

Araştırma Makalesi

Dağ Keçilerinden İzole Edilen Anaerobik Gut Fungusların Moleküler Tanımlanması

Cemal Elinç¹ , Bülent Kar^{2,*} 

Gönderim: 24.03.2025
Kabul: 08.12.2025

¹Munzur University, Faculty of Vocational School, Department of Medical Documentation and Secretarial, Tunceli, Turkey, cemalelinc8@gmail.com

²Munzur University, Faculty of Vocational School postgraduate education institute, Department of Medical Documentation and Secretarial, Tunceli, Turkey, bkar@munzur.edu.tr

*Sorumlu yazar

Özet: Anaerobik Gut funguslar (AGF) Neocallimastigomycota filumunda bulunmaktadır, bu fungusların özellikle otoburların sindirim sisteminde, yemlerin tüketiminde temel koloni olduğundan dolayı önemli rol oynadığı bilinmektedir. AGF'lar salgıladıkları lignoselülozik enzimler yardımıyla bitki dokularını parçalayarak sindirilmesini sağlamaktadırlar. Bu enzimler son yıllarda gıda ve yem sanayinde de kullanılmaktadır. Bu açıdan farklı ruminant hayvanlardan izole edilen ve tanımlaması yapılan funguslar değerli olmaktadır. Bu çalışmada Tunceli yöresinde yaban hayatta bulunan dağ keçilerinden fungus izolasyonu yapılmış, morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmıştır. Moleküler tanımlamada yaklaşık 1500 bp uzunluğundaki ITS bölgesi kullanılmıştır. İzole edilen 9 fungustan *Orpinomyces* sp. (AGF-5) *Feramyces* sp.(AGF-8,10) ve *Neocallimastix* sp. (AGF-1,2,3,4,7,11) cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Yabani ruminant hayvanlardaki mikrobiyal popülasyonun belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: anaerobik gut fungi, dağ keçileri, fungi, PCR, ITS

Research Article

Molecular Identification of Anaerobic Gut Fungi Isolated from Mountain Goats

Abstract: Anaerobic Gut Fungi (AGF) are found in the Neocallimastigomycota phylum, and it is known that these fungi play an important role, especially in the digestive system of herbivores, as they are the main colonies in the consumption of feed. AGFs provide digestion by breaking down plant tissues with the help of lignocellulosic enzymes they secrete. These enzymes have also been used in the food and feed industry in recent years. In this respect, fungi isolated and identified from different ruminant animals are valuable. In this study, fungi were isolated from mountain goats living in the wild in the Tunceli region and identified morphologically and molecularly. The ITS region of approximately 1500 bp was used in molecular identification. It was determined that 9 isolated fungi belonged to the genera *Orpinomyces* sp. (AGF-5), *Feramyces* sp. (AGF-8,10) and *Neocallimastix* sp. (AGF-1,2,3,4,7,11). Further studies are needed to determine the microbial population in wild ruminant animals.

Keywords: anaerobik gut fungi, mountain goats, fungus, PCR, ITS

1. Giriş

Ruminantlar, memeli otçulların en çeşitli ve en yaygın gruplarından birisini oluşturur. Evcilleştirilmiş ruminantların popülasyonunun yaklaşık 3,75 milyar olduğu tahmin edilirken, yabani ruminantların popülasyonunun 75 milyondan fazla olduğu tahmin edilmektedir [1]. Ruminantia alt takımı altı aileden oluşur (Antilocapridae, Bovidae, Cervidae, Giraffidae, Moschidae ve Tragulidae) [2]. Tür açısından en zengin aile 140 üzerinde türe sahip Bovidae'dir [3], bunların çoğu önemli çiftlik hayvanlarıdır [örn. sığır, keçi, koyun] [1]. Ruminantların en önemli özellikleri, yüksek lifli içerikli kaba yemleri sindirmede oldukça yetenekli olmaları gösterilebilir. Bu, esas olarak, anaerobik bir pregastrik bölmede [rumen] yemi fermente etme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Bu fermentasyonun gerçekleşmesini sağlayan ana bileşen, rumen içerisindeki mikrobiyom topluluğudur. Rumen mikrobiyal topluluğu bakterileri, arkeleri, protozoaları, virüsleri ve mantarları kapsayan kompleks bir mikrofaunadır [4, 5]. Mantar kısmını oluşturan anaerobik bağırsak mantarları [AGF], Neocallimastigomycota şubesine içerisinde bulunur. Bitki biyokütlesi bozunma sürecinde önemli bir rollerden birisini üstenen bu grup, rumen ortamı için vazgeçilmezdir. AGF hiflerini kullanarak, bitki biyokütlesine etkili bir şekilde nüfuz ederler ve bitki hücre duvarlarının etkili mekanik parçalanmasına neden olurlar [4]. Ayrıca AGF, bitki hücre duvarı bozunumu için çok önemli olan çok çeşitli karbonhidrat aktif enzimlerini üretebilme potansiyeline sahip canlılardır [6-8]. Çalışmalar, AGF'nin ruminantlarda biyokütle bozunumunun temel bir bileşeni olduğunu göstermiştir [7, 9, 10,11].

Rumeni oluşturan bakteri ve arke toplulukları hakkındaki bilgi zenginliğinin aksine, memeli otçulların rumenindeki yerleşik rumen AGF topluluğu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda evcil olmayan ruminantlarda tanımlanan funguslarla birlikte cins sayısı artmıştır. AGF, henüz tam olarak anlaşılamayan, parçalayıcı ve üretken özellikleri üzerinde bilinmeyen bir etkiye sahip olan, zoosporik bir yaşam döngüsüne sahiptirler (Şekil 1). Rumen içerisinde serbest bir şekilde yüzeabilen ve tek veya çok kamçılı olabilen bir zoospor yapısına sahiptir. Bu yapı substrata tutunarak, önce vejetatif forma sonrada sporangiyumlara dönüşür. Bazı suşlarında sporangiyumları, dallanan ve lif veya kök benzeri yapılar olan rizoidler geliştirebilir. Daha sonrasında gelişen sporangiyumlar olgunlaşır ve yeni zoosporların oluşmasını sağlar [12,13]. Hala yapılan bir çok çalışmaya rağmen, varlığı tahmin edilen ancak henüz kanıtlanamayan aerotolerant aşamaya sahip oldukları fikridir [14]. Bugüne kadar AGF üzerinde yürütülen çalışmaların neredeyse tamamı saflaştırma kısmının tam olarak yapılması veya muhtemelen zamanla değişen yetiştirme koşullarından etkilenen bu popülasyonların bilinmeyen bir hayat döngüsü olduğu anlamına gelir. Son döneme kadar anaerobik bağırsak mantarlarına yönelik genetik mühendisliği araçları kısıtlıydı. Bu durum, gen fonksiyonlarının analiz edilmesini, mutant suşların oluşturulmasını ve metabolik işlevlerle ilgili hipotezlerin test edilmesini önemli ölçüde engellemekteydi. Son yıllarda bu mikroorganizmalar üzerinde yürütülen genetik mühendisliği çalışmaları, genellikle kalın hücre duvarlarına sahip olgun hücrelere kıyasla DNA dönüşümüne daha elverişli oldukları düşünülen zoosporların hedeflenmesine odaklanmıştır [15]. Bununla birlikte, yeni yapılan bazı araştırmalar da yalnızca zoosporları değil, mantarların yaşam evresindeki farklı basamakları genetik olarak modifiye etmeyi amaçlayan yaklaşımlar da geliştirilmiştir [16].

Anaerobik bağırsak mantarlarının yaşam evrelerinin daha iyi anlaşılması, etkili genetik mühendisliği araçları tasarlama ve biyoteknolojik uygulamalar için yararlı enzimler ve metabolitler çıkarma yeteneğimizi geliştirebilir. Dahası, bu yaşam evrelerinin ayrılması, AGF gelişimine ilişkin temel anlayışımıza yardımcı olabilir. AGF genomlarında, açık okuma çerçevelerinin önemli bir kısmının (%70)

foksiyonu bilinmemekle birlikte, tanımlanan birçok genin öngörülen işlevleri henüz tam olarak doğrulanmamıştır [17]. Bu çalışmada, özellikle AGF'ların sınıflandırması için bazı genlerin kullanılma potansiyeli üzerinde hipotezler geliştirilmektedir. Anaerobik fungusların şu ana kadar 22 cins, filamentli monosentrik (*Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Buwchfawromyces*, *Ghazallomyces*, *Aklioshbomyces*, *Agriosmyces*, *Capellomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces*, *Tahromyces*, *Aestipascumyces*, *Paucimyces*), filamentli polisentrik (*Orpinomyces*, *Anaeromyces* ve *Pecoromyces*) ve soğanlı (*Caecomyces* ve *Cyllamyces*) miselyum içerenler de dahil olmak üzere tanımlanarak [18,19], yakın zamanda yeni monosentrik cins *Feramyces* [20], *Liebetanzomyces* [21], *Astrotestudinomyces* ve *Testudinomyces* [22] ile genişletilmiştir.

AGF çalışılan tüm endopolisakkarit hidrolaz enzimleri içerisinde en aktif enzimlere sahip canlı grubu olabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bu çalışmada Tunceli'de yayılış gösteren dağ keçilerinden izole edilen AGF ait yeni cins ve türleri keşfederek, bu yeni organizmaların ileriki çalışmalarda metabolit aktivitelerinin araştırılmasının önü açılarak biyoteknolojik açıdan kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir. Anaerobik funguslar dünyada üzerine en az çalışılan organizmalar arasında gösterilebilir. Son yıllarda üzerinde durulmaya başlanmıştır. Türkiye'de de bu konuda çalışmalar çok sınırlıdır. Tunceli bölgesinde yaban hayatta yaşayan dağ keçilerinde ilk kez fungus taraması yapılmış yeni fungus cinslerinin keşfi için ön basamak tamamlanmıştır.



Şekil 1. Anaerobik Gut fungus izolasyonu. A) Rumen İçeriği B) Rumen santrifüj işlemi C) Anaerobik fungus izolasyonu

2. Materyal ve Metot

2.1. Dışkı Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada, Tunceli-Ovacık ve Pülümür yol boyunca görülen 11 yaban keçisinden 11 farklı taze dışkı örnekleri alınarak kağıt torbalar içerisine konulmuştur. Tüm dışkı örnekleri kayıtları alınarak, naylon torbalar içerisinde buz üzerine yerleştirilerek, 24 saat içinde laboratuvara transfer edilmiş, zenginleştirme ve izolasyon prosedürleri için inokulant olarak kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C de dışkı stokları oluşturulmuştur. Örnek toplamada mümkün olduğunca taze

dışkının alınmasına özen gösterilmiştir. Ayrıca besiyeri ve izolasyonda kullanılmak üzere rumen sıvısı alınarak besiyer katkı maddesi olarak kullanılmıştır (Şekil 1).

2.2.Fungus izolasyonu ve saflaştırma

Alınan fungus örnekleri Orpin [23,24] anaerobik besiyeri kullanılarak izolasyonu ve saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Saflaştırılması tamamlanan anaerobik fungusların cins düzeyinde tanımlanması ışık mikroskopunda yapılmıştır. Rumen fungusları Orpin [25]'e göre morfolojik olarak tanımlanmıştır. Morfolojik tanımlanması tamamlanan funguslar ITS primerleriyle konvansiyonel PCR işlemine tabi tutulmuş ve DNA dizileme ile moleküler tanımlama işlemi tamamlanmıştır.

2.3.Morfolojik tanımlama

Saflaştırılması tamamlanan anaerobik gut fungusların cins düzeyinde tanımlanması ışık mikroskopunda (Şekil 3) Tanımlama anahtarı kullanılarak sınıflandırma [26] yapılmıştır.

2.4.Funguslardan genomik DNA izolasyonu

İzolatların inkübasyonundan sonra hücre duvarının tahrip edilmesi için numuneler sıvı nitrojen ile muamele edilmiş ve genomik DNA'nın ekstraksiyonu için CTAB [setil trimetilamonyum bromür] veya Doku Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti [Favorgen, Tayvan] kullanılmıştır.

2.5.ITS [İnternal Transkribe Spacer] amplifikasyonu ve dizilemesi ile fungusların moleküler tanımlanması

Bu çalışmada, tüm ITS bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan primer çifti ITSF (5'-CTACCGATTGAATGGCTTAGTG-3') ve ITSr (5'-AGTTCAGCGGGTACTCTTATCTG-3') tasarlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu, 41 µl dH₂O, 1 pmol Primer, 200 ng/ml şablon DNA, 5 µl 10X tampon, 1 µl dNTP ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon koşulları, ilk denatürasyon için 94°C'de 1 dakika süreyle bir döngü, ardından 30 saniye süreyle 72°C'de 35 döngü, 60 saniye süreyle 64°C ve 60 saniye süreyle 72°C'de, son uzatma için 72°C'de 5 dakikalık bir döngüden oluşmuştur. Amplifikasyona uğramış PCR ürünleri %1,0 agaroz jel üzerinde elektroforeze edilmiştir. Jel etidyum bromür kullanılarak boyanmış ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4 A-B). Dizileme işlemleri hizmet alımı yoluyla yapılmıştır ve PZR örnekleri Türkiye'deki bir şirkete gönderilmiştir (Şekil 4 C). Amplifikasyonu yapılan ITS gen bölgesi saflaştırılmış ve PCR amplifikasyonu için kullanılan aynı primer kullanılarak DNA dizileme Sanger dizileme yöntemi aracılığıyla, DNA dizilemesi 3130xl Genetik Analiz Cihazı (Applied Biosystems, ABD) yardımıyla çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. ITS gen dizileri, mevcut karakterize edilmiş referans dizileriyle eşleşmeleri belirlemek için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nin (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) web sitesinden edinilebilen "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) aracı kullanılarak tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

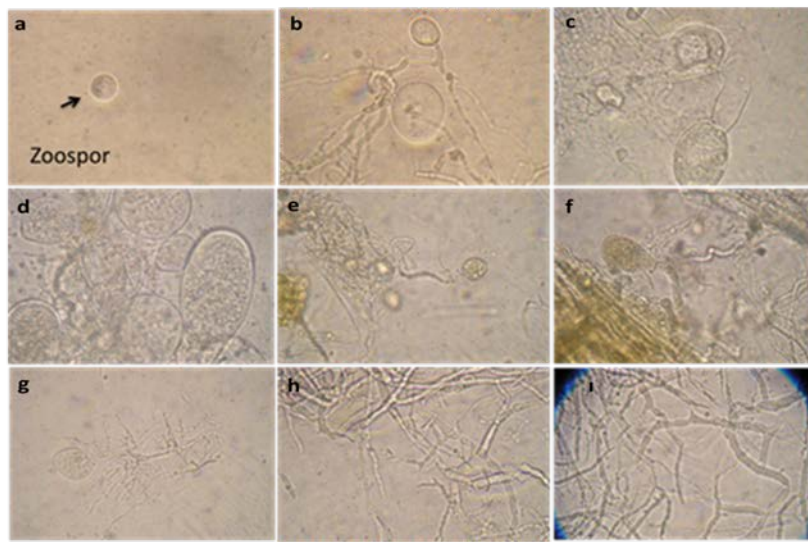
2.6.DNA dizi analizinin değerlendirilmesi ve filogenetik ağaçların elde edilmesi

DNA dizi analizinin değerlendirilmesi ve filogenetik ağaçların elde edilmesi; Hizmet alımı ile temin edilen istenilen bölgelere ait DNA dizileri ilk olarak Sequencher programı kullanılarak gözden geçirilmiş ve hatalı dizilenmiş nükleotitler kontrol edilerek düzeltilmiştir. Daha sonarında NCBI'da bulunan daha önceden dizilenmiş AGF ITS dizileri kullanılarak, MEGA X programı vasıtasıyla hizalanmış diziler nexus formatına çevrilmiştir. Dizi hizalaması yapıldıktan sonra hizalanan diziler, filogenetik ağaç

oluşturmada maksimum tutarlılık (MP) metodu kullanılarak konsensus ağaçları oluşturulmuştur. Ayrıca elde edilen diziler Blast yapılarak AGF'lerin moleküler tanımları gerçekleştirilmiştir (Şekil 5).

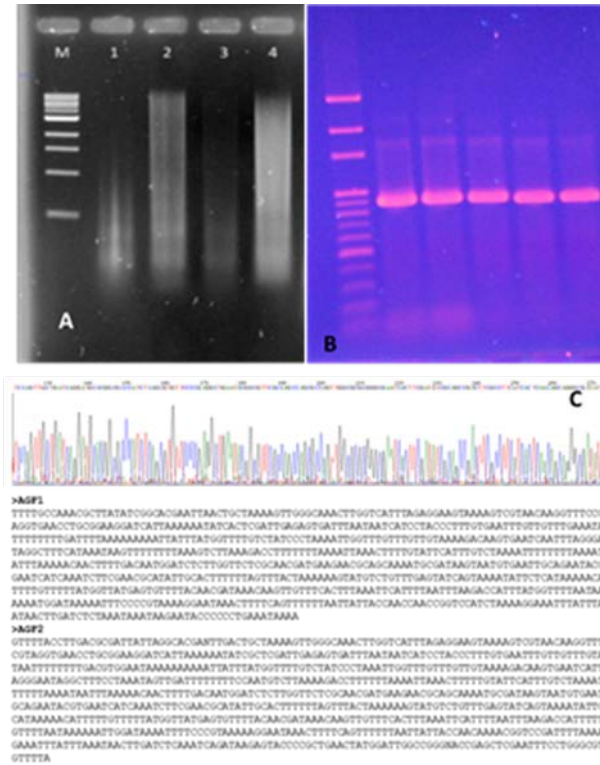
3. Bulgular ve Tartışma

Anaerobik funguslar, rumen mikrobiyal sistemini oluşturan önemli bir selüloolitik gruptur. Bu çalışmada Tuncelinin Ovacık ve Pülümür ilçesinden toplanan 11 farklı dağ keçisi dışkı örneğinden farklı cinslere ait sahip toplam 9 farklı izolat elde edilmiştir. Ağırlıklı olarak rumende baskın olarak bulunan *Neocallimastix* cinsine rastlanırken, *Feramyces* ve *Orpinomyces* cinslerinde belirlenmiştir. Agarlı rumen besiyerinde roll tube yapılarak büyüyen kolonilerden tek koloniler başarı ile elde edilmiştir ve başarıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış izolatların morfolojik karakterizasyonu mikroskopik inceleme ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2).

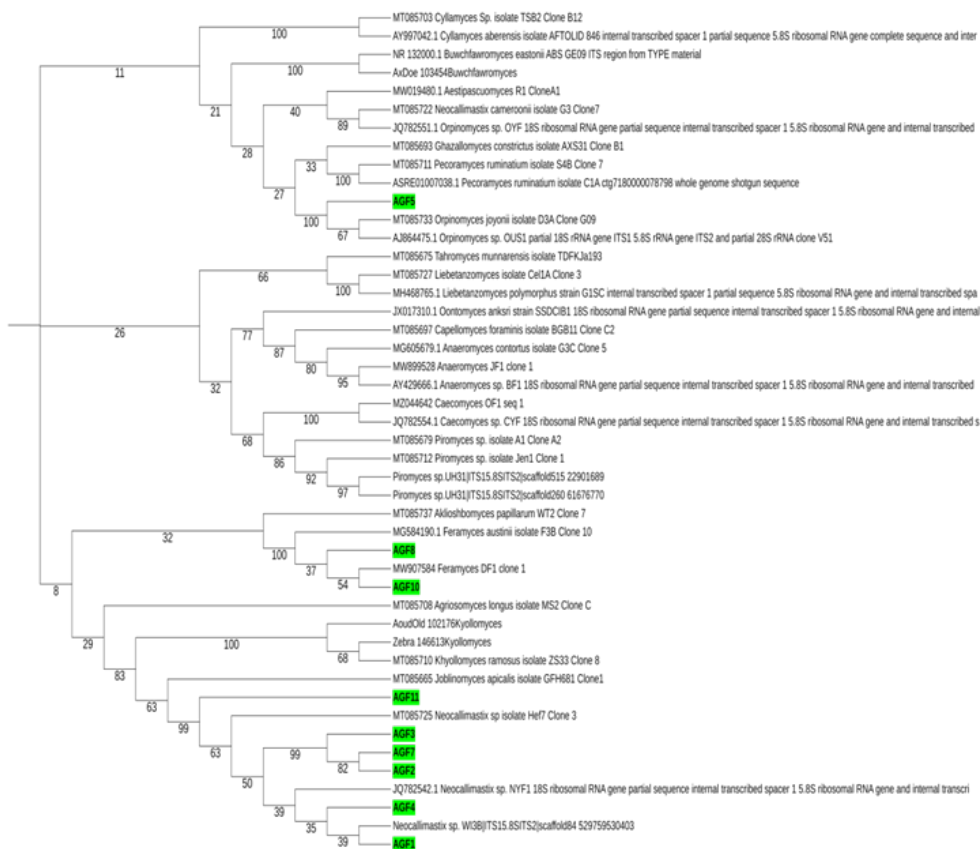


Şekil 2. İzole edilen bazı anaerobik gut fungusların mikroskop altındaki görüntüsü.

Saflaştırılmış izolatlardan elde edilen genomik DNA, ITS gen bölgesinin PCR amplifikasyonu ve dizilenmesi ile birlikte moleküler tanımlama için kullanılmıştır. Fungus DNA'larına ait PCR amplifikasyon bantları, Şekil 3'te gösterildiği gibi DNA markerı ile karşılaştırıldığında yaklaşık 1500 bp pozisyonunda UV transillüminatör altında agar jel elektroforezinde gözlenmiştir. ITS gen dizileri Chromas (sürüm 2.6.6) kullanılarak düzenlenmiş ve NCBI'da BLAST arama aracı kullanılarak analiz edilmiştir. Diziler NCBI veritabanındaki dizilerle karşılaştırarak fungus cinslerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. ITS gen dizi analizi, izolat AGF-1,2,3,4,7,11'in *Neocallimastix*, AGF-8,10'un *Feramyces*, AGF-5'in *Orpinomyces* olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4).



Şekil 3. PCR sonucu (A) ve DNA dizi verilerine ait kromatogram görüntüsü (B).



Şekil 4. Elde edilen AGF ITS DNA dizisi ile oluşturulmuş Neighbor-joining Bootstrap ağacı ITOL ile görselleştirilmiştir (Bu çalışmada elde edilen örnekler yeşil ile gösterilmektedir).

Tunceli’de yayılış gösteren dağ keçileri dışkılarından izole edilen ve tanımlanan AGF-1,2,8 ve 11 izolatları Ovacık bölgesinde bulunan keçi dışkılarından elde edilirken, AGF-3,4,5,7,8,10 izolatları ise Pülümür bölgesinde yayılış gösteren dağ keçilerinden elde edilmiştir. Bu izolatlardan *Neocallimastix* cinsine ait olan AGF 1,2,3,4,7,11 izolatları ruminantların rumeninde yaygın olarak bulunan ve ilk keşfedilen cinstir. AGF 5 izolatı da *Neocallimastix*’ten sonra ikinci keşfedilen anaerobik gut fungus olan *Orpinomyces* cinsine aittir. AGF 8 ve 10 izolatları ise son dönemlerde keşfedilen *Feramyces* cinsine aittir. Daha önce araştırılmamış olan ve doğal yaşam alanları halen korunmakta olan Tunceli dağ keçilerinden daha önce keşfedilmemiş yeni bir cins ortaya çıkma olasılığı yüksek görünmekte ve bu potansiyel için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anaerobik bağırsak mantar taksonlarının izolasyonu ve karakterizasyonundaki ilerleme son ~45 yıldır sürekli, ancak düzensiz bir süreç olmuştur. Bunların katı anaerobik doğası ve aşırı oksijen hassasiyeti, izolasyonları ve bakımları için anaerobik Hungate tekniklerinin [27, 28] ustalıkla kullanılmasını gerektirir. Ek olarak, çeşitli taksonlar için uzun vadeli depolama prosedürleri tanımlanmış olsa da [29–31], bunların etkililiği ve güvenilirliği suşlar arasında büyük ölçüde değişmektedir. Son olarak, yaşlanma sıklıkla gözlemlenmekte ve tekrarlanan alt kültürleme genellikle zoosporlara farklılaşmayan sporangia üretimine veya sporangia üretilmemesine yol açmaktadır [32]. Bu tür zorluklar, birden fazla tarihi suşun kaybına neden olmuştur ve birçok kültür koleksiyonunun *Neocallimastigomycota* izolatlarını muhafaza ve korumadaki yetersizliğiyle yansıtılmaktadır.

Orpin, 1976’da tek bir mantar suşu (*P. communis*) ile bir kültür elde ettiğini bildiren ilk kişiydi, ancak kültür aksenik değildi, bunun yerine karışık bir bakteri-mantar kültürüydü [33]. Anaerobik bağırsak mantarlarının saf bir kültür olarak başarılı bir şekilde izole edilmesi ilk olarak 1981’de *Sphaeromonas* ve *Piromonas* için at kör bağırsağından [34] ve *Neocallimastix* için inek rumeninden [35] bildirilmiştir. Heath ve arkadaşları [36], *Neocallimastix frontalis*’in saf bir kültürünün poliflagellat zoosporunun ultra yapısını tanımlamıştır [37]. Gold ve arkadaşları [38], iki soğanlı izolatı karakterize etmek için kamçılı ultra yapıyı ve yaşam döngüsü tanımını kullanmış ve daha önce *Sphaeromonas* olarak adlandırılan kamçılı yapılar için *Caecomycetes* adını önermiştir. Aynı el yazması, *Piromonas* yerine *Piromyces* adını da önermiş, ancak bu makalede *Piromyces* için hiçbir karakterizasyon bildirilmemiştir. *Piromyces* cinsi, yeni cins *Orpinomyces* ile birlikte ertesi yıl tanımlanmış [39] ve beşinci bir cins (*Anaeoromyces*) daha sonra 1990’da tanımlanmıştır [40]. Yeni cinslerin tanımlanmasında dikkate değer bir durgunluk yaşanmış ve bir sonraki çeyrek yüzyılda yalnızca bir cins (*Cyllamyces*) [41] tanımlanmıştır. Son zamanlarda, takson tanımlamasının hızında hızlı bir ivmelenme meydana gelmiş ve 2015’ten bu yana Hindistan, Çin, İngiltere, Almanya ve ABD’den 14 yeni cins tanımlanmıştır [42–48] [Şekil 1]. Bu tür bir genişleme, örneğin biyoyakıt [49], katma değerli ürünler [50] ve ikincil metabolitler [51] için anaerobik bağırsak mantarlarının biyoteknolojik potansiyelinin kullanılmasına olan yenilenen ilgiyle teşvik edilmiştir.

Mevcut çalışma yaban hayatta bulunan ve diğer ruminantlardan izole şekilde yaşayan Tunceli dağ keçilerinin rumeni içindeki AGF topluluğununa ait genel görünüm sunmaktadır. Dışkı örneklerinden elde edilmiş olsa da, yabani hayvanların rumen içindeki AGF topluluğuyla ilgili çalışmalar seyrek [52]. İkinci olarak, mevcut çalışma hayvanların bulunduğu coğrafya açısından hem endemik bitki örtüsü hem yaban hayatı hem de daha önce AGF topluluklarına ait ayrıntılı bir çalışma bulunmadığından, moleküler olarak tanımlanması ve sınıflandırılması açısından değerli kılacaktır.

Bulgularımız, küresel rumen mikobiyomu içindeki baskın cinslerin tıpkı evcil hayvanlarda olduğu gibi yabani hayvanlarda da olabileceğini göstermiştir. Daha da önemlisi, AGF rumen mikobiyomu topluluk kompozisyonu, nispeten sınırlı sayıda cinsin her yerde bulunduğu (örneklerin >%50'sinde meydana gelen) ve bol olduğu (karşılaşıldığında AGF topluluğunun büyük bir bölümünü temsil eden) bir örüntü sergilemiştir. Böylesine birkaç cinsin baskın olduğu bir örüntü, otçulların dışkı örneklerinde AGF'nin daha önce yapılan araştırmalara benzemektedir [53]. Vahşi doğada potansiyel olarak üstün hayatta kalma yeteneklerine belirli koşullar altında [örneğin, daha genç yaş, stres, belirli yem türleri] bulunan vahşi ruminantların AGF potansiyelleri farklı olmaması muhtemeldir [53]. Bu çalışma yabani hayvanlardaki AGF'lerinin yeni türlerinden ziyade yaygın görülen türlerin vahşi doğada yaygın olabileceğini göstermiştir. Son yapılan çalışmalarda bunu göstermektedir [54].

AGF taksonlarının genel görünüşünün ötesinde, rumen mikobiyomundaki çeşitlilik ve topluluk yapılarını açıklamaya çalıştık. Sonuçlarımız Meili ve ark, [54] ileri sürdüğü gibi örneğin keçilerde *Cacomyces*, *Orpinomyces*, *Cyllamyces* ve *Neocallimastix* ile, mandalarda *Orpinomyces* ile, Amerikan bizonu NY9 ile, antilop, geyik ve katır geyiği *Khoyollomyces* gibi örneklerle özgün cinsleri ilişkisini göstermiştir. AGF cins-hayvan türü ilişkisini göstermiştir. Daha önce önerildiği gibi [53], bu tür bir korelasyon, ortak evrimsel simbiyoz kalıbını (yani, mantarlar ve tercih ettikleri hayvan konakçıları arasında derin, yakın bir ortak evrimsel süreç) yansıtabilir. Alternatif olarak, bu tür tercihler, belirli bir hayvanda yaygın olan yerinde koşulların, ortakların evrimsel geçmişinden bağımsız olarak belirli taksonları seçtiği, evrim sonrası çevresel filtreleme sürecinin bir işlevi olabilir [54].

Meili ve ark, [54] vahşi otçullarda daha değişken yem tiplerinin ve monoton olmayan beslenme düzenlerinin, daha stokastik bir beslenme rejimine uygun daha çeşitli bir AGF topluluğunun zenginleşmesine ve bir arada var olmasına yol açabileceğini ileri sürmektedir. Ancak, incelenen tüm hayvan türlerinin ya sadece vahşi ya da evcilleştirilmiş olduğunu ve bu durumun her iki faktörün (hayvan türü ve evcilleştirme durumu) AGF çeşitliliği ve topluluk yapısının itici güçleri olarak potansiyel olarak birleşmesine yol açtığını belirtmek önemlidir [54].

Biyocoğrafya, daha önce rumen bakteri ve arkeal toplulukları için varsayıldığı gibi, AGF çeşitliliğini ve topluluk yapısını etkileyen ek bir faktör olabilir [55]. Bu çalışmada tanımlanan dağ keçilerindeki *Feramyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix* örneklerinden dikkat çeken *Feramyces* cinsidir. Diğer cinsler genel olarak tüm ruminantlarda yaygın bulunmaktadır. *Feramyces*'in biyocoğrafya açısından AGF'lerde popülasyonun şekillenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Benzer bir gözlemin, dışkı örneklerinin son küresel veri setinde de fark edildiğini belirtmek ilginçtir [53].

4. Sonuç

Anaerobik gut funguslar, özellikle bakterilerle karşılaştırıldığında, geniş getiren hayvanların beslenmesinde henüz tam olarak anlaşılamamış durumdadır. Yabani ruminatlarda bu durum daha da az düzeydedir. Bu açıdan bu çalışma ile yabani keçilerden izole edilen ve moleküler tanımlaması yapılan yeni bir çalışmadır. İzole edilen 9 fungustan AGF-5 *Orpinomyces*, AGF-8,10 *Feramyces* ve AGF-1,2,3,4,7,11'inde *Neocallimastix* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, AGF, işkembedeki bitki hücre duvarı bozulması için olağanüstü bir öneme sahiptir; ancak AGF, yalnızca fibrolizle ilgili olmaktan ziyade, metan oluşumu ve konakçıya besin sağlanması gibi geniş getiren hayvan beslenmesinin diğer yönlerinde de anahtar öneme sahip gibi görünmektedir. Sonuç olarak, ileriye dönük ruminant beslenme çalışmalarında AGF'nin daha fazla vurgulanarak dikkate alınması ihtiyatlı ve aynı

zamanda gecikmiş görünmektedir. Aslında bu mikroorganizmalar, geniş getiren hayvanların beslenmesinde mevcut bilgilerle açıklanamayan açık soruların açıklığa kavuşturulmasına muhtemelen katkıda bulunabilir. Ruminant beslemede uygulama seçeneklerine bakıldığında AGF'nin yem katkı maddesi olarak kullanılabileceği gibi silaj üretiminde de kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle gelecek araştırma girişimleri, AGF'nin bağırsaktaki rolünü daha iyi anlamak ve uygulama potansiyelinden en iyi şekilde nasıl yararlanılacağını, böylece yarının ruminant beslenmesini nasıl şekillendireceğini anlamak için AGF'nin incelenmesini takip etmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK 2209/A - Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında desteklenmiştir. Bu bakımdan yazarlar, TÜBİTAK'a teşekkür eder.

Yazarlar, *International Journal of Pure and Applied Sciences* dergisinin hakemlerine ve dergi kurullarına teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu çalışmada çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir. Çalışma, tüm yazarların katkılarıyla yazılmıştır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yazar(lar), çalışmanın tüm süreçlerinde *International Journal of Pure and Applied Sciences* dergisinin bilimsel, etik ve atıf kurallarına uyduklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

- [1] T.J. Hackmann ve J.N. Spain. "Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production", *J Dairy Sci*, 93:1320–1334, 2010, doi: [10.3168/jds.2009.2071](https://doi.org/10.3168/jds.2009.2071)
- [2] J.E. Decker vd., "Resolving the evolution of extant and extinct ruminants with high-throughput phylogenomics", *Proc Natl Acad Sci, USA* 106:18644–18649, 2009, doi: [10.1073/pnas.0904691106](https://doi.org/10.1073/pnas.0904691106)
- [3] R. Heller, P. Frandsen, E.D. Lorenzen ve H.R. Siegmund, "Are there really twice as many bovid species as we thought? ", *Syst Biol* 62:490–493, 2013, doi: [10.1093/sysbio/syt004](https://doi.org/10.1093/sysbio/syt004)
- [4] R.J. Gruninger vd., "Anaerobic fungi [Phylum Neocallimastigomycota]: advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential", *FEMS Microbiol Ecol*, 90:1–17, 2014, doi: [10.1111/1574-6941.12383](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12383)
- [5] M. Yan vd., "Interrogating the viral dark matter of the rumen ecosystem with a global virome database" *Nat Commun* 14:5254, 2023, doi: [10.1038/s41467-023-41075-2](https://doi.org/10.1038/s41467-023-41075-2)
- [6] M.B. Couger vd., "Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A", *Biotechnol Biofuels*, 8:208, 2015, doi: [10.1186/s13068-015-0390-0](https://doi.org/10.1186/s13068-015-0390-0)
- [7] L.H. Hagen vd., "Proteome specialization of anaerobic fungi during ruminal degradation of recalcitrant plant fiber" *ISME J*, 15:421–434, 2021, doi: [10.1038/s41396-020-00769-x](https://doi.org/10.1038/s41396-020-00769-x)
- [8] N.H. Youssef vd., "The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader" *Appl Environ Microbiol* 79:4620–4634, 2013, doi: [10.1128/AEM.00821-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00821-13)

- [9] R. Elliott *vd.*, “The influence of anaerobic fungi on rumen volatile fatty acid concentrations in vivo,” *J Agric Sci* 109:13–17, 1987, doi: 10.1017/ S0021859600080928
- [10] S.A. Huws *vd.*, “ Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future” *Front Microbiol* 9:2161, 2018, doi: [10.3389/fmicb.2018.02161](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161)
- [11] U. Comlekcioglu *vd.*, “Effects of carbon sources on enzyme production of *Neocallimastix* sp. and *Orpinomyces* sp.” *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 18: 799–806, 2012
- [12] M. S. Elshahed *vd.*, “ Characterization and rank assignment criteria for the anaerobic fungi [Neocallimastigomycota]”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72[7], 005449, 2022.
- [13] F. C. Yazdıç *vd.*, “Anaerobik funguslarda hidrojenozomlar: Hidrojen üreten organeller”. *Mantar Dergisi*, 12(2), 190-208. 2021.
- [14] D. A. Wubah, M. S. Fuller ve D. E. “Akin Resistant body formation in *Neocallimastix* sp., an anaerobic fungus from the rumen of a cow, ” *Mycologia*, 83(1), 40-47. (1991).
- [15] S. S. Calkins *vd.*, “Development of an RNA interference (RNAi) gene knockdown protocol in the anaerobic gut fungus *Pecoramyces ruminantium* strain C1A,” *PeerJ*, 6, e4276. 2018.
- [16] C.A. Hooker *vd.*, “A genetic engineering toolbox for the Lignocellulolytic anaerobic gut fungus *Neocallimastix frontalis*,” *ACS Synth. Biol*, 12, 1034–1045. doi: 10.1021/ acssynbio.2c00502. (2023).
- [17] J.K. Henske *vd.*, “Biomass-degrading enzymes are catabolite repressed in anaerobic gut fungi,” *AICHE J.* 64, 4263–4270. doi: [10.1002/aic.16395](https://doi.org/10.1002/aic.16395). (2018a).
- [18] R. J. Gruninger *vd.*, “Anaerobic Fungi [Phylum Neocallimastigomycota]: Advances in Understanding Their Taxonomy, Life Cycle, Ecology, Role and Biotechnological Potential, ” *FEMS microbiology ecology*, 90(1), 1-17. (2014).
- [19] J. E. Edwards *vd.*, “PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities,” *Frontiers in microbiology*, 8, 1657. (2017).
- [20] R.A. Hanafy, B. Johnson, M.S. Elshahed ve N.H. Youssef, “*Anaeromyces contortus*, sp. nov., a new anaerobic gut fungal species [Neocallimastigomycota] isolated from the feces of cow and goat,” *Mycologia*, 110[3], 502-512. (2018).
- [21] A. Joshi, *vd.*, “*Liebetanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus [Neocallimastigomycota] isolated from the rumen of a goat,” *MycoKeys*, (40),89. (2018).
- [22] C. J. Pratt, E. E. Chandler, N. H. Youssef ve M. S. Elshahed, “*Testudinomyces gracilis* gen. nov, sp. nov. and *Astrotestudinomyces divisus* gen. nov, sp. nov., two novel, deep-branching anaerobic gut fungal genera from tortoise faeces,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(5), 005921. (2023).
- [23] C. G. Orpin, “Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*,” *Microbiology*, 94(2), 270-280. (1976).
- [24] A.Karaman, H. Yücel, K. Ekinci ve S. Cömertpay, “Comparing Cellulotic Enzyme Activities of *Neocallimastix* sp. in Orpin’s and Menke’s Media,” *Mantar Dergisi*, 13(1), 55-61. (2022).
- [25] C. Orpin, “Taxonomy, biology, and distribution in nature. anaerobic fungi: biology, ecology, and function (M),” NY: Marcel Dekker Inc, 6-19. (1994).

- [26] R. A. Hanafy vd., "Taxonomy of the anaerobic gut fungi [Neocallimastigomycota]: a review of classification criteria and description of current taxa," *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 72(7), 005322. (2022).
- [27] M.P. Bryant, "Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria," *Am J Clin Nutr*;25:1324–1328. (1972).
- [28] R.E. Hungate, "A roll tube method for cultivation of strict anaerobes," *Meth Microbiol*;3:117–132. (1969)
- [29] S. Calkins, N.C. Elledge, R.A. Hanafy, M.S. Elshahed ve N. A. Youssef, "Fast and reliable procedure for spore collection from anaerobic fungi: Application for RNA uptake and long-term storage of isolates," *J Microbiol Methods*;127:206–213. (2016).
- [30] K.V. Solomon, J.K. Henske, M.K. Theodorou ve M.A. O'Malley, "Robust and effective methodologies for cryopreservation and DNA extraction from anaerobic gut fungi," *Anaerobe* 2016;38:39–46. (2016).
- [31] R. Nagpal, A.K. Puniya, J.P. Sehgal ve K. Singh, "Survival of anaerobic fungus *Caecomyces* sp. in various preservation methods: a comparative study," *Mycoscience*;53:427–432. (2012).
- [32] Y.W. Ho ve D.J.S. Barr, "Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia". *Mycologia*;87:655–677. (2018)
- [33] C.G. Orpin "The rumen flagellate *Pirimonas communis*: its life-history and invasion of plant material in the rumen," *J Gen Microbiol*;99:107–117. (1977)
- [34] C.G. Orpin "Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse" *J Gen Microbiol*;123:287–296. (1981).
- [35] K.N. Joblin "Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes," *Appl Environ Microbiol*;42:1119–1122. (1981).
- [36] I.B. Heath, T. Bauchop ve R.A. Skipp, "Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales [Chytridiomycetes] on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure," *Can J Bot*;61:295–307. (1983).
- [37] D.J.S. Barr, "The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoosporic fungi" *Biosystems*;14:359–370. (1981).
- [38] J.J. Gold, I.B. Heath ve T. Bauchop, "Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomyces equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimasticaceae," *Biosystems*;21:403–415. (1988).
- [39] D.J. Barr, H. Kudo, K.D. Jakober ve K.J. Cheng, "Morphology and development of rumen fungi: *neocallimastix* sp., *ppiromyces communis*, and *oorpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov." *Can J Bot* ;67:2815–2824. (1989).
- [40] A. Breton vd., "Anaeromyces mucronatus nov. gen., nov. sp. a new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus," *FEMS Microbiol Lett*;70:177–182. (1990).
- [41] E. Ozkose, B.J. Thomas, D.R. Davies, G.W. Griffith ve M.K. Theodorou, "*Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle," *Can J Bot*, 79:666–673. (2001)
- [42] R.A. Hanafy, M.S. Elshahed, A.S. Ligginstoffer, G.W. Griffith ve N.H. Youssef, "*Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep," *Mycologia*, 109:231–243. (2017).

- [43] S.S. Dagar *vd.*, “A new anaerobic fungus [*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.] from the digestive tract of the Indian camel [*Camelus dromedarius*],” *Fungal Biol*, 119:731–737. (2015)
- [44] T.M. Callaghan *vd.*, “*Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus [*Neocallimastigomycota*] isolated from buffalo faeces,” *MC*;9:11–28. (2015)
- [45] R.A. Hanafy *vd.*, “Seven new *Neocallimastigomycota* genera from wild, zoo- housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum,” *Mycologia*;112:1212–1239. (2020).
- [46] R.A. Hanafy, M.S. Elshahed ve N.H. Youssef, “*Feromyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer,” *Mycologia*;110:513–525. (2018).
- [47] R.A. Hanafy, N.H. Youssef ve M.S. Elshahed, “*Paucimyces polynucleatus* gen. nov, sp. nov., a novel polycentric genus of anaerobic gut fungi from the faeces of a wild blackbuck antelope,” *Int J Syst Evol Microbiol*;71:004832. (2021).
- [48] M. Stabel *vd.*, “*Aestipascuomyces dupliciliberans* gen. nov, sp. nov., the first cultured representative of the uncultured SK4 clade from aoudad sheep and alpaca,” *Microorganisms*, 8:1734. (2020).
- [49] A. Ranganathan *vd.*, “Utilizing anaerobic fungi for two- stage sugar extraction and biofuel production from lignocellulosic biomass,” *Front Microbiol*;8:635. (2017).
- [50] E.T. Hillman *vd.*, “Hydrolysis of lignocellulose by anaerobic fungi produces free sugars and organic acids for two- stage fine chemical production with *Kluyveromyces marxianus*,” *Biotechnol Prog*;37:e3172. (2021).
- [51] C.L. Swift *vd.*, “Anaerobic gut fungi are an untapped reservoir of natural products,” *Proc Natl Acad Sci USA*;118:e2019855118. (2021).
- [52] H. Huuki *vd.*, “Long-term effects of early-life rumen microbiota modulation on dairy cow production performance and methane emissions,” *Front Microbiol* 13:983823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983823>(2022).
- [53] C.H. Meili *vd.*, “Patterns and determinants of the global herbivorous mycobiome,” *Nat Commun* 14:3798. doi: [10.1038/s41467-023-39508-z](https://doi.org/10.1038/s41467-023-39508-z) (2023).
- [54] C. H. Meili *vd.*, “Diversity and community structure of anaerobic gut fungi in the rumen of wild and domesticated herbivores,” *Applied and Environmental Microbiology*, 90(2), e01492-23. [2024].
- [55] C.G. Orpin “The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life- history and invasion of plant material in the rumen,” *J Gen Microbiol*;99:107–117. (1977)