



Geliş(Received) :27/02/2017  
Kabul(Accepted) :06/12/2017

Araştırma Makalesi  
DOI:10.30708/mantar.295146

## Saf Kültür Olarak Stoklanmış Bazı Mikrofungusların ITS, Beta-tubulin ve Aktin Gen Dizilerine Göre Moleküler Tanısı

Elçin TUNEY<sup>1</sup>, Ahmet ASAN\*<sup>2</sup>, Burhan ŞEN<sup>2</sup>

\*Sorumlu yazar: ahmetasan84@gmail.com

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Edirne

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Edirne

**Öz:** Bu çalışmada, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında saf kültür olarak stoklanmış bununla beraber; cins veya tür düzeyinde morfolojik olarak teşhis edilemeyen bazı mikrofunguslar moleküler olarak tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan mikrofunguslar daha önce tür düzeyinde morfolojik olarak tanımlanamamış izolatlardan oluşmuştur. Örnekler, MEA besiyerine ekilip 25°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Besiyerinden alınan örnekler, analiz yapılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu için funguslara özel, kimyasal (SDS ve CTAB), biyokimyasal (proteinazK vb.) ve fiziksel (0.1 mm çaplı boncuklar) parçalama yöntemlerini bir arada kullanan DNA izolasyon kitleri kullanılmıştır. Çeşitlilik çalışmaları, PCR tabanlı fungal çeşitlilik çalışma kitleri ile yapılmıştır. Tüm izolatlar için ITS gen dizisi kullanılmış, cinse bağlı olarak  $\beta$ -tubulin ve Aktin gen dizilimlerini hedeflenmiştir. PCR ile çoğaltılan DNA dizilimleri "Sanger Sequencing Yöntemi" ile dizilenmiştir. Elde edilen dizilerin hangi organizmalara ait olduğu NCBI ve EBI gibi uluslararası nükleik asit data bankalarında mevcut dizilimlerle, elde edilen filotiplerin dizilimleri karşılaştırılarak belirlenmiştir. Toplam 61 mikrofungus örneği, cins düzeyinde 3 gruba (A,B,C) ayrılmış olup, gruplara göre ilgili gen bölgeleri moleküler teşhis için analiz edilmiştir. 3 grup için hem ilgili gen bölgeleri hem de ITS bölgeleri baz alınarak yapılan moleküler analizler sonucunda, 6 örneğin tür teşhisi yapılamamış, 56 tür moleküler düzeyde teşhis edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Beta-tubulin gen dizisi, Aktin gen dizisi, ITS gen dizisi, PCR, sekans yöntemleri, mikrofungusların moleküler teşhisi

### Molecular Based Identification of Some Stocked Microfungi as pure culture according to ITS, Beta-tubulin and Actin Genes

**Abstract:** Some microfungi deposited in laboratory as pure culture and unidentified morphologically as genus or species level and these fungi were identified by molecular methods in study. The used microfungi were comprised unidentified species and can not be identify as colonially and morphologically previously. We used ITS gene for all isolates, also according to the genus we used beta-tubulin and actin genes targeting PCR based fungal biodiversity working kits. DNA sequences were sequenced by Sanger Method, and obtained sequences were analysed as bioinformatics and completed filogenetically analysis. Then samples inoculated to MEA at 25°C for 7 days. All samples obtained from MEA media were preserved at -20°C until analysis. For DNA isolation were used the spesific kits, using together digestion method such as chemical (SDS and CTAB), biochemical (proteinaseK etc.) and physical (beat with 0.1 mm diameter) were used for DNA isolation. DNA's maintained in silica colones. In the last stage of isolation, nucleic acides were dissolved in the water DNase/Pyrogen free. After that, sequence series analysed on spectrophotometer and so determined, purity of DNA. Studies of diversity is made with PCR based fungal biodiversity working kits. After the PCR application, DNA series sequenced using by "Sanger-Sequencing Protocol". Sequence series found that belong to which organisms on NCBI and EBI. After that, phlotypes were compared with similar organisms. A total of 61 Microfungi samples , the genus level 3 groups (A, B, C) is divided , according to group related gene regions were analyzed for molecular diagnostics. Both gene regions related to 3 groups based on the results of molecular analyzes of ITS , 6 species diagnosis has not been made , for example , 56 species have been identified at the molecular level .

**Key words:** Beta-tubulin region, Aktin region, ITS region, PCR, sequencing methods, identification of microfungi



## Giriş

Mikrofungusların tanısı, uzun süre üreme yapıları temellenmiş, morfolojik ve koloniyal özellikler önemli taksonomik kriterler olarak ele alınmıştır. Fosil kayıtların yetersizliği, fungal gruplar arasındaki filogenetik ilişkilerin kurulmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle fungal sistematik çok uzun süre (hatta halen), yaşamakta olan fungusların fenotipik özellikleri (*üreme yapıları, morfolojileri, spor şekilleri, koloniyal özellikler*) üzerine kurulmuştur. Özellikle eşeyssel üreme yapıları taksonomide çok önemlidir ancak her fungus eşeyli olarak ürememektedir. Bu nedenle fungal taksonomide genellikle tartışmalı bir durum olagelmıştır. Ancak özellikle 1983'de Kary MULLIS tarafından PCR'in keşfedilmesiyle birlikte (Wessner ve Ark., 2013), funguslarla ilgili moleküler çalışmalar inanılmaz bir hız kazanmış ve fungal taksonomi ile ilgili son derece önemli yeni bilgiler ortaya çıkmıştır. Levetin (2016)'e göre 1995-2015 yılları arasındaki 20 yılda, DNA sekanslamasıyla 8 fungal filum ile ilgili çözüm üretilmiştir, bunlardan üçü, önemli aeroellerjenler içeren Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycotadır ve sonuçta Deuteromycetes iptal edilmiş, yapışkan küfler (Myxomycetes) ve su küfleri (Oomycetes) gibi fungus benzeri organizmalar diğer alemlere aktarılmıştır. Moleküler çalışmalar, fungal taksonomik sorunları % 100 çözmekle birlikte çok önemli katkılar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yeni taksonlar (filum, genus, v.s.) önerilmektedir. Fungal moleküler çalışmalarda ITS bölgesi fungusların tanısı için önemli bir bölge olmasına rağmen, bazen tanı için yeterli olmamakta ve başka gen bölgelerinin çalışılmasına ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu çalışmada, laboratuvar ortamında saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofungusların ITS, Beta-tubulin ve Actin gen dizilerine göre moleküler tanısının yapılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırma materyali, Edirne ev içi ortamından izole edilmiş ve Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında saf kültür olarak stoklanmış bazı mikrofunguslardır. Bununla beraber mikrofungus örnekleri ilgili gen bölgelerine göre 3 gruba ayrılmıştır. A grubunu oluşturan mikrofungus örnekleri 23 adet, B grubunu oluşturan mikrofungus örnekleri 35 adet, C grubunu oluşturan mikrofungus örnekleri ise 5 adettir. Toplam örnek sayısı 61 adettir. A grubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için "actin" gen bölgesine, B grubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için "beta-tubulin" gen bölgesine, C grubu mikrofungus örneklerinin moleküler teşhisi için ise hem "actin" hem

"beta-tubulin" gen bölgelerine bakılmış aynı zamanda her üç grup için de ITS gen bölgesine bakılmıştır.

## Mikrofungusların Moleküler Tanısı

Toplam 61 mikrofungus örneği için ilk aşama olarak DNA izolasyonu yapılmıştır, ardından Q-PCR ile actin ve beta-tubulin gen bölgelerine özgü primerlerle beraber örnekler çoğaltılmıştır.

Moleküler tanı için son aşama olarak da, dizi analizi ve filogenetik analiz yapılmıştır.

## DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit protokolü şu şekildedir; Bir mikrofün tüpüne 400 µl Guanidinium thiocyanate (0.1 M Tris; pH 7.5) eklenmiş, daha sonra katı besi yerinden alınan fungi kolonileri kolonisi tamponun içine bırakılmıştır. Numune vorteksle 1 dk 3000 RPM'de karıştırılmıştır ve daha sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Numune vorteksle 1 dk 3000 rpm karıştırıldıktan sonra tüp 14000 RPM'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvıya 200 µl isopropanol eklenmiş, iyice karıştırılmıştır. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 1-2 dk beklenmiş ve 12000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 12000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır. Kolon 12000 RPM de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir. Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

## Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Fungal Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit fungal 18S rRNA'nın 3' ucu kısmi dizisi, ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 bölgesinin tümü ve 28S rRNA'nın 5'ucu kısmi dizisi bölgesini hedefleyen forward 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' ve reverse 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' primerlerini, β-tubulin genini hedefleyen forward 5'-TGG GCY AAG GGT YAY TAY AC-3' ve reverse 5'-GGR ATC CAY TCR ACR AA-3' primerlerini ve aktin genini hedefleyen 5'-TGG GAY GAY ATG GAN AAN ATH TGG CA-3' ve reverse 5' TCN TCG TAT NCT NGC TNN GAN ATC CAC AT-3' primerlerini içermektedir.



Bütün reaksiyonlarda Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 4 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu

sağlanmış Tablo 1'de verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 98°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları CFX Manager Software 3.0'da analiz edilmiştir.

Tablo 1. PCR şartları

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 μl		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	45	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
<i>Ön İnkübasyon</i>				
95		00:10:00	4,8	–
<i>Çoğalma</i>				
95		00:00:15	4,8	–
53		00:00:15	2,5	–
72	Tek	00:00:30	4,8	–
<i>Erime Eğrisi</i>				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	0.5	10
<i>Soğuma</i>				
40	Tek	00:00:30	2,5	–



### Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

İlgili genlerden elde edilen fungal amplikonların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir.

Dizi analizi ileri primerler kullanılarak, tek yönlü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler 4peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile analiz edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir.

### PCR

PCR 1 döngü 10 dakika 95°C; 45 döngü 15 saniye 95°C, 15 saniye 53°C ve 30 saniye 72°C koşullarında gerçekleştirilmiştir. 72°C inkübasyon adımı sonunda SYBR Green tespit formatında her kuyucukta floresan ışığa okunmuştur. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 98°C arasında, 0.5 °C/s rampa hızıyla sıcaklık artırılıp sürekli SYBR Green tespit formatında okuma yapılarak erime eğrisi analizi yapılmıştır.

### Sonuçlar

Toplam 61 mikrofungus örneğinin moleküler tanısı için yapılan DNA izolasyonu, Q-PCR ile örneklerin çoğaltılması, dizi analizi ve filogenetik analizler sonucunda ortaya çıkan mikrofungusların "Actin ve ITS" gen bölgelerine göre "Maksimum Identification" ları baz alınarak, tür karşılaştırılması yapılmış ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Aynı şekilde "Beta-tubulin ve ITS" gen bölgelerine göre yine "Maksimum Identification" baz alınarak mikrofungus türlerinin karşılaştırılması yapılmış ve tabloda gösterilmiştir (Tablo 3). Karşılaştırma tablosunun ardından, mikrofungus türlerinin akrabalık düzeyini belirtmek ve incelemek amaçlı filogenetik ağaçlar çizilmiştir. Fungal cinslerin ilgili fen bölgeleri göz önüne alınarak çizilen filogenetik ağaçlar, Şekil 1-7 arasında belirtilmiştir.

### Tartışma

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin daha eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük kolaylıklar

sağlamaktadır (Abacı ve Haliki, 2005; Bridge ve Arora, 1998). PCR, moleküler biyolojide geniş uygulama alanı ile güçlü bir yöntem olup, bu sayede her bir diziyi klonlayabilme, analiz ve modifiye edebilme ve hatta nadir dizileri bile saptayabilmeyi sağlamıştır. Bu nedenle PCR; fungal genetik, toprak mikrobiyolojisi, medikal mikoloji, biyoteknoloji gibi mikolojinin pek çok ayrı dalında geniş uygulamaları kullanılmaktadır. PCR amplifikasyonu DNA dizisine dayalı bilgiler sağladığından, bugüne kadar fenotipik olarak tanımlanmış türlerin doğrulamasını yapmıştır (Takamatsu, 1998). PCR, hassasiyeti ve spesifikliği nedeniyle fungusların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Fungusların ayırımı için PCR temelli analiz yöntemleri, spesifik primerlerin dizayn edilmesini gerekli kılmıştır. Bununla beraber, en azından hedef DNA bölgesinin bir kısmının bilinmesi gereklidir ki, bu durum hedef genin seçimini sağlayacağından PCR bazlı analizler için oldukça anlamlı olacaktır (Manian ve Ark., 2001).

rRNA dizileri, yaşayan tüm hücrelerde bulunduğu ve aynı görevi üstlendiğinden, taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu dizilerin evriminin; tüm genomun evrimini yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgeler de içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayırımlarında kullanılmaktadır. Funguslarda nuklear rDNA, arka arkaya tekrar eden rDNA alt birimleri olarak organize olmuşlardır. Birinci alt birim küçük nuklear 18S rRNA, 5,8S rRNA ve büyük nuklear 28S rRNA genlerini içermektedir Birinci alt birimde genler ITS1 (internal transcribed spacer) ve ITS2 ile ayrılmıştır ve iki alt birim IGS (intergenic spacer) ile ayrılmıştır. Son rRNA geni (5S) fungal taksona bağlı olarak, tekrarlanmış alt birimler ile birlikte olabilir veya olmayabilir. 18S rDNA, nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir genustaki fungal türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir (Edel, 1998). Tanısal PCR'ın spesifikliğinde amplifikasyon için uygun hedef dizinin belirlenmesi gerekmektedir. Spesifiklik, farklı genuslar veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir.



Tablo 2. Mikrofungusların Actin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması

Kod	Tür/ITS	Tür Accession Number	Eşleşen Tür	Tür Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür Accession Number
A1	<i>Alternaria alternata</i>	KY921915	<i>Alternaria Alternata</i>	557/559(99%)	KC139494.1
A2	<i>Alternaria alternata</i>	KY921916	<i>Alternaria Alternata</i>	552/559(99%)	KJ739880.1
A3	<i>Lewia infectoria</i>	KY921917	<i>Lewia infectoria</i>	579/586(99%)	AY154690.1
A4	<i>Alternaria alternata</i>	KY921918	<i>Alternaria sp.</i>	563/568(99%)	KC139464.1
A5	<i>Alternaria alternata</i>	KY921919	<i>Alternaria alternata</i>	557/565(99%)	KJ739880.1
A6	<i>Alternaria alternata</i>	KY921920	<i>Alternaria alternata</i>	552/561(98%)	KJ739880.1
A7	<i>Alternaria alternata</i>	KY921921	<i>Alternaria alternata</i>	563/572(98%)	KJ739874.1
A8	<i>Alternaria alternata</i>	KY921922	<i>Alternaria alternata</i>	558/562(99%)	KJ739880.1
A9	<i>Alternaria alternata</i>	KY921923	<i>Alternaria alternata</i>	565/569(99%)	KJ739874.1
A10	tür tespit edilememiştir				
A11	tür tespit edilememiştir				
A12	<i>Cladosporium herbarum</i>	KY921924	<i>Cladosporium sinuosum</i>	537/544(99%)	KX674647.1
A13	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921925	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	538/541(99%)	EU272531.1
A14	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921926	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	537/541(99%)	EU272531.1
A15	tür tespit edilememiştir				
A16	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921927	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	537/541(99%)	EU272491.1
A17	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921928	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	540/547(99%)	EU272531.1
A18	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921929	<i>Cladosporium sp.</i>	532/536(99%)	LN834410.1
A19	tür tespit edilememiştir				
A20	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY921930	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	539/543(99%)	EU272531.1
A21	tür tespit edilememiştir				
A22	tür tespit edilememiştir				
A23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KY921931	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	540/546(99%)	EU272532.1
C1	tür tespit edilememiştir				
C2	tür tespit edilememiştir				
C3	tür tespit edilememiştir				
C4	tür tespit edilememiştir				
C5	<i>Aspergillus terreus</i>	KY926855	<i>Aspergillus terreus</i>	585/588(99%)	FJ011538.1



Tablo 2. Devamı

Kod	Tür/ACTİN	Tür Accession Number	Tür Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür	Eşleşen Tür Accession Number
A1	<i>Alternaria alternata</i>	KY930577	815/838(97%)	<i>Alternaria alternata</i>	AY748985.1
A2	tür tespit edilememiştir				
A3	tür tespit edilememiştir				
A4	<i>Alternaria alternata</i>	KY930578	713/729(98%)	<i>Alternaria Alternata</i>	AY748985.1
A5	<i>Alternaria alternata</i>	KY930579	757/776(98%)	<i>Alternaria Alternata</i>	AY748985.1
A6	<i>Alternaria alternata</i>	KY930580	717/723(99%)	<i>Alternaria Alternata</i>	AY748985.1
A7	<i>Alternaria alternata</i>	KY930581	669/674(99%)	<i>Alternaria Alternata</i>	AY748985.1
A8	tür tespit edilememiştir				
A9	<i>Alternaria alternata</i>	KY930582	728/741(98%)	<i>Alternaria Alternata</i>	AY748985.1
A10	<i>Cladosporium herbarum</i>	KY930583	602/624(96%)	<i>Cladosporium herbarum</i>	AJ300315.1
A11	tür tespit edilememiştir				
A12	tür tespit edilememiştir				
A13	tür tespit edilememiştir				
A14	<i>Cladosporium oxysporium</i>	KY930584	679/710(96%)	<i>Cladosporium oxysporium</i>	AJ300311.1
A15	<i>Cladosporium herbarum</i>	KY930585	732/734(99%)	<i>Cladosporium herbarum</i>	AJ300323.1
A16	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY930586	684/712(96%)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300324.1
A17	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY930587	698/726(96%)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300324.1
A18	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY930588	732/735(99%)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300324.1
A19	tür tespit edilememiştir				
A20	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KY930589	748/779(96%)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300324.1
A21	<i>Cladosporium herbarum</i>	KY930590	735/735(100%)	<i>Cladosporium herbarum</i>	AJ300315.1
A22	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KY930591	768/773(99%)	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AJ300329.1
A23	tür tespit edilememiştir				
C1	tür tespit edilememiştir				
C2	tür tespit edilememiştir				
C3	tür tespit edilememiştir				
C4	tür tespit edilememiştir				
C5	tür tespit edilememiştir				

Tablo 3. Mikrofungusların  $\beta$ -tubulin ve ITS gen bölgelerine göre karşılaştırılması

Kod	Tür/ITS	Tür Accession Number	Eşleşen Tür	Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür Accession Number
B1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY921932	<i>Metarhizium anisopliae</i>	565/567(99%)	KU965593.1
B2	<i>Penicillium glabrum</i>	KY921933	<i>Penicillium glabrum</i>	559/565(99%)	KJ475813.1
B3	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY921934	<i>Metarhizium anisopliae</i>	567/571(99%)	KU965593.1
B4	<i>Penicillium commune</i>	KY921935	<i>Penicillium commune</i>	566/570(99%)	DQ132814.1
B5	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921936	<i>Penicillium brevicompactum</i>	568/575(99%)	LT558911.1
B6	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921937	<i>Penicillium brevicompactum</i>	570/578(99%)	LT558911.1
B7	<i>Penicillium citrinum</i>	KY921938	<i>Penicillium citrinum</i>	535/538(99%)	LT558897.1
B8	<i>Penicillium glabrum</i>	KY921939	<i>Penicillium glabrum</i>	561/564(99%)	KU847871.1
B9	<i>Penicillium glabrum</i>	KY921940	<i>Penicillium glabrum</i>	568/575(99%)	KU847871.1
B10	tür tespit edilememiştir				
B11	tür tespit edilememiştir				
B12	<i>Penicillium charlesii</i>	KY921941	<i>Penicillium charlesii</i>	540/556(97%)	KY859386.1
B13	tür tespit edilememiştir				
B14	tür tespit edilememiştir				
B15	<i>Penicillium commune</i>	KY921942	<i>Penicillium commune</i>	570/574(99%)	KC009833.1
B16	<i>Penicillium commune</i>	KY921943	<i>Penicillium commune</i>	567/573(99%)	KC009831.1
B17	<i>Penicillium griseofulvum</i>	KY921944	<i>Penicillium griseofulvum</i>	538/542(99%)	KP663722.1
B18	<i>Penicillium citrinum</i>	KY921945	<i>Penicillium citrinum</i>	539/547(99%)	LT558897.1
B19	<i>Penicillium griseofulvum</i>	KY921946	<i>Penicillium griseofulvum</i>	541/546(99%)	KC110617.1
B20	<i>Penicillium citrinum</i>	KY921947	<i>Penicillium citrinum</i>	538/539(99%)	LT558885.1
B21	<i>Penicillium glabrum</i>	KY921948	<i>Penicillium glabrum</i>	564/570(99%)	KU847871.1
B22	<i>Penicillium freii</i>	KY921949	<i>Penicillium freii</i>	567/570(99%)	AJ005479.1
B23	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921950	<i>Penicillium brevicompactum</i>	573/578(99%)	LT558910.1
B24	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921951	<i>Penicillium brevicompactum</i>	565/569(99%)	LT558910.1
B25	<i>Penicillium commune</i>	KY921952	<i>Penicillium commune</i>	575/580(99%)	KC009828.1
B26	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921953	<i>Penicillium brevicompactum</i>	566/572(99%)	LT558910.1
B27	<i>Penicillium citrinum</i>	KY921954	<i>Penicillium citrinum</i>	534/538(99%)	LT558897.1
B28	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY921955	<i>Penicillium brevicompactum</i>	567/569(99%)	LT558911.1
B29	<i>Talaromyces verruculosus</i>	KY921956	<i>Talaromyces verruculosus</i>	565/572(99%)	HQ608025.1
B30	tür tespit edilememiştir				
B31	<i>Aspergillus ochraceus</i>	KY926851	<i>Aspergillus ochraceus</i>	567/569(99%)	KJ783266.1
B32	<i>Aspergillus tubingensis</i>	KY926852	<i>Aspergillus tubingensis</i>	586/594(99%)	KP131626.1
B33	tür tespit edilememiştir				
B34	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KY926853	<i>Aspergillus fumigatus</i>	582/585(99%)	KJ001801.1



Tablo 3. Devamı

Kod	Tür/ITS	Tür Accession Number	Eşleşen Tür	Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür Accession Number
B35	<i>Aspergillus flavus</i>	KY926854	<i>Aspergillus flavus</i>	576/579(99%)	MF120213.1
C1	tür tespit edilememiştir				
C2	tür tespit edilememiştir				
C3	tür tespit edilememiştir				
C4	tür tespit edilememiştir				
C5	tür tespit edilememiştir				

Tablo 3. Devamı

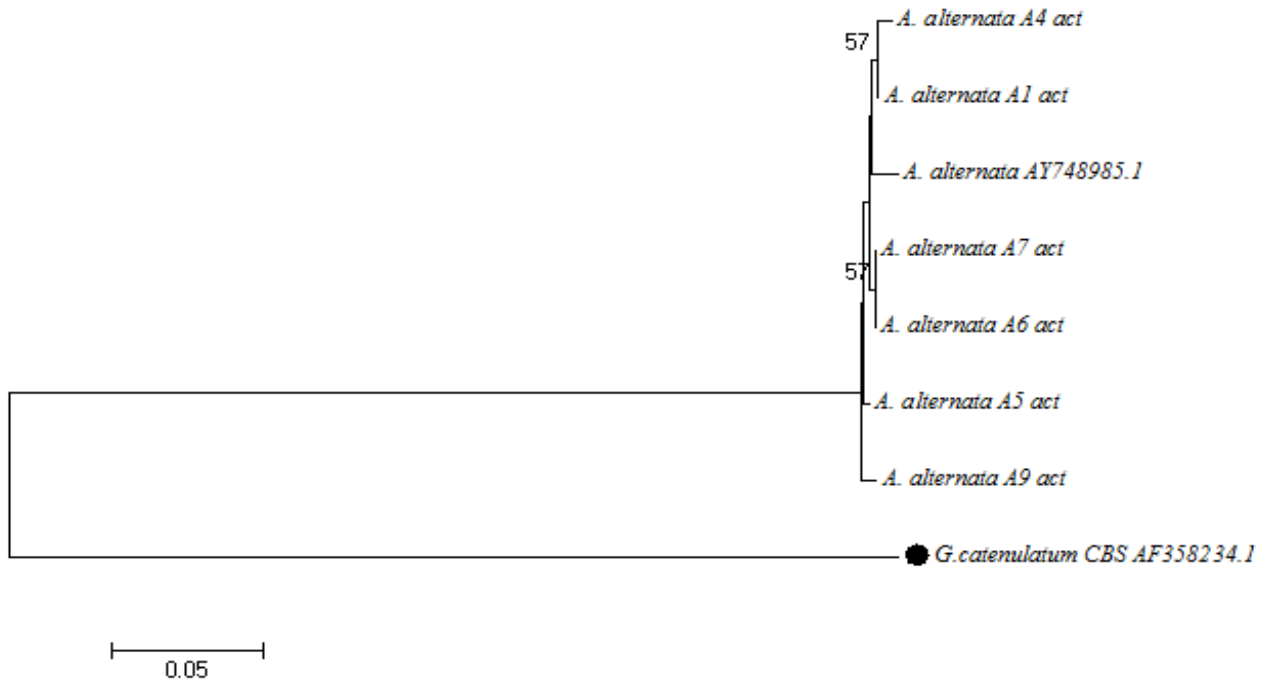
Kod	Tür/ $\beta$ -TUBULİN	Tür Accession Number	Eşleşen Tür	Tür Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür Accession Number
B1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KY930592	<i>Penicillium chrysogenum</i>	736/741(99%)	KT987413.1
B2	tür tespit edilememiştir				
B3	tür tespit edilememiştir				
B4	tür tespit edilememiştir				
B5	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY930593	<i>Penicillium brevicompactum</i>	733/743(99%)	FJ012879.1
B6	tür tespit edilememiştir				
B7	<i>Penicillium citrinum</i>	KY930594	<i>Penicillium citrinum</i>	672/677(99%)	JN112043.1
B8	tür tespit edilememiştir				
B9	tür tespit edilememiştir				
B10	tür tespit edilememiştir				
B11	tür tespit edilememiştir				
B12	tür tespit edilememiştir				
B13	tür tespit edilememiştir				
B14	tür tespit edilememiştir				
B15	tür tespit edilememiştir				
B16	<i>Penicillium viridicatum</i>	KY930595	<i>Penicillium viridicatum</i>	667/691(97%)	JN112031.1
B17	<i>Penicillium citrinum</i>	KY930596	<i>Penicillium citrinum</i>	386/389(99%)	JN112043.1
B18	<i>Penicillium citrinum</i>	KY930597	<i>Penicillium citrinum</i>	378/383(99%)	JN112043.1
B19	tür tespit edilememiştir				
B20	<i>Penicillium citrinum</i>	KY930598	<i>Penicillium citrinum</i>	428/434(99%)	JN112043.1
B21	tür tespit edilememiştir				
B22	<i>Penicillium viridicatum</i>	KY930599	<i>Penicillium viridicatum</i>	719/726(99%)	JN112031.1
B23	<i>Penicillium italicum</i>	KY930600	<i>Penicillium italicum</i>	701/726(97%)	HQ850945.1
B24	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY930601	<i>Penicillium brevicompactum</i>	738/743(99%)	FJ012879.1
B25	tür tespit edilememiştir				



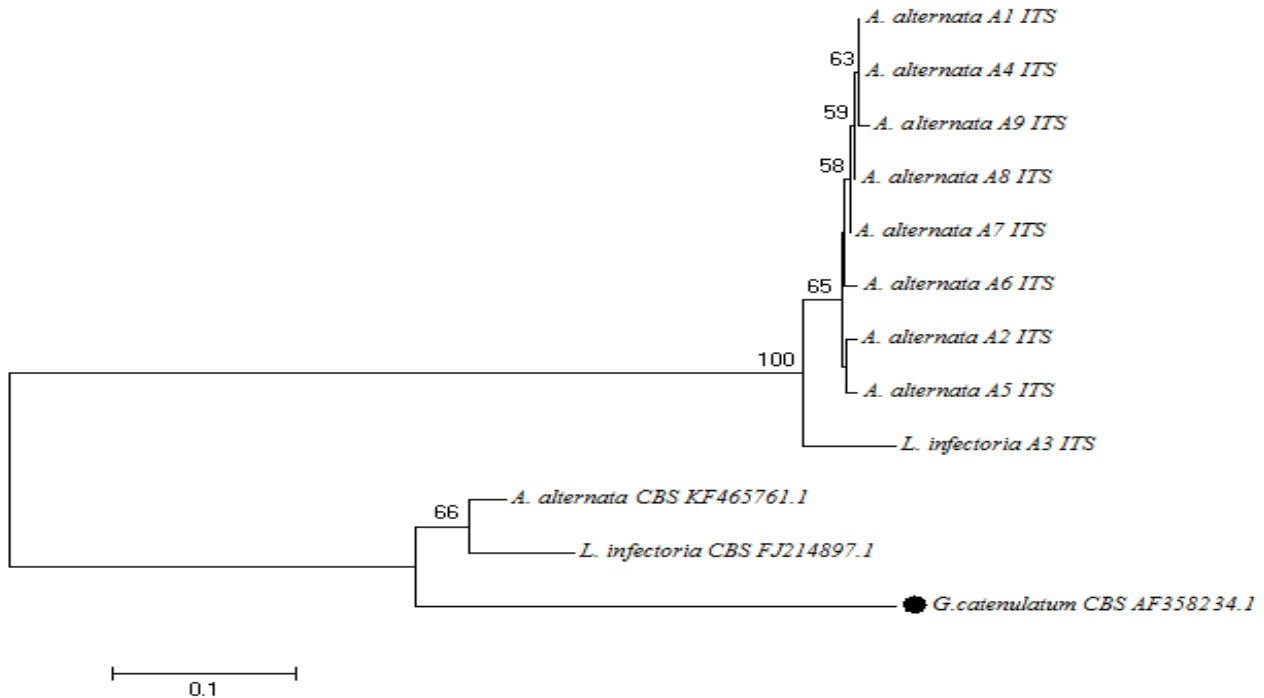


Tablo 3. Devamı

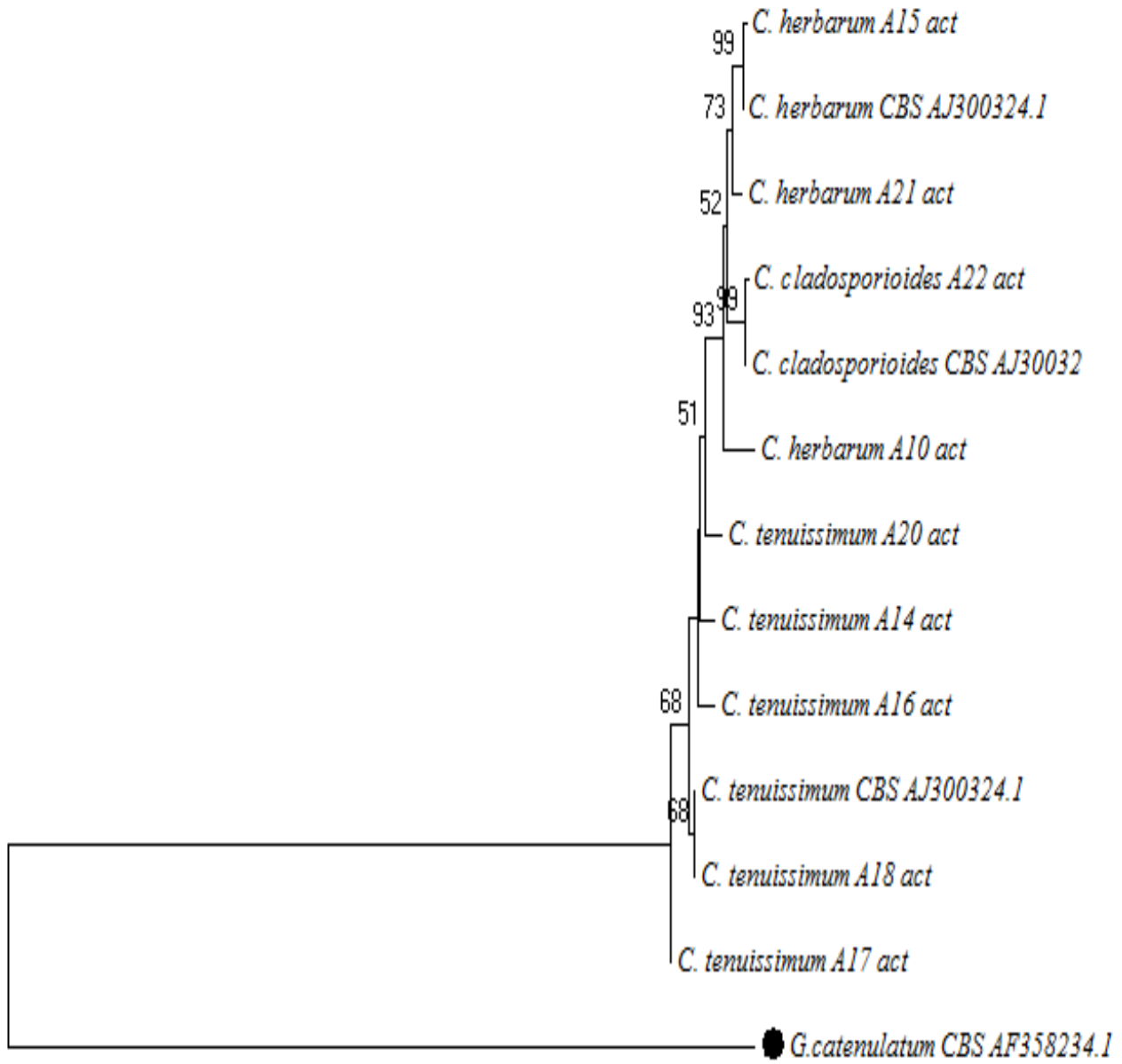
Kod	Tür/ $\beta$ -TUBULİN	Tür Accession Number	Eşleşen Tür	Tür Eşleşme Oranı (MI)	Eşleşen Tür Accession Number
B26	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY930602	<i>Penicillium brevicompactum</i>	742/747(99%)	FJ012879.1
B27	<i>Penicillium citrinum</i>	KY930603	<i>Penicillium citrinum</i>	633/657(96%)	JN112043.1
B28	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KY930604	<i>Penicillium brevicompactum</i>	724/745(97%)	FJ012879.1
B29	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	KY930605	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	716/728(98%)	AB773823.1
B30	tür tespit edilememiştir				
B31	tür tespit edilememiştir				
B32	tür tespit edilememiştir				
B33	tür tespit edilememiştir				
B34	tür tespit edilememiştir				
B35	tür tespit edilememiştir				
C1	tür tespit edilememiştir				
C2	tür tespit edilememiştir				
C3	tür tespit edilememiştir				
C4	tür tespit edilememiştir				
C5	tür tespit edilememiştir				



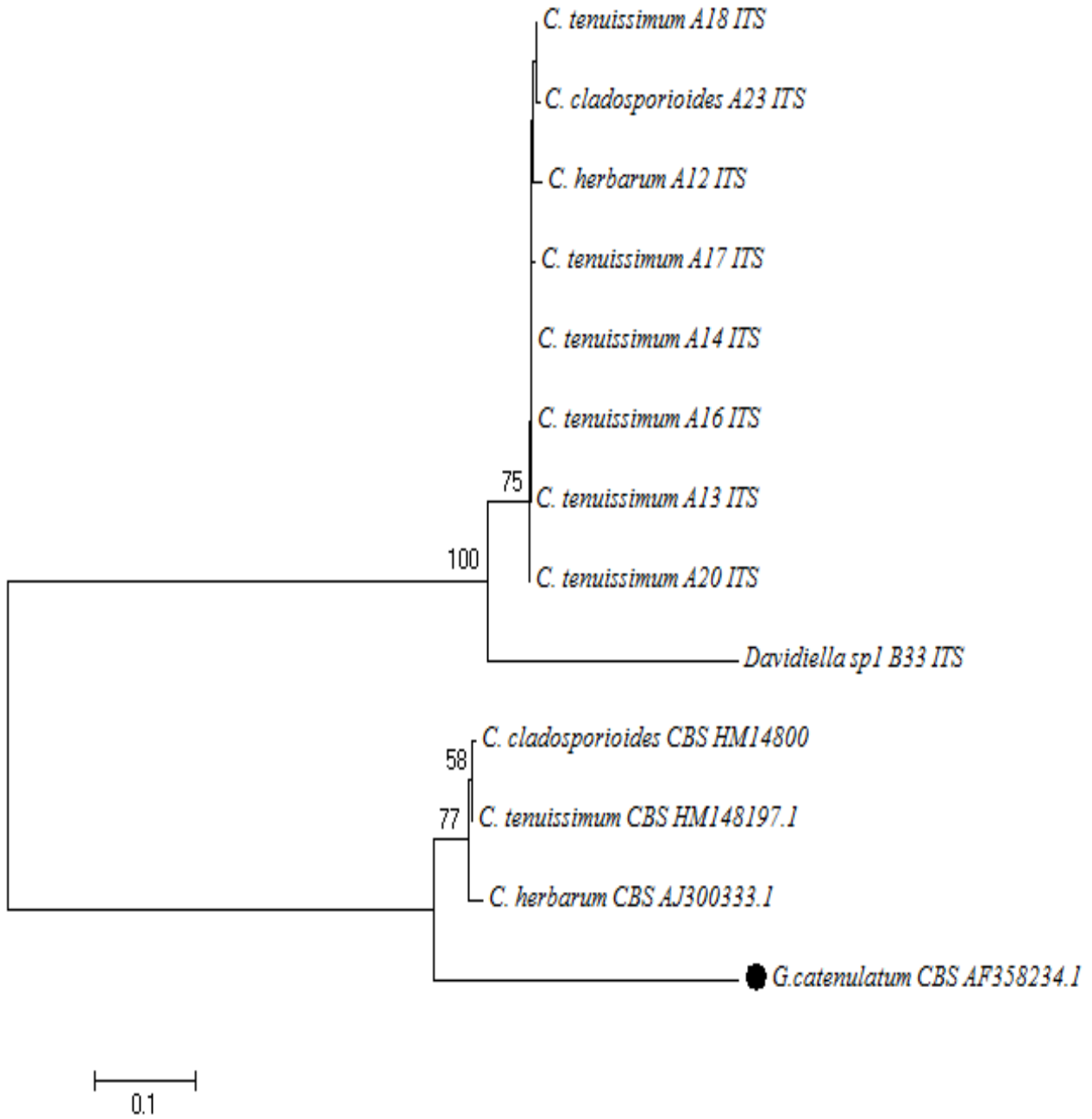
Şekil 1. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



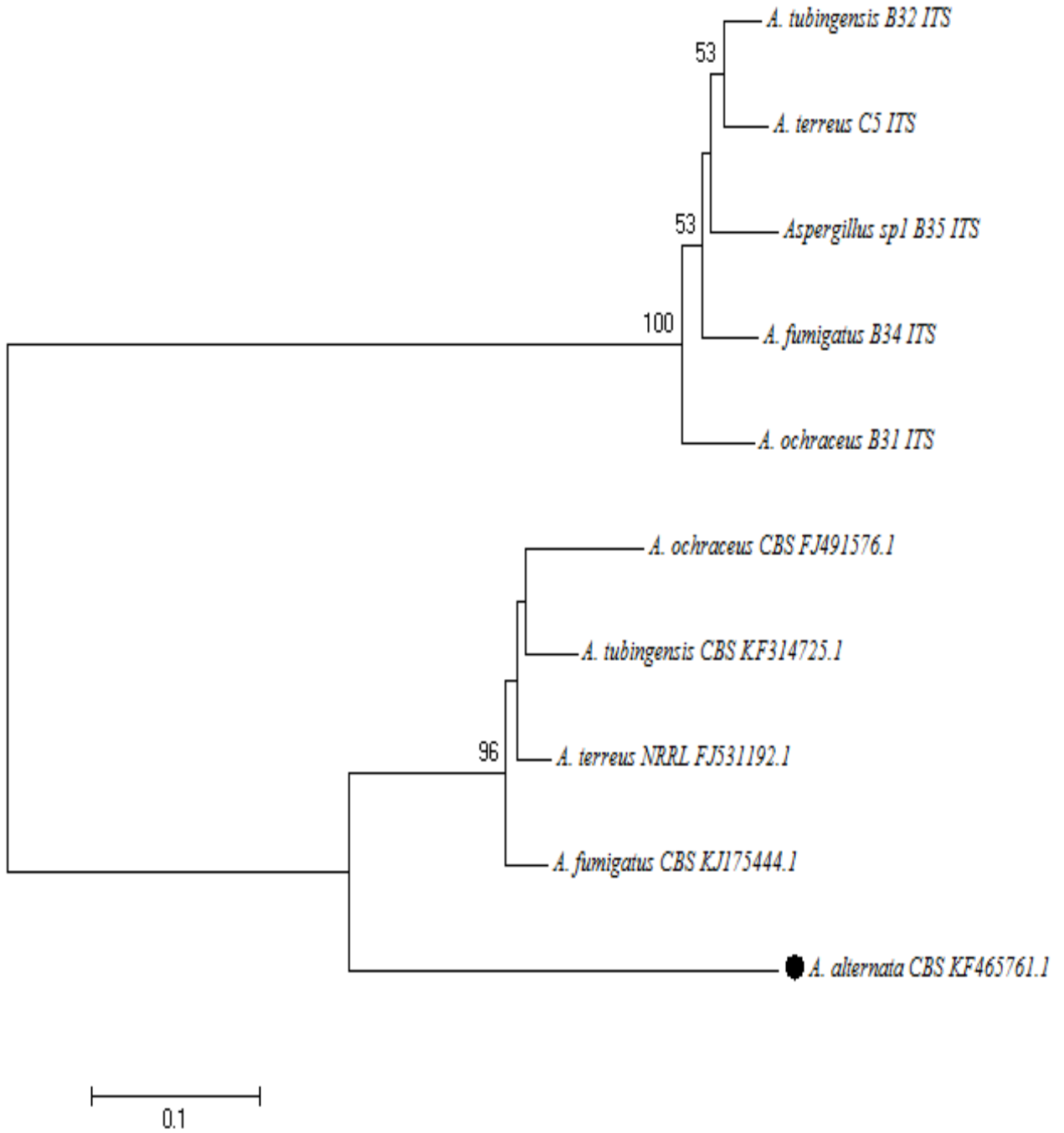
Şekil 2. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Alternaria* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



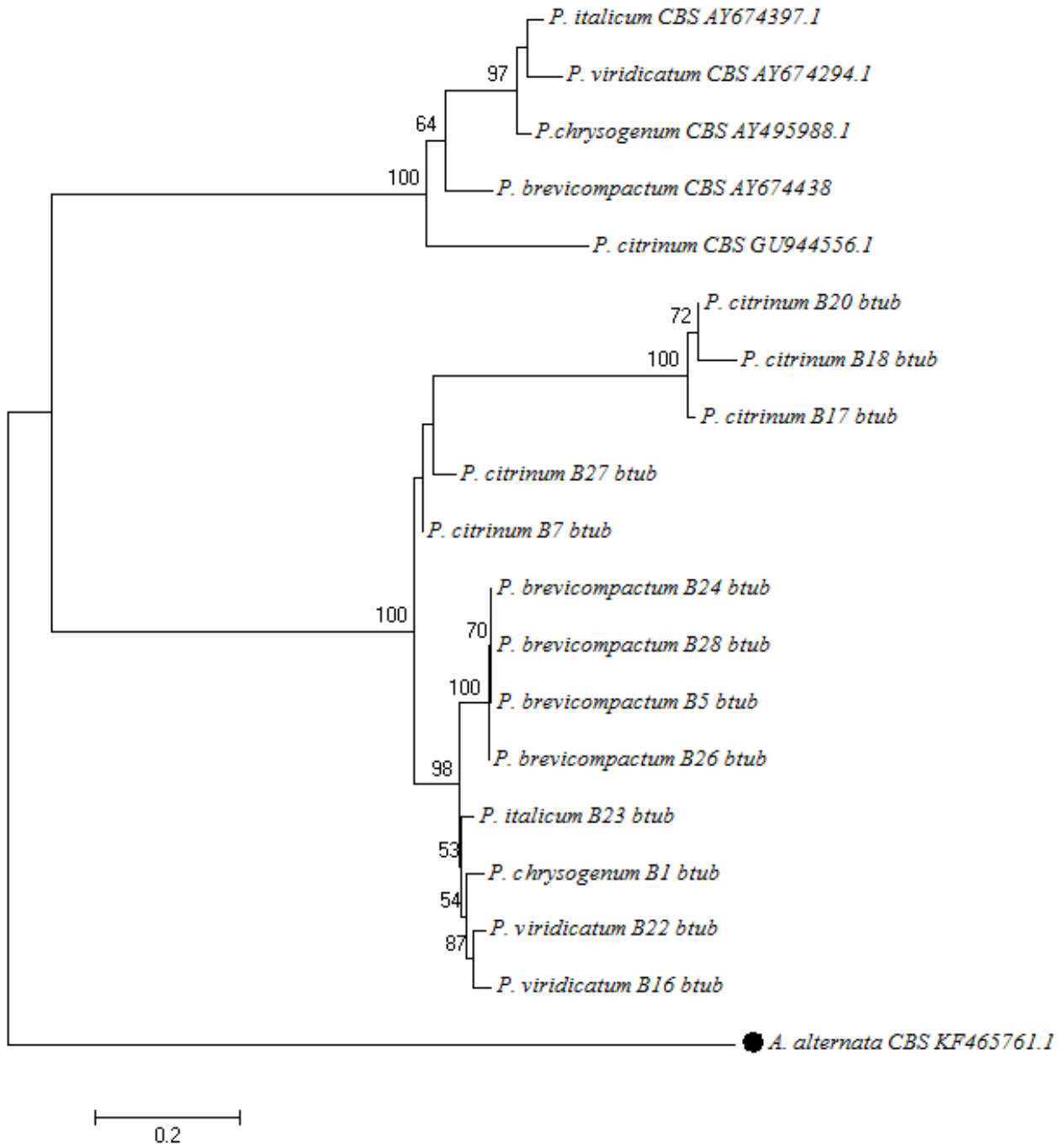
Şekil 3. Actin gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



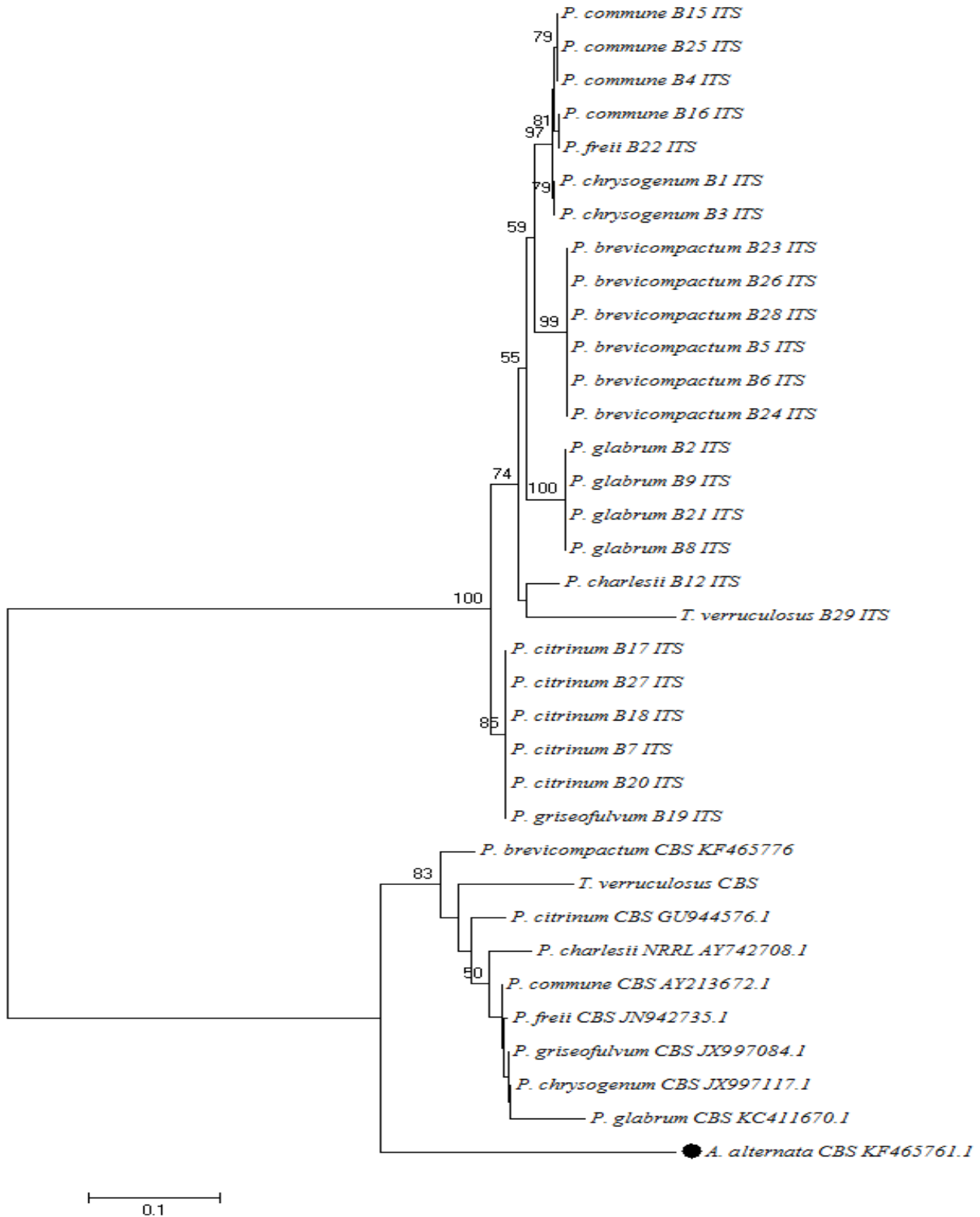
Şekil 4. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Cladosporium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



Şekil 5. ITS gen bölgesine göre moleküler tanısı yapılmış *Aspergillus* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



Şekil 6.  $\beta$ -tubulin gen bölgesine göre moleküler tanıyı yapılmış *Penicillium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



Şekil 7. ITS gen bölgesine göre moleküler tanıyı yapılmış *Penicillium* cinsine ait türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (%50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir). Referans suş sekansları NCBI Genbank'dan alınmıştır.



ITS gibi DNA dizileri, farklı türler içerisinde tek bir türün saptanması için uygundur. Bununla beraber, rDNA'nın diğer dizilerinden; 18S rDNA, 28S rDNA ve mitokondriyel rDNA dizileri de spesifik primerler geliştirmek için kullanılmaktadır (Abacı ve Haliki, 2005).

A grubu'ndaki toplam 23 mikrofungus örneğinden, Actin gen bölgesine bakıldığında 6 örneğin *Alternaria* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. 9 örneğin ise *Cladosporium* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 15 tür tespit edilmiştir. ITS gen bölgesine bakıldığında ise 8 *Alternaria* cinsine ait tür tespit edilirken, 8 adet *Cladosporium* cinsine ait tür tespit edilmiştir. Toplamda 16 tür tespit edilmiştir. B grubundaki 35 mikrofungus örneği içerisinde,  $\beta$ -tubulin gen bölgesine bakıldığında, 14 adet *Penicillium* cinsine ait tür tespit edilirken, *Aspergillus* cinsine ait tür tespiti yapılamamıştır. Toplamda 14 örnek tespit edilmiştir. Bununla beraber ITS gen bölgesine bakıldığında, 25 adet *Penicillium* cinsine ait tür tespit edilirken, 7 tür ise *Aspergillus* cinsine ait olarak tespit edilmiştir. Toplamda 32 tür tespit edilmiştir. Blast analizi sonucunda tür tespiti için öncelikli olarak MI (Maksimum Identification) 'a dikkat edilmiştir bunun yanı sıra türlerin özellikle CBS, ATCC, NRRL gibi uluslararası standart suşlar ile benzer durumda olmasına dikkat edilmiştir. Bu anlamda, her bir tür için hangi grupta ise ona göre "Actin" ve " $\beta$ -tubulin" gen bölgelerine bakılmış ve ayrıca her örnek için "ITS" gen bölgesi ele alınmıştır.

Tespit edilen türlerin akrabalık düzeylerini incelemek amaçlı "Neighbour-Joining Algoritma Yöntemi" kullanılarak filogenetik ağaçlar çizilmiştir. *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsine ait türler için dış tür olarak *Alternaria alternata* (Strain/CBS KF465761.1), *Alternaria* ve *Cladosporium* türleri için ise dış tür olarak *Gliocladium catenulatum* (Strain/CBS AF358234.1) seçilmiştir. Tüm türlerin "type tür" leri yine uluslararası suşlardan seçilmiş ve laboratuvar örnekleri ile akrabalık düzeyleri incelenmiştir. Filogenetik ağaç çizimi için, doğadaki en yaygın cinslerin (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*) teşhis edilen türleri tercih edilmiştir. Tüm analizlerin sonucunda, A grubuna mensup 23 örnekten actin gen bölgesi baz alınarak yapılan dizi analizi sonucunda 8 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiş, ITS gen bölgesine yapılan dizi analizi sonucunda ise aynı 23 örnekten, 5 tanesi tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

B grubuna mensup 35 örnekten  $\beta$ -tubulin gen bölgesi baz alınarak yapılan dizi analizi sonucunda 21 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiş, ITS gen bölgesine yapılan dizi analizi sonucunda aynı 35

örnekten, 4 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiştir. C grubuna mensup toplam 5 örnek içinden actin gen bölgesi için bakıldığında, 2,  $\beta$ -tubulin gen bölgesi için bakıldığında 5, ITS gen bölgesi için bakıldığında 1 örnek tür düzeyinde teşhis edilememiştir. Sekans veri yetersizliği sebebiyle tüm bu örnekler tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

Bir diğer sonuç olarak, *Acrodontium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Davidiella sp.*, türleri uluslararası suşlar ile benzerlik göstermemektedir. Tabloda görülebileceği üzere (Tablo 2), B16 örneği için  $\beta$ -tubulin gen bölgesine bakıldığında, "*Penicillium viridicatum*" "MI =% 97 oranında" tür teşhisi yapılırken, ITS gen bölgesine bakıldığında "*Penicillium commune*" "MI =% 99 oranında" tür teşhisi yapılmıştır. Bu durumda, B16 örneği için ITS gen bölgesindeki sonuç, daha uygun sonuç verdiğinden, "*Penicillium commune*" türü B16 örneği için uygun bulunmuştur. 2. bir örnek olan, B23 örneği için  $\beta$ -tubulin gen bölgesine bakıldığında, "*Penicillium italicum*" "MI =% 97 oranında" tür teşhisi yapılırken, ITS gen bölgesine bakıldığında "*Penicillium brevicompactum*" "MI =% 100 oranında" tür teşhisi yapılmıştır. Bu durumda, B23 örneği için ITS gen bölgesindeki sonuç, daha uygun sonuç verdiğinden, "*Penicillium brevicompactum*" türü B23 örneği için uygun bulunmuştur. Son zamanlarda tür teşhisi için yapılan moleküler analizlerde, protein kodlayan genler ön plana çıkmaktadır. Bu genler değişken bölge (intron) içerdiğinden tür tanısı açısından oldukça anlamlıdır. Bu genler; elongation factor 1 alpha (TEF1  $\alpha$ ), calmodulin (Cmd),  $\beta$ -tubulin (BenA), actin (Act) ve histone (HIS) genleridir (Samson ve Ark., 2010). Bu çalışmada, saf kültür olarak laboratuvar ortamından izole edilen bazı mikrofunguslarda ITS, Actin ve  $\beta$ -tubulin gen bölgelerine göre tür teşhisi yapılmıştır.

Çalışmanın sonucu olarak, çoğu mikrofungus türünün ITS ve ilgili gen bölgesinin (actin ve/veya  $\beta$ -tubulin) aynı türü teşhis etmesiyle başarılı olduğu söylenebilir. Bir örnek için farklı tür teşhisi yapan ilgili gen bölgeleri için, önce "MI" incelenmiş daha sonra filogenetik ağaç çizimleri ile türlerin birbirlerine olan uzaklıkları (akrabalık düzeyleri) incelenerek, tür teşhisleri desteklenmiştir. Tür tespiti yapılamayan örnekler için, çalışma bir adım daha ileriye götürülerek cinse spesifik farklı bir gen bölgesinin araştırılması ve incelenmesi alternatif bir durum sağlayacaktır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü TÜBAP-2014/58 numaralı proje ile desteklenmiştir, bunun için çok teşekkür ederiz.





### Kaynaklar

- Abacı Ö, Haliki A. *Fungal Tanıda Kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, İzmir(2005).
- Bridge, P.D., Arora D.K., *Interpretation of PCR methods for Species Definition*, P:357, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford (1998).
- Edel V. *Polymerase Chain Reaction In Mycology: An Overview*, P:357, Bridge PD, CAB1 Publishing, Wallingford (1998).
- Levetin E, Horner WE, Scott JA. Taxonomy of allergenic fungi. *Journal of Allergy Clin Allergy Prac.* 4 (3): 375-385(2016).
- Manian S, Sreenivasaprasad S, Mills PR. *DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi*, 307-310. *Letters in Applied Microbiology.* 33 (4): 307-310(2001).
- Samson, R. A, Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. and Andersen, B. *Food and Indoor Fungi*, CBS-KNAW Fungal Diversity Centre, Utrecht, The Netherlands (2010).
- Takamatsu, S., *PCR Applications in Fungal Phylogeny*, P:357, 125-152, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford (1998).
- Wessner DR, Dupont C, Charles TC. *Microbiology*. John Wiley & Sons. 867 pp + Ekler. ABD (2013).