

FUNGAL MOLEKÜLER SİSTEMATİK

A.Esengül Momol*

M. Timur Momol**

ÖZET

Bu derlemede fungusların moleküler sistematik çalışmalarında kullanılabilen moleküler biyolojik yöntemlerin fungus genomundaki uygulanma alanları ve bu çalışmalara model olmuş funguslar incelenmiştir.

GİRİŞ

Bugün funguslar canlılar içinde ayrı bir kingdom "fungi" olarak ele alınmaktadır ve Myxomycota, Acrasiomycota, Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota, ve Ascomycota adları altındaki gruplarda incelenmektedir. Funguslar ekosistem içinde önemli organizmalar olup daha çok mikolog ve fitopatologlar tarafından araştırma konusu olmaktadır. Fungusların önemi aşağıdaki nedenlerden kaynaklanmaktadır.

- a. Karasal ekosistem içinde, organik maddelerin ayrışmasından birinci derecede sorumludurlar.
- b. Bitkiler ile hem mutualistik hem parazitik simbiosis halindedirler.
- c. Bitki patojenlerinin büyük bir kısmını ve insan patojenlerinin bir kısmını oluştururlar ve bu nedenle ekonomik önemleri büyüktür.

* Yrd. Doç. Dr. Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

** Doç.Dr. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya.

- d. Moleküler biyologlar için kullanılmaya uygun genetik sistemler sunarlar. Saccharomyces cerevisiae, Neurospora crassa, ve Aspergillus nidulans bu konuda çalışılmış funguslardan birkaçıdır.
- e. Fermantasyon ve biyoteknoloji endüstrileri için vazgeçilmez kaynaklar oluştururlar.

Bu kadar önemli olmalarına karşın, funguslar arasındaki evrimsel ilişkiler hakkında bilinenler çok azdır. Basit ancak sık sık değişebilen morfolojileri, fosil kaynaklarının yetersizliği ve genetik çeşitliliğin geniş olması bu alandaki çalışmalarını sınırlayıcı etkenler olmuştur. Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte bu engellerin aşılmasında yeni yollar ortaya çıkmıştır. Funguslarda evrimsel gelişmenin incelenmesinde birçok yöntemler kullanılmış ancak bu derlemede yalnızca moleküler yöntemler gözönüne alınmıştır. Bugüne kadar funguslar üzerinde yapılan çalışmaların yeterli olmaması ve henüz bir bütünlük oluşturacak kadar çok sayıda inceleme yapılamadığından fungal moleküler sistematiğe genel bir sınıflandırma yapmak henüz erkendir.

FUNGAL MOLEKÜLER SİSTEMATİKTE KULLANILAN YÖNTEMLER

DNA-DNA Hibridizasyonu

Fungal genomun küçük olması ve tekrarlanan DNA sekanslarının hayvan ve bitkilere oranla daha az olması hibridizasyon çalışmalarına uygun bir konumdur, buna karşın fungal genomun evrimleşme şekli, bu tekniğin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır.

Bu tekniğin prensibi ısı veya diğer kimyasal yollarla denatüre edilmiş (bir strand indirgenmiş) test DNA'nın diğer test edilecek tek strand DNA ile hibrid oluşturmasıdır. İki farklı organizmadan alınan DNA'ların komplement oldukları bazlarla eşleşmesi sonucu oluşan hibrid DNA miktarı yüzde

olarak izotopik ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bu tip çalışmalardan ortaya çıkan sonuç şudur: yakın türler arasında DNA çapraz hibridlenme yüzdesi %90'dan büyüktür. Çapraz hibridizasyon yüzdesi türün tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılmıştır. Çapraz hibridizasyon seviyesinin %80 den yüksek olduğu durumlarda bunun biyolojik tür olarak kabul edilmesi için eşleşme denemeleri ile arasındaki korrelasyona bakılmıştır (6).

Restriksiyon Enzim Analizi

Restriksiyon paterni DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilip ortaya çıkan fragmentlerin jel elektroforezinde incelenmesi ile belirlenir. Fragmentlerine ayrılmış DNA iki şekilde incelenebilir.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile restriksiyon enzimleri ile kesilmiş toplam genomik DNA da klonlanmış DNA sekanslarını prob olarak kullanılmasıyla organizmaya özgü restriksiyon enzim paterninin belirlenmesi esasına dayanır. RFLP Oomycetes sınıfına giren Bremia lactuca (9) ve Deuteromyces sınıfına giren Septoria tritici (8) de geniş olarak uygulanmıştır. Populasyon içindeki genetik varyasyon genomda tekrar edilmeyen DNA sekanslarını içeren klonlar kullanarak belirlenmiştir. Bu tür klonların elde edilebilmesi, ve bu klonların Southern blot analizinde prob olarak kullanılabilmesi zaman ve malzeme bakımından ekonomik olmamaktadır.

Son yıllarda PCR (Polimerase Chain Reaction) kullanarak geliştirilmiş olan RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) metodu ile klonlama, Southern Blot analizini ortadan kaldırarak polimorfizmi inceleme olanağını ortaya çıkarmıştır. RAPD metodunun prensibi çeşitli kısa primerler (10 nükleotid bazlar içeren sekanslar) kullanarak rastgele amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin oluşturduğu organizmaya özgü DNA polimorfizmini incelemeye dayanır. Bu yöntemde amplifikasyon koşullarının standart olarak uygulanması ve aynı koşullarda denemenin iki-üç kez tekrarlanması gereklidir.

Restriksiyon enzim analizi mitokondrial DNA, nükleer ribozomal DNA ünitesinde ve plasmidlerde yaygın olarak kullanılmıştır. Mitokondrial DNA funguslarda en çok üzerinde çalışmalar yapılmış bir genomik elementtir. Mitokondrinin uygun bir büyüklükte olması (176bp-17kb), bazların nükleer DNA da olduğu gibi metilasyon edilememesi ve mitokondrial DNA'nın kolayca izole edilebilmesi yönünden, fungusların evrimsel çalışmalarında büyük ölçüde kullanılmıştır. Oomycetes sınıfında incelenen Pythium ve Phytophthora (7), Basidiomycetes sınıfında incelenen Armillaria (14), Ascomycetes sınıfında incelenen Sclerotinia (5) ve Deuteromycetes sınıfında incelenen Fusarium (4) mitokondrial DNA restriksiyon enzim analizi geniş olarak çalışılmıştır.

Plasmidler funguslarda yaygın olarak bulunur. RFLP ve gen haritalama çalışmalarında kullanılmalarına karşın her fungusta universal olmaması, DNA bazlarının çok değişken olması ve genelde bir fonksiyonunun bulunmaması dolayısıyla moleküler sistematik çalışmalarında geniş olarak kullanılmamıştır.

Elektroforetik Karyotip Analizi

Normal elektroforez sistemi ile yapılamayan fungal kromozom analizi son yıllarda geliştirilen elektroforez sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem birbirinden 90 derece ayrılmış iki ayrı alana elektrik akımı verilmesi ile gerçekleşir. Kilobaz büyüklüğündeki fragmentler büyüklükleri ile orantılı olarak bu elektrik ortamda hareket ederler. Çok büyük kromozomlar ise NotI, PvuI veya MluI gibi restriksiyon enzimleri ile kesilerek bu yöntemi kullanarak analiz edilebilirler. Daha sonra haritalama tekniği ile istenilen genin bulunduğu kromozom belirlenir. Bugüne kadar 25 fungusun elektroforetik karyotipi belirlenmiş olup türler içinde çok sayıda kromozom polimorfizmi saptanmıştır (10, 11).

Nükleik Asit Sekans Analizi

Son yıllarda evrimsel çalışmalarda geniş anlamda

kullanılan bir yöntemdir. Direk olarak yapılabildiği gibi PCR-amplifiye edilmiş DNA veya RNA fragmentlerini kullanarak daha kolay olarak gerçekleştirilebilmektedir. Sekans analizi ile temel olarak baz değişimleri transversiyon ve transisyon olarak belirlenip, varyasyon derecesi incelenebilir. Bunlardan elde edilen data Genbank data bazında diğer araştırmacılarında hizmetine sunulmaktadır.

Bu amaçla son yıllarda ribosomal DNA (rDNA) ünitesi geniş anlamda kullanılmaya başlanmıştır. Ribosomal DNA'nın moleküler çalışmalarda kullanılmasının birçok avantajı vardır:

- a. Evrimsel çalışmalarda seçilecek ünitenin ne çok konservatif nede çok değişken olması gerekir. Ribosomal DNA genleri hem konservatif hemde değişken bölgeler içerdiklerinden bu çalışmalara uygundur.
- b. Protein sentezindeki fonksiyonel rolleri bakımından önem taşırlar.
- c. İzolasyonları kolaydır.
- d. Genomda birçok kopya halinde bulunmaları kolay elde edilmelerini sağlar.

Ökaryotlarda ribosomal RNA genleri kod eden bölgeler, 28S, 18S, 5.8S ve kod etmeyen bölgeler ITS (Internal Transcribed Spacer) ve NTS (Non Transcribed Spacer) olarak genomda birçok defa tekrarlanan sekanslar halinde bulunurlar. Moleküler sistematikte ilk olarak kullanılan ribosomal RNA geni 5S rRNA dır. 120 nükleotid uzunluğunda olması nedeniyle sekans analizi kolayca yapılabilmektedir. Özellikle Basidiomycetes lerdeki filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır. 5S rRNA sekans analizi ile Taphrina deformans'ın Ascomycetes lerden çok Basidiomycetes lere benzediği ortaya çıkarılmıştır (6). Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe ve Drosophila melanogaster 5S rRNA sekansları karşılaştırıldığında S. pombe sekansları S. cerevisiae den çok D. melanogaster'a benzediği belirlenmiştir.

(3). Bu sonuçlardanda 5S rRNA sekans analizlerinin yakın türler arası ilişkileri belirlemede pek yararı olmadığını ortaya çıkarmıştır. 5.8S rRNA ise ITS bölgeleri ile 18S ve 28S rRNA genlerinden ayrılmıştır. 5.8S molekülü 156-167 nükleotidden oluşmuştur. Birçok vertebr ve Neurospora 5.8S sekansları karşılaştırıldığında aralarındaki benzerlik %50 olarak bulunmuştur (13). 5.8S sekans analizinin class ve order'lar arası filogenetik ilişkileri incelemeye kullanılabilirliği ortaya çıkmıştır. Ökaryotlarda 18S rRNA yaklaşık 1800 nükleotidden, 28S rRNA ise 3000 nükleotidden oluşmuştur. 18S genleri 28S genlerinden daha konservatif olarak bulunmuştur.

Evrimsel olarak rRNA'nın ITS ve NTS bölgeleri hızlı değişime uğramış bölgeler olup organizmalar arası çok az benzerlik gösteren bölgelerdir. Ascomycetes sınıfına giren Pezizales order'ına dahil edilmiş bazı fungusların ITS sekans analizleri incelendiğinde, benzerlik oranının çok düşük olduğu buna karşın cinsler arası benzerlik oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Örneğin Ascodesmis sphaerospora ve Ascodesmis nigricans ITS bölgesi sekanslarının %95 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (12). Aynı şekilde Basidiomycetes sınıfında bulunan Suillus cinsleri arasındaki ITS bölgesi sekanslarının farklılığı sadece %1-3 olarak belirlenmiştir. Günümüze değin birçok fungus grubu moleküler yöntemler kullanarak incelenmesine rağmen Chytridiomycota ve Zygomycota grubundaki funguslar henüz moleküler metodlar kullanarak incelenememişlerdir.

SONUÇ

Bugüne değin kullanılan morfolojik yöntemlerin fungusların moleküler sistematiğinde yeterli olmadığı ve bu yöntemlerle yapılan sistematik analizlerde yanlışlıkların kaçınılmaz olduğu bir gerçektir. Daha sonraki yıllarda kullanılmaya başlanmış olan ultrastrüktür metodları morfolojik yöntemlere göre daha hassas olmasına rağmen sistematik analizlerde sadece alternatif bir metod olarak kalmıştır.

Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan moleküler biyolojik yöntemler ile fungal sistematik yeni ufuklar kazanmış olup, DNA baz seviyesindeki analizlerle fungal genomun incelenme olanağı doğmuştur.

SUMMARY

In this review paper, recently developed molecular techniques used for fungal systematics were reviewed. Also applications of these techniques for fungi from different classes were investigated. By using molecular methods for different parts of fungal genome such as mitochondrial and ribosomal DNAs were analyzed. These techniques help to improve the fungal systematics dramatically.

LİTERATÜR

1. Baúra, G., Szaro, T.M., Bruns, T.D. 1991. Gastroboletus laricinus is a recent derivative of Suillus grevillei: molecular evidence. Mycol. Soc. Am. News1. (Abstr). 42: 5.
2. Förster, H., Coffey, M.D., Elwood, H., Sogin, M.L. 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of the three zooporic fungi and implications for fungal evolution. Mycologia 82: 306-312.
3. Gouy, M., Li, W-H. 1989. Molecular phylogeny of the Kingdoms Animalia, Plantae and Fungi. Mol. Biol. Evol. 6: 109-122.
4. Kistler, H.C., Bosland, P.W., Benny, U., Leong, S., Williams, P.H. 1987. Relatedness of the strains of Fusarium oxysporum from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. Phytopathology 77: 1289-1993.

5. Kohn, L.M., Petsche, D.M., Bailey, S.R., Novak, L.A., Anderson, J.B. 1988. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of Sclerotinia species. *Phytopathology* 78: 1047-1051.
6. Kurtzman, C.C.P., Phaff, H.J., Meyer, S.A. 1983. Nucleic acid relatedness among yeasts. In: *Yeast Genetics Fundamental and Applied Aspects*, ed. J.F.T. Spencer, D.M. Spencer, A.R.W. Smith, pp 139-166. New York: Springer-Verlag.
7. Martin, F.N. 1989. Taxonomic classification of asexual isolates of Pythium ultimum based on cultural characteristics and mitochondrial DNA restriction patterns. *Exp. Mycol.* 14: 47-56.
8. McDonald, B.A., Martinez, J.P. 1990. DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms among Mycosphaerella graminicola (anamorph: Septoria tritici) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* 80: 1368-1373.
9. Michelmore, R.W., Hulbert, S.H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of Phytopathological fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 383-404.
10. Mills, D., McCluskey, K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Mol.Plant. Mic. Interaction* 3: 351-357.
11. Momol, E.A., Kimbrough, J.W., Kistler, H.C. 1990. Electrophoretic karyotypes are dissimilar for two strains of *Fusarium oxysporum* that differ in host range. *Mycological Society of America Newsletter (Abstr.)* 41(1): 31.
12. Momol, E.A. 1992. Nuclear ribosomal DNA sequence analysis in molecular systematics of Pezizales. Ph.D. Thesis, University of Florida, Gainesville, Florida.

13. Perkins, D.D., Turner, B.C. 1988. Neurospora from natural populations: toward the population biology of a haploid eukaryote. *Exp. Mycol.* 12: 91-131.
14. Smith, M.L., Anderson, J.B. 1989. Restriction Fragment Length Polymorphisms in mitochondrial DNAs of Armillaria: Identification of North American biological species. *Mycol. Res.* 93: 247-256.
15. Williams, J.G.K., Kübelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.