



Geliş(Received) :29.03.2021
Kabul(Accepted) :18.06.2021

Araştırma Makalesi
Doi: 10.30708.mantar904921

Aspergillus Türlerinin Moleküler Tanımlanması için Hızlı, Doğru ve Düşük Maliyetli Yenilikçi Yaklaşım

Yüksel GEZGİN^{1,2*}, Sibel ARSLAN¹, Zeycan NURÇE¹

*Sorumlu yazar: yukselgezgin@gmail.com, yuksel.gezgin@ege.edu.tr

¹ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

² Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Tıp Laboratuvarı, İzmir.

¹Orcid No/Orcid ID: 0000-0001-5812-1882/ yukselgezgin@gmail.com

¹Orcid No/Orcid ID: 0000-0002-0883 0207/sibelarslan740@gmail.com

¹Orcid No/Orcid ID: 0000-0002-8785-9250/znurceska@gmail.com

Öz: *Aspergillus* türlerinin bazıları ekonomik açıdan önemli tarımsal ürünleri kontamine ederek en yaygın gıda bozulmalarına sebep olan mantarlardır. Bu türler ayrıca insan sağlığını tehdit eden karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilere sahip mikotoksinleri üretmektedirler. Tüm bu nedenlerden dolayı *Aspergillus* türlerinin kesin ve doğru tanımlamaları büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada Misel Doku-Polimeraz Zincir Reaksiyon (MD-PZR) temelli moleküler teknik geliştirilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan genomik DNA basamağı ortadan kaldırılmıştır. Bu misel doku-PZR temelli moleküler tekniğinin pahalı ve özel donanım gerektirmemesi, proteinaz K, RNAaz veya başka enzimler gibi pahalı kimyasallara ihtiyaç duyulmaması, genomik DNA izolasyon işlemleri sırasında fenol/kloroform gibi toksik kimyasalların kullanılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca sıvı kültür ile misel üretimine dayalı klasik DNA ekstraksiyon protokolleri zaman alıcıdır. Bu çalışmada *Aspergillus* izolatlarının moleküler tanımlanması için misel doku örnekleri kullanılarak iki farklı gen bölgesi (β -*tubulin*: *benA*, *Calmodulin*: *CaM*) çoğaltılmıştır. Daha sonra tüm PZR ürünleri saflaştırılıp ve dizi analizine gönderilmiştir. Sekans analiz sonuçları biyoinformatik araçlar kullanılarak incelenmiş ve izolatlar tür düzeyinde *Aspergillus tubingensis* (Divane Asper) R. Mosseray olarak tanımlanmışlardır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus*, *Kalmodulin Geni*, *Beta-Tubulin Geni*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rapid, Accurate and Low-Cost Innovative Approach for Molecular Identification of *Aspergillus* species

Abstract: Some of *Aspergillus* species are the most common food spoilage fungi contaminating economically important agricultural products. They also produce carcinogenic, teratogenic and mutagenic mycotoxins that threaten human health. For all these reasons, precise and accurate identification of *Aspergillus* species is of great importance. In this study, the Mycelium Tissue- Polymerase Chain Reaction (MT-PCR) based molecular technique was developed and therefore the genomic DNA isolation step which used as a template in the Polymerase Chain Reaction was eliminated. The mycelium tissue PCR-based molecular technique has some advantages. For example, it does not require expensive and specialized equipment, not require expensive chemicals such as proteinase K, RNase, other enzymes and not use toxic chemicals such as phenol/chloroform during the process of DNA isolation. The classic genomic DNA extraction procedure based on mycelium from liquid cultivations is also relatively time-consuming. For molecular identification of *Aspergillus* isolates were amplified two different gene regions (β -*tubulin*: *benA*, *Calmodulin*: *CaM*) by using tissue samples in this study. Then, all PCR products were purified and were sent to base sequence analysis. Sequence analysis results



were examined using bioinformatic tools and the isolates were identified to species level as *Aspergillus tubingensis* R. Mosseray.

Key words: *Aspergillus*, *Calmodulin* Gene, *Beta-Tubulin* Gene, Polymerase Chain Reaction

Giriş

Aspergillus section *Nigri* (AsN) grubu siyah sporlara sahip olduğundan 'black Aspergilli' olarak da adlandırılmaktadır. Bu filamentöz fungusların tanımlanmış pek çok türü bulunmaktadır; (Bladt vd., 2013 ; Azeem vd., 2015; Fungaro vd., 2017; Cabañes ve Bragulat, 2018). Bu türler endüstriyel, tıbbi, farmasötik ve biyoteknolojik alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir. Özellikle sitrik asit, glukonik asit gibi organik asitlerin üretiminde, amilaz, lipaz gibi hidrolitik enzimlerin üretiminde, yiyecek fermentasyon proseslerinde, başta ilaç ve antibiyotikler olmak üzere bir çok sekonder metabolitin üretimlerinde kullanılmaktadırlar (Wani vd., 2010; Varga vd., 2011; Priegnitz vd., 2015; Costa vd., 2016).

Avantajlı yönlerinin yanı sıra bu suşların gıda bozulmalarına neden olan ve insan sağlığını tehdit edecek mikotoksinleri (okratoksin A, fumonisin gibi) ürettikleri bilinmektedir (Frisvad vd., 2007; Frisvad vd., 2011; Frisvad, 2015; Frisvad vd., 2018; Taniwaki vd., 2018). *Aspergillus* section *Nigri* grubunun okratoksin A üreten başlıca türleri *A. carbonarius*, *A. niger* olup, fumonisin üreten türleri: *Aspergillus niger aggregatları*, *A. welwitschiae*' dir (Frisvad vd., 2011; Mutlu-İngök ve Karbancıoğlu, 2015; Aerts vd., 2018; Cabanes ve Bragulat, 2018;Freire vd.,2018; Frisvad vd., 2018; von Hertwig vd., 2018; Onami vd., 2018; Taniwaki vd., 2018). Bu mikotoksinler karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkiye sahip bileşikler olup; antikor yanıtını zayıflatma, kanın pıhtılaşma mekanizmasını bozmakta, hücre bağışıklık yanıtını azaltmakta ve immün sistemini zayıflatarak paraziter, viral ve bakteriyel hastalıklara neden olmaktadır (Monod vd., 2002; Gümüş ve Yılmaz, 2006).

Tüm bu nedenlerden dolayı *Aspergillus* section *Nigri* türlerinin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu amaçla önceleri sadece morfolojik yöntemler kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Ancak *Aspergillus* section *Nigri* türlerinin morfolojilerinin benzer olması bu yöntemi tek

başına kullanımını yetersiz kılmıştır. Bu nedenle morfolojik yöntemlerin yanında kimyasal yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (von Hertwig vd., 2018). Kimyasal yöntemlerin dezavantajı ise bu filamentöz funguslara ait sekonder metabolitlerin tek bir tür tarafından üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin funalenone ve tensidol A'nın her ikisinde *Aspergillus niger* ve *Aspergillus tubingensis* tarafından üretilmektedir (Perrone vd., 2007; Nielsen vd., 2009; Lamboni vd., 2016). Tüm bu nedenlerden dolayı bu iki yöntemle eş zamanlı olarak, moleküler yöntemler üzerine çalışılmaya başlanmıştır (Cabanes ve Bragulat, 2018). Günümüzde sonuçların doğruluğu ve kesinliği için her üç yöntemi de barındıran polifazik yaklaşım üzerine odaklanılmıştır (Aufauvre-Brown vd., 1993; Baquião vd., 2013; Lamboni vd., 2016; Decontardi vd., 2018; Norlia vd., 2018).

Polifazik yaklaşım ile filamentöz fungus türlerinin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerde kalmomodulin, β -tubulin, ITS, RPB2 gibi korunmuş gen bölgelerinden yararlanılmaktadır (Varga vd., 2011; Palumbo ve O'Keeffe, 2015; Samson vd., 2014; Lamboni vd., 2016).

Moleküler tanımlama yöntemlerinde yer alan basamaklar sırasıyla genomik DNA izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmaları ve baz dizi analizi'dir. Bu basamaklar içerisinde yer alan genomik DNA izolasyonu basamağı zaman alıcı, maliyetli ve iş gücü gerektiren bir işlem olup günümüzde moleküler tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesine ve alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler tanımlama amacıyla yapılan çalışmalarda DNA izolasyonu için kullanılan ekipman ve sarf malzemelerin yüksek bir bütçe gerektirdiği görülmüştür.

Bu çalışmada Misel Doku-Polimeraz Zincir Reaksiyon (MD-PZR) temelli moleküler teknik geliştirilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan genomik DNA izolasyonu basamağı ortadan kaldırılmıştır. MD-PZR çalışmalarına yönelik rutin bir PZR protokolü



bulunmaması sebebiyle öncelikle genomik DNA izolasyonu yapılmış, daha sonra gradient PZR denemeleri yapılarak PZR koşullarının optimize edilmesi yoluna gidilmiştir. Daha sonra bu koşullar kullanılarak Misel Doku PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, *Aspergillus section Nigri* grubunun moleküler tanımlanması amacıyla Misel Doku PZR (MD-PZR) protokolü/tekniki geliştirilerek DNA izolasyonunun sebep olduğu zaman ve maliyet kaybının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Fungal izolatların aktivasyonu

Çalışmada kullanılan fungal izolatlar Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Aspergillus section Nigri grubunda yer alan 10 adet izolat ile *Aspergillus brasiliensis* türü Malt Ekstrakt Agar (MEA)'a üç nokta ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilerin 27°C 'de 3 gün süreyle aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. *A. brasiliensis* SYZ 13 türü PZR çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Aktivasyon sonrası %0,01 Tween 80 kullanılarak her bir izolata ait homojen spor solüsyonu hazırlanmıştır. Elde edilen spor solüsyonlarından doğrudan %1 oranında Malt Ekstrakt Broth (MEB) besiyeri içeren erlenlere aseptik koşullarda ekim yapılarak erlenler 27°C 'de 120 rpm hızındaki çalkalayıcı inkübatörde 3 gün boyunca inkübe edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu

MEB inkübasyon sonrasında elde edilen miseller aseptik koşullarda filtrasyon ile fermentasyon sıvısından ayrılmış ve genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmada manuel bir genomik DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Liu vd., 2000).

PZR Çalışmaları

A. Genomik DNA ile gerçekleştirilen PZR çalışmaları

Genomik DNA izolasyonu sonrasında *kalmmodulin* ve *β tubulin* geni olmak üzere iki farklı gen bölgesi için PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Her iki gen bölgesi için en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenebilmesi amacıyla Gradient PZR yapılmıştır. Bu amaçla GeneMark 5X PCR Dye Master Mix II (GeneMark, Tayvan) kullanılmıştır. Son hacmi 25 µl olan PZR karışımının bileşenleri ve miktarları sırasıyla; 5 µl 5X PCR Dye Master Mix

II, 1 µl kalıp DNA (5ng/ul), 1 µl forward primer (FP) (10 µM), 1 µl reverse primer (RP) (10 µM), 17µl ddH₂O şeklindedir.

Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve bu primerlere ait baz dizileri Tablo 1 de verilmiştir.

Gradient PZR için farklı sıcaklıklar denenmiş ve uygun PZR koşulu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan gradient PZR koşulu; 94°C 3dk, [94°C 30sn, 48-58°C 30sn, 72°C 2dk](35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ dir.

B. Misel Doku/ Miseliyal Kütle -PZR (MD-PZR)

Bu çalışmada *Aspergillus* türlerinin moleküler tanımlanmasında MD-PZR tekniği geliştirilerek kullanılmıştır, bu teknik genomik DNA izolasyonu basamağı atlanarak direk miseliyal kütle PZR işleminin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır. İzolatların MEA besiyerinde 27°C 'de 3 gün boyunca büyütülmesi sonucu petride elde edilen miseliyal kütle, MD-PZR'da kalıp olarak kullanılmıştır. MD-PZR tekniği için Takara PCR Amplification Kit (Takara Bio Group, Japonya) kullanılmıştır.

MEA besiyerinde büyütülen izolatlara ait miseller steril pipet ucu değiştirilerek alınıp içerisinde DNA polimeraz (5 U/ µl), dNTP mix (2.5 mM), DNA polimeraz tampon (5 µl), forward primer (FP) (1 µM), reverse primer (RP) (1 µM) ve ddH₂O olan 50 µl son hacimde olacak şekilde hazırlanan, PZR bileşenlerinin bulunduğu PZR eperdorf tüplerine aktarılmıştır.

MD-PZR tekniği çalışmalarında genomik DNA kullanılarak gerçekleştirilen gradient PZR çalışması sonucunda elde edilmiş en uygun PZR koşulu kullanılmıştır.

PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Genomik DNA ve MD-PZR çalışmalarında elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür ve G-BOX cihazında (Wise Doc) bantlar görüntülenmiştir.

Görüntüleme sonucunda seçilen PZR ürünlerine ait örnekler baz dizi analizi amacıyla Invitrogen Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Dizi analizi

Saflaştırma kiti kullanılarak elde edilen *kalmmodulin* ve *β tubulin* gen bölgelerine ait PZR örnekleri dizi analizi yapmak üzere REFGEN'e gönderilmiştir. Her iki gen bölgesi için baz dizi analizi ile elde edilen diziler Blast yöntemi kullanılarak (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) benzerlikler karşılaştırılmıştır.



Tablo 1. PZR çalışmalarında kullanılan primerler ve baz dizileri

Gen Bölgesi	Primer isimleri	Primer Nükleotid dizisi	Kaynaklar
Kalmodulin	CMD5-Forward	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC	Hong vd., (2005)
	CMD6-Reverse	CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	
Beta-Tubulin	Bt2a-Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass ve Donaldson (1995)
	Bt2b-Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	

Bulgular

Genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızda Liu ve arkadaşları (2000) tarafından yapılmış DNA izolasyon protokolü modifiye edilerek kullanılmış ve genomik DNA'ların saflığı ile konsantrasyonları Nanodrop yardımı ile ölçülmüştür. Bu DNA'ların absorban değerlerinin ise ABS_{260} / ABS_{280} 1,6-2,0 aralığında olduğu belirlenmiştir.

Konsantrasyonları belirlenen DNA'lar 5 ng/ μ L olacak şekilde seyreltilerek, hem genomik DNA ile yapılmış gradient PZR çalışmalarında hem de kontrol DNA olarak MD-PZR tekniği çalışmalarında kullanılmıştır.

Genomik DNA ile gerçekleştirilen gradient PZR çalışmaları

Gradient PZR çalışmaları sırasında *Aspergillus sp. SYZ 2* ve *SYZ 4* izolatına ait genomik DNA kullanılmıştır (Şekil 1A ve Şekil 1B). Genomik DNA izolasyonu yapılan *Aspergillus sp. SYZ 2* ve *Aspergillus sp. SYZ 4* izolatlarına ait DNA konsantrasyonları sırasıyla; 150 ng/ μ L ve 259 ng/ μ L olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen jel görüntüleri doğrultusunda *kalmodulin* ve *β tubulin* gen bölgeleri için 48°C – 54.1°C arasında parlak bant elde edildiği görülmüştür (Şekil 1A, 1B). Çalışmalara her iki gen bölgesi için de en parlak bantın elde edildiği ortak sıcaklık olan 50 °C ile devam edilmiştir (Şekil 1A, 1B). Çalışmamızda optimize koşul; 94°C 3dk, [94°C 30sn, 50°C 30sn, 72°C 2dk](35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ olarak belirlenmiştir.

Misel Doku-PZR çalışmaları

Gradient PZR çalışmaları sonucunda *kalmodulin* ve *β tubulin* gen bölgeleri için elde edilen bağlanma sıcaklığı olan 50 °C kullanılarak MD-PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir. Şekli 2A

ve 2B'deki jel görüntüsünde *Aspergillus sp. SYZ 5*, *Aspergillus sp. SYZ 6* ve *Aspergillus sp. SYZ 9* izolatlarında kalmodulin gen bölgesine ait bantlar elde edilmiştir. Kalmodulin gen bölgesi için bu izolatların bant uzunluklarının yaklaşık 600 bp olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca PZR koşullarının çalıştığını göstermek amacıyla kontrol olarak *Aspergillus sp. SYZ 2* ye ait genomik DNA kullanılmıştır. MD-PZR sonucu elde edilen bant uzunluğunun kontrol genomik DNA ile yapılan ile karşılaştırıldığında aynı uzunlukta olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). *Aspergillus sp. SYZ 3* izolatının, β -tubulin gen bölgesiyle yapılan tissue PZR işleminde ise çift bant elde edildiği görülmüştür. Aynı sonuç kontrol grubunda da gözlenmiştir. *Aspergillus sp. SYZ 3* izolatının tubulin gen bölgesinin uzunluğunun yaklaşık 700 bp olduğu tespit edilmiştir Şekli 2A.

PZR örneklerinin saflaştırma işlemleri

MD-PZR çalışmaları ile her iki gen bölgesine ait bant elde edilmesi sonucunda aynı koşullarda deneme tekrarlanarak *Aspergillus sp. SYZ 1*, *SYZ 3*, *SYZ6*, *SYZ7*, *SYZ8*, *SYZ9*, *SYZ 10*, *SYZ13* izolatlarına ait misel kullanılarak MD-PZR yapılmıştır. Daha sonra PZR ürünleri saflaştırılıp jelde yürütülmüştür (Şekli 3A ve 3B). Elde edilen bant boyutlarının saflaştırma öncesi bant boyutları ile eşit uzunlukta olduğu tespit edilmiştir

Dizi analizi

Seçilen PZR ürünleri dizi analizi için REFGEN'e gönderilmiştir. Daha sonra BLAST çalışmaları yapılarak benzerlikler karşılaştırılmıştır. Her iki gen bölgesine göre yapılan BLAST analizleri sonucuna göre *Aspergillus tubingensis* ile %99 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Sonuçlar genomik DNA ile yapılan BLAST analizi sonuçlarıyla uyumlu çıkmıştır.

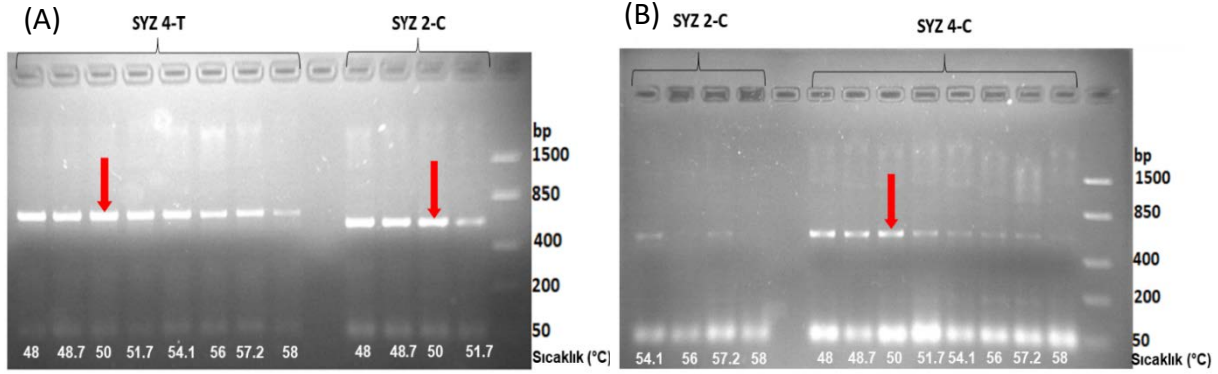


Tartışma

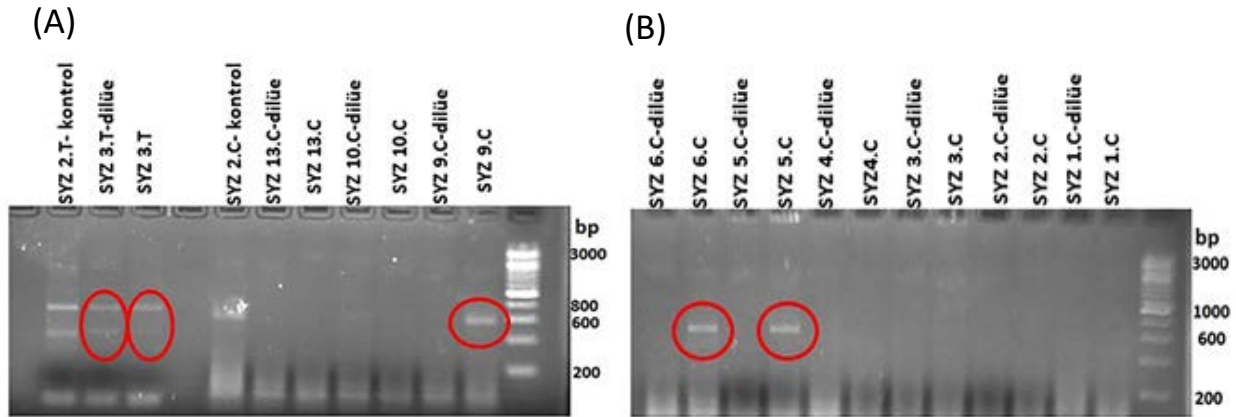
Filamentöz fungusların bir grubu olan *Aspergillus* section *Nigri* grubunun moleküler tanımlanması için yapılan çalışmalarda genomik DNA izolasyonu sırasında bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu zorlukların başında çalışılan grubun siyah sporlara sahip olması gelmektedir. Siyah spordan kaynaklanan melanin pigmenti, ekstraksiyon sırasında DNA ile birlikte çökerek PCR reaksiyonunu kuvvetle inhibe etmektedir (Séjalon-Delmas vd., 2000).

Ayrıca genomik DNA izolasyonu için gerekli olan donanım ve sarf malzemelerin yüksek bir bütçe gerektirdiği görülmektedir. Genomik DNA

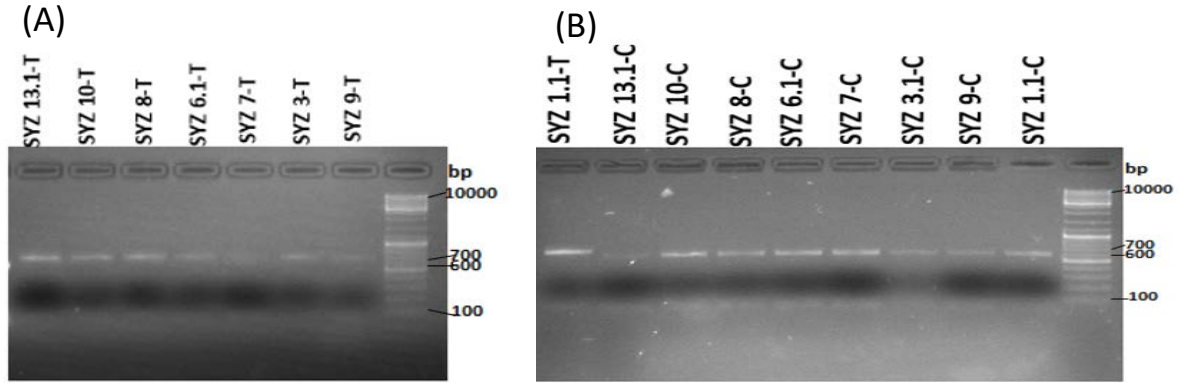
izolasyonu sırasında yaşanan zorluklar ve yüksek maliyetin yanı sıra bu işlemin oldukça zaman aldığı ve yüksek iş gücü gerektirdiği görülmektedir. Yani DNA izolasyonu hem zaman, hem maliyet hem de iş gücü kaybına neden olmaktadır (Şekil 4A). Bu sebeple bu çalışmada genomik DNA izolasyonu basamağının atlanmasını sağlayan MD-PZR çalışmaları üzerine odaklanılmıştır (Şekil 4A ve Şekil 4B). Bu teknik fungus miselinin doğrudan kullanımı sebebiyle hızlı ve kolay olması, DNA izolasyon işlemleri sırasında proteinaz K, RNA az veya başka enzimler gibi pahalı kimyasallara ihtiyaç duyulmaması, iş yükünün daha az olması gibi avantajlara sahiptir.



Şekil 1. A ve B. *Aspergillus* sp. SYZ 2 ve *Aspergillus* sp. SYZ 4 izolatlarına ait genomik DNA ile kalmodulin (C) ve β tubulin (T) gen bölgelerine yönelik gerçekleştirilen gradient PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüsü.



Şekil 2. A. *Aspergillus* sp. SYZ 3 izolatına ait misel dokusu kullanılarak β tubulin (T) gen bölgesine yönelik MD-PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerinin jel görüntüsü B. Kalmodulin (C) gen bölgesi için 9 farklı *Aspergillus* sp. SYZ izolatına ait miseller kullanılarak yapılan MD-PZR sonucu elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüleri



Şekil 3. A. β tubulin (T) ve B. Kalmmodulin (C) gen bölgelerine ait PZR ürünlerinin saflaştırma sonrası elde edilen agaroz jel görüntüleri

Tablo 2. Bazı *Aspergillus* section *Nigri* türlerinin β -tubulin ve kalmmodulin gen bölgesi uzunlukları

<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> Grubunun Bazı Türleri	β -Tubulin Gen Bölgesi Uzunlukları (bp)* ve aksesyon numaraları	Kalmmodulin Gen Bölgesi Uzunlukları (bp)* ve aksesyon numaraları
<i>A.tubingensis</i>	510 (AY820007)	696 (AJ964876)
<i>A.brasiliensis</i>	543 (AY820006)	693 (AM295175)
<i>A.carbonarius</i>	494 (AY585532)	674 (AJ964873)
<i>A.niger</i>	538 (AY585536)	671 (AJ964872)

*Tüm değerler <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (GenBank) adresinden alınmıştır (Samson vd., 2004)



Şekil 4. Bu çalışmada *Aspergillus* türleri için A. Genomik DNA (8 basamak) ve B. MD-PZR (4 basamak) kullanılarak yapılan moleküler tanımlama basamaklarının sırayla gösterimi



Moleküler tanımlama amacıyla MD-PZR tekniğinin kullanıldığı sınırlı çalışma mevcuttur. Bu tekniğin kullanıldığı çalışmalardan biri *Trichoderma sp.* (Saroj vd., 2015)'ye aittir. Bu çalışmadan farklı olarak sıvı kültürden elde edilen misel kullanılmıştır. MD-PZR yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışma ise *Stachybotrys* ve *Chaetomium* grupları (Lewińska vd., 2016) üzerinedir. Yapılan literatür incelemesi sonucunda, çalışma konusu olan *Aspergillus* section *Nigri* grup üyelerine yönelik sadece bir çalışma bulunmaktadır (Lamboni vd., 2016). Son iki çalışmada touch-down PZR kullanılmış olup PZR koşulları 98°C 30dk, [98°C 10sn, 61-52°C 30sn, 72°C 1dk](35 döngü), 72°C 5dk, 4°C ∞ dir.

Bu nedenle *Aspergillus* türleri için kullanılabilir pratik ve hızlı rutin bir PZR protokolü içeren MD-PZR tekniğinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla bu çalışmada MD-PZR protokolü geliştirilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan genomik DNA basamağı ortadan kaldırılmıştır. *AsN* grubuna ait türlerin moleküler tanımlanması amacıyla *kalmmodulin* ve *β tubulin* gen bölgelerinin kullanılarak gerçekleştirildiği çalışmalarda; *kalmmodulin* gen bölgesinin uzunluğunun literatür araştırmaları sonucunda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (GenBank) 400 ile 700 bp arasında olduğu görülmüştür (Tablo 2). Görüntülenen jellerde, genomik DNA ile yapılan PZR kontrol grubu ve direkt miseller ile yapılan MD-PZR çalışmalarından elde edilen bantların boyutlarının (600 bp) bu aralıkta olması çoğaltılan gen bölgesinin *kalmmodulin* gen bölgesi olduğunu göstermiştir. *β Tubulin* gen bölgesinin uzunluğunun literatür araştırmaları sonucunda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (GenBank)) 350 ile

1300 bp arasında olduğu görülmüştür (Samson vd., 2004; Samson vd., 2014). Görüntülenen jellerde, kontrol grubu ile ve direkt miseller ile yapılan MD-PZR çalışmalarından elde edilen bantların boyutlarının (700 bp) bu aralıkta olması çoğaltılan gen bölgesinin *β-tubulin* gen bölgesi olduğunu göstermiştir. Baz dizi analizleri bu sonuçları doğrulamıştır.

Aspergillus sp. SYZ 3 izolatının *β-tubulin* gen bölgesi için kontrol grubu ve direkt miseller ile yapılan MD-PZR çalışmalarından elde edilen jelde çift bant görülmektedir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda bunun bu gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla kullanılan primerlerden kaynaklanabileceği tespit edilmiştir. Hubka ve Kolarik, (2012) tarafından yapılan çalışmada da kullanılan primerlerden kaynaklı olarak (benA ve tubC) *β-Tubulin* paralog genler sebebiyle bazı PZR ürünlerinde çift bantlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda başarılı sonuçlar aldığımız MD-PZR tekniğinin bu grupta yer alan türler için kullanılabilirliğini göstermektedir.

Ayrıca bu çalışmada kullanılan tekniğin; diğer gen bölgeleri ve farklı fungus suşlarının moleküler tanımlanması için de kullanma potansiyelinin yüksek olduğu ve yaygınlaştırılabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Çalışmalarımız esnasında laboratuvar imkânlarını bizden esirgemeyen Prof. Dr. Elif Esin TUNA'ya, Arş. Gör. Dr. Arzu YILDIRIM'a çok teşekkür ederiz. Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Finansal desteğinden ötürü TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Aerts, D., Hauer, E. E., Ohm, R. A., Arentshorst, M., Teertstra, W. R., Phippen, C., Ram, A.F., Frisvad, J.C. and Wösten, H. A. (2018). The F1bA-regulated predicted transcription factor Fum21 of *Aspergillus niger* is involved in fumonisin production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(3), 311-322.
- Aufauvre-Brown, A., Tang, C. M. and Holden, D. W. (1993). Detection of gene-disruption events in *Aspergillus* transformants by polymerase chain reaction direct from conidiospores. *Current genetics*, 24(1), 177-178.
- Azeem, M., Terenius, O., Rajarao, G. K., Nagahama, K., Nordenhem, H., Nordlander, G. and Borg-Karlson, A. K. (2015). Chemodiversity and biodiversity of fungi associated with the pine weevil *Hylobius abietis*. *Fungal biology*, 119(8), 738-746.
- Baquião, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, D. D. and Correa, B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1127-1132.



- Bladt, T. T., Frisvad, J. C., Knudsen, P. B. and Larsen, T. O. (2013). Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules*, 18(9), 11338-11376.
- Cabañes, F. J. and Bragulat, M. R. (2018). Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. *Current opinion in food science*, 23, 1-10.
- Costa, C. P., Silva, D. G., Rudnitskaya, A., Almeida, A. and Rocha, S. M. (2016). Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Decontardi, S., Soares, C., Lima, N. and Battilani, P. (2018). Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. *Food microbiology*, 73, 137-149.
- Freire, L., Guerreiro, T. M., Caramês, E. T., Lopes, L. S., Orlando, E. A., Pereira, G. E., Lima Pallone, J.A., Catharino, R.R. and Sant'Ana, A. S. (2018). Influence of maturation stages in different varieties of wine grapes (*Vitis vinifera*) on the production of ochratoxin A and its modified forms by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(33), 8824-8831.
- Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R. and Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9481-9515.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., De Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabañes, F. J., Cabañes, F.J., Ehrlich, K. and Samson, R. A. (2007). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in mycology*, 59, 31-37.
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A. and Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS one*, 6(8), e23496.
- Frisvad, J. C. (2015). Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 5, 773.
- Fungaro, M. H. P., Ferranti, L. S., Massi, F. P., da Silva, J. J., Sartori, D., Taniwaki, M. H., Frisvad, J.C. and Iamanaka, B. T. (2017). *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section Nigri discovered in Brazil. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Gümüş, T. and Yılmaz, İ. (2006). Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri. *Türkiye*, 9, 24-26.
- von Hertwig, A. M., Sant'Ana, A. S., Sartori, D., da Silva, J. J., Nascimento, M. S., Iamanaka, B. T., Fungaro, M.H.P. and Taniwaki, M. H. (2018). Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. *Journal of microbiological methods*, 148, 87-92.
- Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316-1329.
- Hubka, V. and Kolarik, M. (2012). β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29, 1.
- Lamboni, Y., Nielsen, K. F., Linnemann, A. R., Gezgin, Y., Hell, K., Nout, M. J., M., van Boekel, M.A., Hoof, J.B. and Frisvad, J. C. (2016). Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section Nigri isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa. *PLoS One*, 11(10), e0164310.
- Lewińska, A. M., Peuhkuri, R. H., Rode, C., Andersen, B. and Hoof, J. B. (2016). Rapid detection and identification of *Stachybotrys* and *Chaetomium* species using tissue PCR analysis. *Journal of microbiological methods*, 130, 115-122.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471-471.
- Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M. and Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(5-6), 405-419.
- Mutlu-İngök, A. and Karbancıoğlu-Güler, H. F. (2015). Sıcaklığın *Aspergillus* section Nigri Üyelerinin Okratoksin A Oluşturması Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 1-8.
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O. and Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(5), 1225-1242.
- Norlia, M., Jinap, S., Nor-Khaizura, M. A. R., Son, R. and Chin, C. K. (2018). Polyphasic approach to the identification and characterization of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from



- peanuts and peanut-based products marketed in Malaysia. *International journal of food microbiology*, 282, 9-15.
- Onami, J. I., Watanabe, M., Yoshinari, T., Hashimoto, R., Kitayama, M., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., Kamata, Y., Takahashi, H., Kawakami, H. and Terajima, J. (2018). Fumonisin-production by *Aspergillus* section Nigri isolates from Japanese foods and environments. *Food Safety*, 6(2), 74-82.
- Palumbo, J. D. and O'Keeffe, T. L. (2015). Detection and discrimination of four *Aspergillus* section Nigri species by PCR. *Letters in applied microbiology*, 60(2), 188-195.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. and Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in mycology*, 59, 53-66.
- Priegnitz, B. E., Brandt, U., Pahirulzaman, K. A., Dickschat, J. S. and Fleißner, A. (2015). The AngFus3 mitogen-activated protein kinase controls hyphal differentiation and secondary metabolism in *Aspergillus niger*. *Eukaryotic cell*, 14(6), 602-615.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B. and Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Samson, R. A., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F., Frank, J. M. and Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in mycology*, 50(1), 45-56.
- Saroj, D. B., Dengeti, S. N., Aher, S. and Gupta, A. K. (2015). A rapid, one step molecular identification of *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma reesei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 995-999.
- Séjalon-Delmas, N., Roux, C., Martins, M., Kulifaj, M., Bécard, G. and Dargent, R. (2000). Molecular tools for the identification of *Tuber melanosporum* in agroindustry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2608-2613.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I. and Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38-43.
- Varga, J., Frisvad, J. C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. and Samson, R. A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 69, 1-17.
- Wani, M. A., Sanjana, K., Kumar, D. M. and Lal, D. K. (2010). GC-MS analysis reveals production of 2-Phenylethanol from *Aspergillus niger* endophytic in rose. *Journal of basic microbiology*, 50(1), 110-114.