oynamakla birlikte fermantasyon koşullarına bağlı olarak 10:1 civarına kadar düştüğü bilinmektedir (Arora vd., 2021). Yapılan bu çalışmada ise, ekşi hamur numunelerinin LAB ve maya sayılarının oranları incelendiğinde, oranların 10 örnekte 100/1'den yüksek olduğu 8 örnekte ise bu değer altında kaldığı görülmektedir. Bu oranın en düşük 18/1, en yüksek 1995/1 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Türkiye'de ve diğer ülkelerde üretilen ekşi hamurlara ilişkin sayım sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Arıcı vd., 2018; Aydın vd., 2022a; Lhomme vd., 2015; Minervini vd., 2012; Zhang vd., 2011).

Analize alınan 18 adet geleneksel ekşi hamur örneğinden toplamda 72 adet maya saflaştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* türüne spesifik primer çiftinin kullanılması sonucunda bunlardan 58 tanesinin *S. cerevisiae* türü olduğu tespit edilmiştir. PCR ürünü *S. cerevisiae* izolatları için yaklaşık 1170-1180 bp arasında oluşmuştur. İki maya suşunda ise birden fazla noktada spesifik olmayan bağlantılar gerçekleşmiştir. Josepa vd. (2000) tarafından bildirildiği üzere bant vermeyen ve spesifik olmayan bağlantı gerçekleşen suşlar non-*cerevisiae* olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca doğrulama bu çalışma kapsamında kullanılan farklı markörler ile de yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak sekans sonucu bulunan ve NCBI Genbank veri sisteminde MK358173 erişim numarası ile yer alan *S. cerevisiae* 105-E2 suşu kullanılmıştır.

Böylece toplam maya mikrobiyotasının %80.55'inin *S. cerevisiae* tarafından oluştuğu tespit edilmiştir. Çalışma sadece *S. cerevisiae* suşlarının moleküler karakterizasyonu ile popülasyon analizlerini içerdiğinden non-*cerevisiae* türleri çalışmanın diğer kısmında değerlendirilmemiştir. Tüm örneklerden *S. cerevisiae* suşu izole edilmiştir. Diğer yandan, 7 farklı örnekten (N2, N5, N7, N8, N11, N13, N16) izole edilen toplam 14 adet maya suşu non-*cerevisiae* olarak tanımlanmıştır.

Tip I ekşi hamur geleneksel yollarla, starter kültür kullanılmadan belirli aralıklarla pasajlanarak elde edilen un ve su karışımıdır. Geleneksel olarak üretilen ekşi hamurlar un, su veya diğer katkı maddelerinden gelen mikroorganizmalar ile fermente olmaktadır. Ancak fırıncılık ürünlerinin yapıldığı ortamlarda *S. cerevisiae* suşlarının bulunabileceği, bunların da ekşi hamuru kontamine edebileceği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Minervini vd., 2015). Ancak *S. cerevisiae* suşunun birçok ekşi hamurda dominant olarak bulunmasının tek sebebi bu da değildir. Vrancken vd. (2010) tarafından bildirildiği üzere fırıncılık ürünlerinin üretilmediği laboratuvar ortamlarında bile *S. cerevisiae* suşlarının izole edilebileceğini, özellikle kullanılan un türünün bunda ana rol oynayabileceğini bildirmiştir. Bu yaklaşım birçok araştırmacı grubu tarafından da desteklenmiştir (De Vuyst vd., 2016; Vernocchi vd., 2004). Hem Türkiye hem de yurt dışında yapılan çalışmalar sonucunda da *S.*

cerevisiae ekşi hamur mikrobiyotasında baskın tür olduğu bildirilmiştir (Aydın vd., 2022a; Boyacı-Gündüz ve Erten, 2020; Gül vd., 2005; Lhomme vd., 2015; Yağmur vd., 2016; Minervini vd., 2012).

Toplam 18 adet ekşi hamur örneğinden izole edilen 58 adet *S. cerevisiae* suşu örneklerin ilişkili olduğu bölgelere göre gruplandırılmıştır. Buna göre Aksaray'dan 20, Niğde'den 19 ve Konya'dan 19 olmak üzere toplam 3 popülasyon oluşturulmuştur. Veri matrisi GenAlex formatına uygun olarak düzenlenerek başta bölgelere göre alleller sayısı, etkili alleller sayısı, Nei'nin (1973) gen çeşitliliği ve Shannon bilgi indeksi hesaplanmış olup tüm değerler Çizelge 3'te verilmiştir. Farklı DNA sistemleri kullanılarak elde edilen değerlerin Aksaray ve Niğde popülasyonları için Aydın vd. (2022b) tarafından bildirilen değerlerden yüksek olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar farklı şaraplık üzüm popülasyonlarından izole edilen *S. cerevisiae* izolatları için de bildirilmiştir (Tello vd., 2012). Elde edilen bulgular ekşi hamurdan izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının yakın popülasyonlarda bile farklı genetik yapı sergileyebileceğini göstermiştir. Popülasyonlar kendi içinde değerlendirildiğinde ise Aksaray ve Niğde illerinden toplanan ekşi hamurlara ilişkin *S. cerevisiae* suşlarında genetik farklılaşmanın daha yüksek olduğu, Konya'dan toplanan izolatlarda ise daha sınırlı bir genetik varyasyon tespit edildiği görülmektedir.

Çizelge 3. Farklı popülasyonlara ilişkin genetik varyasyon verileri.

Table 3. Genetic variation data for different populations.

Popülasyon	Na*	Ne	I	h	PL (%)
Aksaray (n=20)	1.625±0.067	1.445±0.044	0.375±0.032	0.254±0.023	68.75
Niğde (n=19)	1.563±0.073	1.414±0.045	0.350±0.032	0.236±0.023	65.00
Konya (n=19)	1.325±0.085	1.251±0.036	0.240±0.029	0.156±0.20	50.00
Toplam (n=58)	1.504±0.044	1.370±0.025	0.322±0.018	0.215±0.013	61.25±5.73

*Na: Alleller sayısı, Ne: Etkili alleller sayısı, I: Shannon Bilgi indeksi, h: Nei'nin gen çeşitliliği, PL: Polimorfik lokus yüzdesi

*Na: Number of alleles, Ne: Number of effective alleles, I: Shannon Information index, h: Gene diversity of Nei, PL: Percentage of polymorphic locus

Popülasyonların genetik yapısının birbirlerine olan yakınlığı GenAlEx ile incelenmiş olup sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir. Buna göre birbirlerine daha yakın olan iller Nei'nin genetik benzerliğine yakınlık indeksinde de daha yakın olarak gözlemlenmiştir. Örneğin birbirine uzaklık olarak en yakın ve ekolojik olarak daha benzer olan Aksaray ve Niğde popülasyonları birbirlerine daha yakın (0.968), birbirlerine en uzak ve ekolojik

olarak daha farklı olan Niğde ve Konya popülasyonları da genetik olarak en uzak (0.922) popülasyonlar olmuştur. Popülasyonların birbirlerine olan mesafesi ve genetik yakınlığı GenAlEx programında yer alan Mantel testi ile de test edilmiş olup popülasyonlar arasındaki mesafe ile genetik yakınlık arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($R=0.74$).

Çizelge 4. Popülasyonların Nei'ye göre genetik benzerlik matrisi.
Table 4. Genetic similarity matrix of populations according to Nei.

Popülasyon	Aksaray	Niğde	Konya
Aksaray	1.000		
Niğde	0.968	1.000	
Konya	0.922	0.915	1.000

Farklı popülasyonların moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucuna göre belirlenen genetik farklılığın %16'sı popülasyonlar arasında bulunurken %84'ü popülasyonlar içinde bulunmuştur (Çizelge 5). Popülasyonlar arası ve popülasyon içi tespit edilen genetik varyasyon önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). Bu yüksek varyasyon oranı suşlar arasındaki varyasyon derecesini gösteren F_{ST} değeri (0.164) ile de tutarlıdır. Coğrafi ve ekolojik farklılıkların farklı coğrafi kökenlerden izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının genetik yapısında önemli roller oynamış olabileceğini düşündürmektedir. Bu genetik farklılık sadece genetik farklılaşmanın belirlenmesinde etkili değildir. Farklı genetik uzaklığa sahip *S. cerevisiae* suşlarının seçiminde de ön eleme aracı olarak kullanılabilir. Diğer bir ifade

ile, tüm izolatların teknolojik özelliklerinin belirlenmesi yerine farklı genetik uzaklığa sahip suşların tümünü temsilen teknolojik özelliklerinin belirlenmesi farklı araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilir olmuştur (Yang vd., 2020). Farklı genetik uzaklığa sahip suşlar ile teknolojik özellikler arasındaki ilişki de istatistik olarak değerlendirilebilmektedir. Aydın vd. (2023), ISSR markörleri ile karakterize ettiği mayalarda spesifik bölgelerdeki polimorfik yapı ile fermantasyon kapasitelerinin yüksek korelasyon içinde olduğunu rapor etmiştir. Bu gibi durumlarda SCAR (Sequence-Characterized Amplified Regions) yaklaşımı ile direkt ilgili teknolojik özelliğe sahip suşların belirlenebilmesi mümkün olmaktadır (Luan vd., 2014).

Çizelge 5. Popülasyonların AMOVA sonucu.
Table 5. AMOVA result of populations.

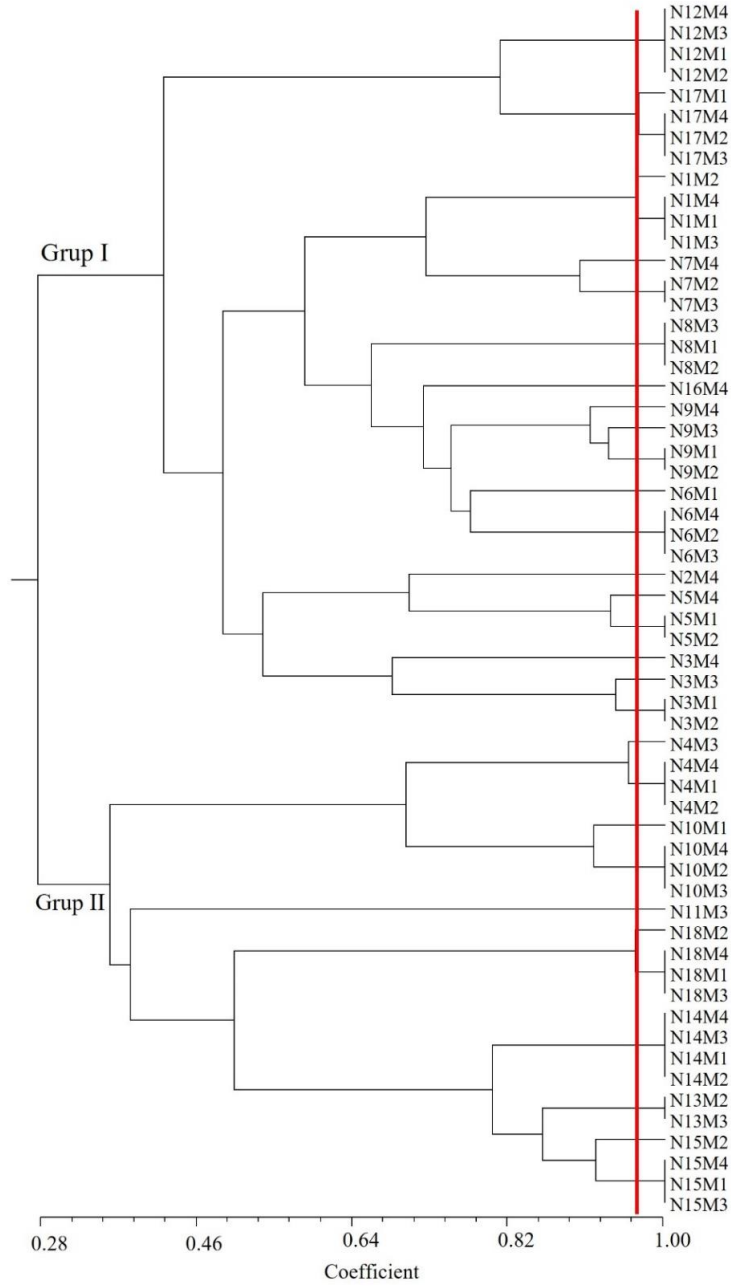
Kaynak	b.d*	KT	OK	TV	%	F_{ST}	P
Pop. arası	2	90.315	45.158	1.848	16		
Pop. içi	55	518.805	9.433	9.433	84	0.164	0.001
Toplam	57	609.121		11.281	100		

*b.d: Bağımsızlık derecesi, KT: Karelerin toplamı, OK: Ortalama kare, TV: Tahmini varyans, F_{ST} : F-statistics, P: Anlamlılık düzeyi

*b.d: Degree of independence, KT: Sum of squares, OK: Mean square, TV: Estimated variance, F_{ST} : F-statistics, P: Significance level

UPGMA dendrogramı toplamda 58 *S. cerevisiae* suşunu iki ana gruba ayırmış olup her bir grup da kendi içinde iki majör gruba ayrılmaktadır (Şekil 2). En yüksek ayırım gücü 0.97 değerinde gerçekleşmiştir. Genetik karakterizasyonun toplamda 4 primer ile yapılması yüksek ayırım derecesine sahip sonuçlar elde edilmesini

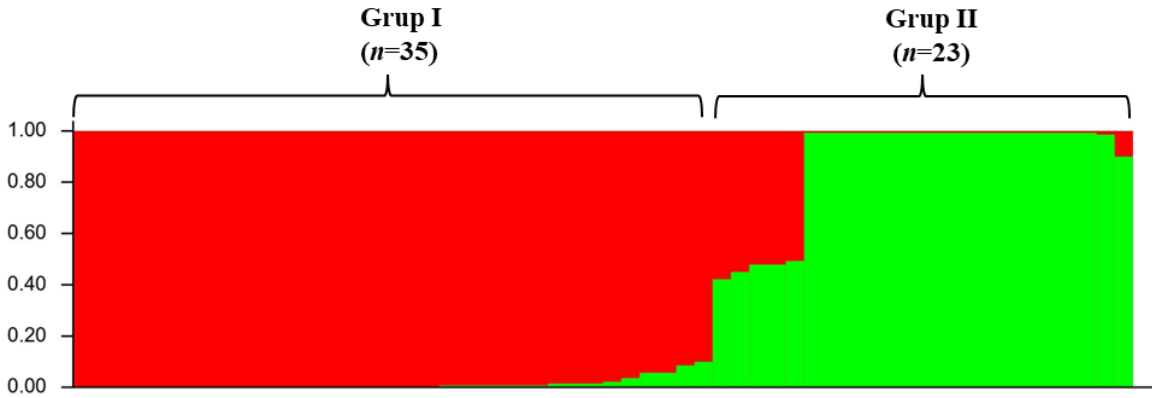
sağlamıştır. Benzer bir ayırım gücü ekşi hamurdan izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının RAPD ve ISSR primerleri ile karakterize edilmesi ile de elde edilmiştir (Yang vd., 2020; Aydın vd., 2023). Ayrıca, izolatların izole edildiği coğrafi bölgelere göre ayrılmadığı da belirlenmiştir.



Şekil 2. UPGMA dendrogramı.
Figure 2. UPGMA dendrogram.

Anlamalı alt popülasyonların sayısı (ΔK) Bayesian kümeleme modeli ile STRUCTURE datalarının STRUCTURE HARVESTER ara yüzü ile işlenmesi ile test edilmiş olup $\Delta K=2$ çıkmıştır. Grupları temsil eden alanlar Şekil 3'te verilmiştir. Elde edilen gruplar UPGMA ile uyumlu olup

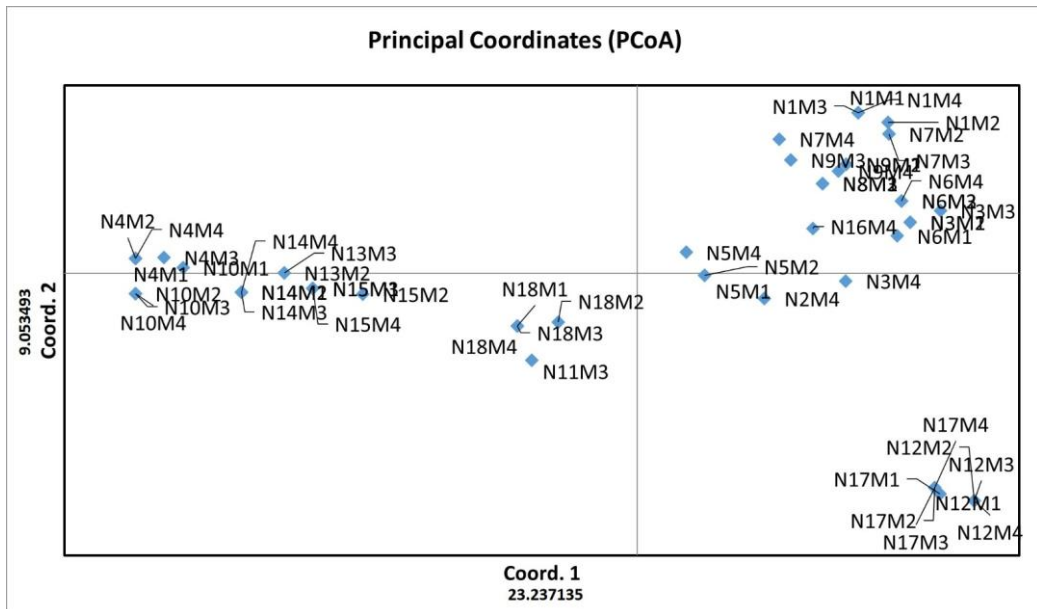
Grup I 35, Grup II ise 23 *S. cerevisiae* suşu içermektedir. Ancak Grup II'de yer alan 5 izolat (N11M3, N18M1;4) her iki gruba da benzer bir yakınlık göstermiştir. Bu izolatlardan renk haritasında hem yeşil hem de kırmızı renk ile ifade edildiği görülmektedir.



Şekil 3. STRUCTURE analizine göre oluşan gruplar ($\Delta K=2$).
Figure 3. Groups formed according to STRUCTURE analysis ($\Delta K=2$).

İzolatların PCoA analiz sonuçları dikkate alındığında UPGMA dendrogramı ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Şekil 4). PCoA dendrogramı incelendiğinde grafiğin sağ kısmında toplam 35 adet suşun yer aldığı Grup I, sol tarafında ise 23 izolatin yer aldığı Grup II

bulunmaktadır. STRUCTURE sonuçlarına göre out-group olarak ifade edilen ve her iki gruba da yakın mesafede sonuç veren 5 adet suşun ise koordinat düzleminde her iki grubun ortasında yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4. İzolatların PCoA dendrogramı.
Figure 4. PCoA dendrogram of isolates.

SONUÇ

Sonuç olarak, 58 adet *S. cerevisiae* suşunun genetik varyasyonu ve popülasyon analizleri ISSR, İPBS ve SCoT primerleri kullanılarak incelenmiştir. Bulgular, ISSR, İPBS ve SCoT primerlerinin, farklı lokasyonlardan elde edilen *S. cerevisiae* suşlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmede bir arada kullanılabileceğini ve faydalı sonuçlar ortaya koyduğunu göstermiştir. Bu markör sistemlerinin bir arada kullanımının sadece popülasyonların genetik yapısını incelemeye değil, teknolojik özelliklerin belirlenmesinden önce de bir ön eleme aracı olarak kullanılmak suretiyle iş yükü ve maliyeti azaltmada önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, tür içi farklı polimorfik suşlar ile teknolojik özellikler arasındaki farkın istatistikî açıdan değerlendirilmesi ile rutin analizlerde ilgili teknolojik özelliğe sahip suşların direkt olarak DNA markörü ile belirlenmesi üstün suşların tespiti için önemli bir kilometre taşı olacaktır. İleriki çalışmalarda teknolojik özellikler ile polimorfik suşlar arasındaki ilişki incelenecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Yazarlar tüm süreç boyunca eşit düzeyde katkı sağlamıştır.

KAYNAKÇA

Arıcı, M., Özülcü, G., Yıldırım, R. M., Sağdıç, O., Durak, M. Z. (2018). Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. *Food science and biotechnology*, 27, 499-508. doi:10.1007/s10068-017-0282-0.

Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83, doi: 10.1016/j.tifs.2020.12.008

Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2020). The utility of iPBS retrotransposons markers to analyze genetic variation in yeast. *International*

Journal of Food Microbiology, 325, 108647, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108647

Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2022a). Start Codon Targeted (SCoT) markers for the assessment of genetic diversity in yeast isolated from Turkish sourdough. *Food Microbiology*, 107, 104081, doi: 10.1016/j.fm.2022.104081

Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2022b). Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Turkish sourdough by iPBS-retrotransposons markers. *Archives of Microbiology*, 204(12), 693, doi: 10.1007/s00203-022-03313-x

Aydın, F., Günen, T. U., Kahve, H. İ., Güler, E., Özer, G., Aktepe, Y., Çakır, İ. (2023). Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* from Sourdough. *Fermentation*, 9(4), 329, doi: 10.3390/fermentation9040329.

Birch, A. N., Petersen, M. A., Arneborg, N., Hansen, Å. S. (2013). Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Research International*, 52(1), 160-166, doi: 10.1016/j.foodres.2013.03.011

Boyacı-Gündüz, C. P., Erten, H. (2020). Predominant yeasts in the sourdoughs collected from some parts of Turkey. *Yeast*, 37(9-10), 449-466, doi: 10.1002/yea.3500

Börnin, M., Claisse, O., Albertin, W., Salin, F., Legras, J. L., Masneuf-Pomarede, I. (2020). Quantifying the effect of human practices on *S. cerevisiae* vineyard metapopulation diversity. *Scientific Reports*, 10(1), 16214, doi: 10.1038/s41598-020-73279-7

Collard, B. C., Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 86-93, doi: 10.1007/s11105-008-0060-5

De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56, doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.012

- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 26-34, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018
- Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Vieira, E., Mendes, I., Lima, T., Schuller, D., Pais, C. (2018). Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* populations from vineyards of the Azores Archipelago: Geography vs Ecology. *Food Microbiology*, 74, 151-162, doi: 10.1016/j.fm.2018.03.017
- Earl, D. A., VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361, doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, 49(1), 329-337, doi: 10.1099/00207713-49-1-329
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620, doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Feschotte, C., Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*, 41, 331-368. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090448
- Gallardo, G., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Benito, M. J., Córdoba, M. G., Pérez-Nevado, F., Martín, A. (2014). Application of ISSR-PCR for rapid strain typing of *Debaryomyces hansenii* isolated from dry-cured Iberian ham. *Food Microbiology*, 42, 205-211. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.022
- Gallego, F. J., Perez, M. A., Núñez, Y., Hidalgo, P. (2005). Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 22(6), 561-568, doi: 10.1016/j.fm.2004.11.019
- Gül, H., Özçelik, S., Sağdıç, O., Certel, M. (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*, 40(2), 691-697, doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.044
- Huys, G., Daniel, H. M., De Vuyst, L. (2012). Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria. In Handbook on sourdough biotechnology (pp. 105-154). New York, NY: Springer US. doi: 10.1007/978-1-4614-5425-0_5
- Josepa, S., Guillamon, J. M., Cano, J. (2000). PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 193(2), 255-259, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x
- Kahve, H. I., Akbulut, M., Coklar, H. (2022). Identification and technological characterization of endogenous yeast isolated from fermented black carrot juice, shalgam. *LWT-Food Science and Technology*, 154, 112823, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112823
- Kahve, H. İ. (2023). In Vitro Evaluation of the Technological and Probiotic Potential of *Pichia kudriavzevii* Strains Isolated from Traditional Fermented Foods. *Current Microbiology*, 80(12), 379, doi: 10.1007/s00284-023-03505-8
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., Schulman, A. H. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 1419-1430, doi: 10.1007/s00122-010-1398-2
- Lampignano, V., Laverse, J., Mastromatteo, M., Del Nobile, M. A. (2013). Microstructure, textural and sensorial properties of durum wheat bread as affected by yeast content. *Food Research International*, 50(1), 369-376, doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.030
- Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno, B., Gobbetti M. (2015). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 215:161-170. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015.

- Liu, J., Li, X., Liu, Y., Xing, C., Xie, Y., Cai, G., Lu, J. (2021). Evaluation of genetic diversity and development of core collections of industrial brewing yeast using ISSR markers. *Archives of Microbiology*, 203, 1001-1008, doi: 10.1007/s00203-020-02091-8
- Luan, C., Li, X., Zheng, G., Yao, J., & Wang, J. (2014). ISSR fingerprint analysis and SCAR marker of 23 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Science*, 35, 163-167. Doi: 10.7506/spkx1002-6630-201403033.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M. (2012). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: Interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied Environmental Microbiology*, 78 (4), doi: 10.1128/AEM.07721-11
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G., Gobbetti, M. (2015). House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiology*, 52, 66-76, doi: 10.1016/j.fm.2015.06.009
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H. (2017.) Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-2.2017. <<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>>
- Palacioğlu, G., Alkan, M., Derviş, S., Bayraktar, H., Özer, G. (2023). Molecular phylogeny of plant pathogenic fungi based on start codon targeted (SCoT) polymorphism. *Molecular Biology Reports*, 1-9, doi: 10.1007/s11033-023-08735-4
- Pathania, N., Kanwar, S. S., Jhang, T., Koundal, K. R., Sharma, T. R. (2010). Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9), 1539-1547, doi: 10.1007/s11274-010-0329-3
- Peakall, R. Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update, *Bioinformatics*, 28, 2537-2539, doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35, doi: 10.1016/j.fm.2013.08.006.
- Prevost, A., Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107-112, doi: 10.1007/s001220051046
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959, doi: 10.1093/genetics/155.2.945
- R Studio Team. (2020). RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125-134, doi: 10.1023/A:1009680614564
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M., Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 112(2), 302-315, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x
- Tikendra, L., Potshangbam, A. M., Dey, A., Devi, T. R., Sahoo, M. R., & Nongdam, P. (2021). RAPD, ISSR, and SCoT markers based genetic stability assessment of micropropagated *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.-an important endangered orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 341-357, doi: 10.1007/s12298-021-00939-x

- Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Gardini, F. (2004). A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Research International*, 37 (5), 469–476, doi: 10.1016/j.foodres.2004.01.004
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P., Daniel, H.-M. (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Research*, 10, 471–481, doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00621.x
- Yağmur, G., Tanguler, H., Leventdurur, S., Bağder-Elmacı, Simel, Turhan, E., Francesca, N., Erten, H. (2016). Identification of predominant lactic acid bacteria and yeasts of Turkish sourdoughs and selection of starter cultures for liquid sourdough production using different flours and dough yields. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(2), doi: 10.1515/pjfn-2015-0041
- Yang, H., Liu, T., Zhang, G., He, G. (2020). Intraspecific diversity and fermentative properties of *Saccharomyces cerevisiae* from Chinese traditional sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 124, 109195, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109195
- Yeh, F. C. (1999). POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft window-bases freeware for population genetic analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Yeken, M. Z., Emiralioğlu, O., Çiftçi, V., Bayraktar, H., Palacioğlu, G., Özer, G. (2022). Analysis of genetic diversity among common bean germplasm by start codon targeted (SCoT) markers. *Molecular Biology Reports*, 49(5), 3839-3847, doi: 10.1007/s11033-022-07229-z
- Zhang, J., Liu, W., Sun, Z., Bao, Q., Wang, F., Yu, J., Chen, W., Zhang, H. (2011). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. *Food Control*. 22:767–774. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.012.