



Geliş(Received) :16/05/2018
Kabul(Accepted) :28/06/2018

Araştırma Makalesi
Doi:10.30708/mantar.424172

Edirne İli Söğütlük Ormanı Toprağında İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Biyoçeşitliliği

Eda Gizem AYAN¹, Ahmet ASAN¹, Burhan SEN¹, Suzan OKTEN²

Sorumlu yazar:ahmetasan84@gmail.com

¹Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü. 22030 EDİRNE - TÜRKİYE

²Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji 22030 EDİRNE - TÜRKİYE

Öz: Çalışmamızda, Edirne ili orman topraklarından izole edilen *Aspergillus* türlerinin morfolojik-kolonyal ve moleküler yöntemlerle teşhis edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Edirne Söğütlük Ormanından, 2016 yılı Mart ayında Brown'un metodu kullanılarak toprak örnekleri alınmıştır. Toprakta fungus izolasyonu için "Toprağı Sulandırma Metodu" kullanılmıştır. Morfolojik çalışmalar için CZ, CYA, CY20S, MEA besiyerlerine yapılan ekimlerden sonra, mikroskopik ve makroskopik karakterler incelenmiştir. Moleküler çalışmalar için ise sırasıyla DNA izolasyonu, calmodulin gen bölgesini hedefleyen PCR işlemleri, PCR ürününün saflaştırılması, dizi analizi ve filogenetik analiz aşamaları uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda 7 adet *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bu türler, *Aspergillus affinis* (Türkiye için yeni kayıt), *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus* (Türkiye için yeni kayıt), *Aspergillus spelaesus* (Türkiye için yeni kayıt) ve *Aspergillus fischeri* dir.

Anahtar kelimeler: Toprak, *Aspergillus*, Calmodulin geni, Söğütlük Ormanı, Yeni kayıt, Edirne

Biodiversity Of *Aspergillus* Species Isolated From Sogutluk Forest Soil Of Edirne City

Abstract: We aimed to isolation and identification of *Aspergillus* species in Edirne Sogutluk Forest soil by morphological-colonial and molecular methods in our study. For this purpose, soil samples were taken by using Brown's Method in March, 2016 from mentioned forest soil. "Soil Dilution Method" was used for fungus isolation from soil. For the morphological studies, microscopic and macroscopic characters were examined after the operation of inoculating in CZ, CYA, CY20S, MEA media. For the molecular studies, DNA isolation, PCR operations that targeting Calmodulin gene region, purification of the PCR product, sequence analysis and phylogenetics analysis processes were performed respectively. Seven *Aspergillus* species were detected as a result of studies. These species are *Aspergillus affinis* (New record for Turkey), *Aspergillus awamori*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus* (New record for Turkey), *Aspergillus spelaesus* (New record for Turkey) and *Aspergillus fischeri*.

Key words: Soil, *Aspergillus*, Calmodulin gene, Sogutluk Forest, New record, Edirne

Giriş

Toprak, bünyesinde çeşitli mikroorganizmaları barındırır (Asan ve Ekmekçi, 1994). Funguslar doğada çok yaygın olmalarına rağmen, sayı ve çeşit bakımından en bol oldukları habitat topraktır (Asan ve Ekmekçi, 1994; Asan, 2002; Asan ve Ark., 2010; Özdemir ve Ark., 2011). Toprak fungusları ile ilgili öncü araştırmacılarından biri Adametz'dir ve konuyla ilgili eserini 1886'da yayınlamıştır;

bu çalışmayla 11 fungus türü izole edilmiş ve toprağın karışık bir fungus florasına sahip olduğunu belirlenmiştir (Tresner ve Ark., 1954; Asan ve Ekmekçi, 1994; Paul, 2007; İlhan ve Asan, 2001). 1902 yılında Oedemans ve Koning tarafından toprak funguslarının ilk detaylı sınıflandırılması yapılmıştır (Paul, 2007; Waksman, 1927). Ülkemizde bu alandaki öncü çalışmalardan biri, 1970 yılında Öner tarafından başlatılmıştır. *Aspergillus* türleri,



birçok alanda yararlanılan birincil ve ikincil metabolitler üretmeleri sebebiyle ticari önemi olan funguslardandır (Domsch ve Ark. 1980). Ürettikleri enzim ve organik asitler dışında, biyoteknoloji alanında önem taşıyan birçok sekonder metabolit üretirler (Hasenekoğlu, 1991; Machida ve Gomi, 2010). Bu bileşikler arasında antibiyotikler, bağışıklık baskılayıcılar, kolesterol düşürücü maddeler ve mikotoksinler sayılabilir (Goldman ve Osmani, 2008). *Aspergillus* türlerinin bazıları ise özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde hastalıklara (aspergillosis) ve alerjiye neden olabilirler (Klich, 2002). Bu enfeksiyon etkenlerinin başında *Aspergillus fumigatus* gelir (Klich, 2002; Machida ve Gomi, 2010). Bunu, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. ochraceus* takip eder (Klich, 2002). Bitki patojeni türlerden *A. niger* ise siyah çürüklük hastalığı sebebidir (Sümer, 2006). Tüm bunlar göz önüne alındığında *Aspergillus*'ları tür düzeyinde tanımlamanın önemli olduğu görülmektedir (Asan, 2004; İlhan ve Ark., 2006).

Çalışmamızda, orman toprağından izole edilen *Aspergillus* türlerinin hem mikroskobik- makroskobik özelliklerine dayalı morfolojik ve kolonyal yöntemlerle hemde calmodulin gen bölgesine dayalı moleküler yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çolakoğlu (2002)'nin Belgrad Ormanı karaçam meşçerelerine ait topraklarda mikrofunguslar üzerine yaptığı çalışmada *Aspergillus* cinsine ait 2 tür bulunmuştur (Çolakoğlu, 2002). Kara (2005) Demirköy (Kırklareli) civarındaki Kuzey Trakya Dağlık Orman alanlarında mikrofunguslar ile ilgili araştırma gerçekleştirmiştir. Edirne ili orman topraklarında gerçekleştirilen Asan ve Ekmekçi (1994)'nin morfolojik-kolonyal yöntemlere dayalı yapılan çalışmasında *Aspergillus* cinsine ait 7 tür ve 2 varyete tespit edilmiştir.

Funguslar, uzun yıllar boyunca fenotipik karakterlere dayalı morfolojik özellikleri kullanılarak tanımlanmıştır (Waksman, 1952; Rossmann, Tulloss, Dell ve Thorn, 1998). Fakat bazı türleri teşhis etmek için bu özellikler yeterli değildir (Hasenekoğlu ve Sülün, 1990). Bu nedenle DNA tabanlı moleküler yaklaşımlar mikrofungusların teşhisinde önemli bir alternatif haline gelmiştir (Bıyık ve Ark., 2016; Bruns ve Ark., 1991). Moleküler yöntemler, çok sayıda *Aspergillus* türünün tanımlanmasında da yaygın olarak uygulanmıştır (Rodrigues ve Ark., 2007). Bizim çalışmamızda da *Aspergillus* türleri fenotipik karakterlere dayanan morfolojik ve moleküler çalışmalar ile tür düzeyinde tespit edilmiştir.

Materyal ve Metot

Toprak örnekleri

Toprak örnekleri, Mart 2016'da Edirne ili Söğütlük Ormanı'ndan alınmıştır. Edirne Söğütlük Ormanı, Meriç Nehri Kenarında, halka açık, piknik ve yürüyüş alanları içeren, özellikle Şubat-Mart dönemlerinde nehrin taşmasıyla birlikte nehirden gelen alüvyonlara maruz

kalan ve bu bakımdan verimli bir alandır. Toprak fungusları bakımından çeşitlilik beklendiğinden seçilmiştir. Toprak örneklerinin alınmasında Brown (1958)'un yöntemi kullanılmıştır. Alınan toprak örnekleri steril poşetler içerisinde laboratuvara getirilmiş ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Funguslarının izolasyon işlemi "Toprağı Sulandırma Metodu" kullanılarak yapılmıştır. Bu metod, toprak mikrobiyolojisinde en fazla tercih edilen metoddur (Waksman, 1922). Toprak örneklerinin nem miktarı hesaplanmıştır. hassas terazi ile örneklerden 10 gram tartılmıştır daha sonra 105°C'de 24 saat tutulduktan sonra tekrar tartılmış ve böylelikle 25 gram kuru toprağı verecek yaş toprak miktarı bulunmuştur (Cireli ve Ark., 1973).

Ölçülen ağırlıkların yüzde nem miktarı aşağıdaki eşitlik yardımı ile belirlenmiştir.

$$\text{Nem miktarı (\%)} = \frac{\text{Yaş ağırlık-Fırın kuru ağırlık}}{\text{Fırın kuru ağırlık}} \times 100$$

Aspergillus Türlerinin İzolasyonu

Toprak örneklerinin ilk ekimi için Dichloran Glycerol Chloramphenicol (DG18) Agar besiyeri kullanılmıştır (Hocking ve Pitt, 1980). Yaş toprak tartılmış ve üzerine 250 mL'ye tamamlanacak şekilde Dilüsyon sıvısı Maximum Recovery Diluent (MRD) eklenmiştir. Elde edilen 1/10'luk toprak süspansiyonu, 150 rpm hızda 30 dakika boyunca çalkalanmıştır.

Dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Ekim işlemlerinde 1/10.000'lik süspansiyon kullanılmıştır. 1/10.000'lik toprak süspansiyonundan, 1 mL örnek çekilmiş ve DG18 besiyerine aktarılmış, işlem 10 petri kabı için tekrarlanmıştır. Daha sonra besiyerleri inkübatöre kaldırılarak 25°C'de 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi boyunca kurumayı engellemek için inkübatör içerisine su dolu küçük bir kap konulmuştur (Tansey ve Jack, 1976; Singh ve Sandhu, 1986). İnkübasyon süresi sonunda karışık fungus üremesi gözlenen petri kaplarından *Aspergillus* olduğu düşünülen koloniler seçilerek DG18 besiyerine üç nokta ekim tekniği ile aktarılmış (Raper ve Thom, 1974), sonra 25°C'de 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Aspergillus Türlerinin Fenotipik Tanısı

Makroskobik inceleme için, her bir küf izolatından Czapek Dox Agar (CZ), Czapek Yeast Agar (CYA25), % 20 sukrozlu Czapek Yeast Agar (CY20S) ve Malt Extract Agar (MEA) içeren petrilere üç nokta ekimi yapılmış, 25°C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Czapek Yeast Agar (CYA37)'daki örnekler ise 37°C'de 7 gün bekletilmiştir. Daha sonra kolonilerin yapısı, şekli, alt ve üst rengi, büyüklüğü, eksudasyon ve pigmentasyon varlığı incelenmiştir. Türlerin vezikül yapısı, konidi rengi, şekli, büyüklüğü ve yapısı, konidiofor şekli, uzunluğu, genişliği,



çeper özelliği ve duvar yapısı, konidial başlık yapısı, fiyalid şekli, metula, sklerotia gibi yapılar ve hülle hücrelerinin varlığı, boyut ve şekilleri incelenmiştir. Türlerinin tanımlanmasında çeşitli eserlerden (Klich, 2002; Hasenekoğlu, 1991; Raper ve Fennell, 1965) eserlerinden yararlanılmıştır.

Aspergillus Türlerinin Genotipik Tanısı

DNA izolasyonundan sonra, PCR ile Calmodulin gen bölgesine özgü primerler kullanılarak ürün çoğaltılmış, elde edilen saf DNA örneklerinden dizi analizi ve filogenetik analiz yapılmıştır.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu işlemleri için Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Tic. Ltd. Şti.'den hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. İşlem, Bio-Speedy™ Fungal DNA İzolasyonu Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

PCR Kurulumu

PCR işlemi için kalıp olarak kullanılacak DNA'nın sağlığı ve konsantrasyonları spektrofotometrik ölçümler yapılarak (MSP-100 Mikro Spektrofotometre; Inovia Teknoloji Ltd. Şti., Türkiye); miktarı en az 20 ng/μL ve absorbans değeri (ABS₂₆₀/ABS₂₈₀) 1,6-2,0 aralığında olan DNA örnekleri kullanılmıştır. PCR kurulumu için gerekli olan bileşenler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. PCR kurulumu için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Kullanılan Miktar
2x-Mix	5 μL
OligoMix-10 μM (Forward Primer + Reverse Primer)	1 μL
MGW (Moleküler Ölçekli Su)	2 μL
Template (Kalıp DNA)	2 μL
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 μL

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR işlemleri, Bio-Speedy™ Maya ve Küf Real-Time PCR Hızlı Tespit Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, Calmodulin gen bölgesini hedefleyen ileri 5'-GCKWAAAYAGGACAAGGATGG-3' ve geri 5'-CTGGTCVGCCTCACRAAT-3' primerlerini içermektedir. *Aspergillus* Calmodulin primeri dejenere bir primer olduğundan, standart PCR ile ürün elde edilememiş ve bu nedenle Touchdown PCR uygulanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri saflaştırılmıştır.

Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Dizi analizi için Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'nden hizmet alımı gerçekleştirilmiş, elde edilen fungal amplikonların dizi analizleri Sanger yöntemi ile tespit edilmiştir. Elde edilen dizilere karşılık gelen

diziler, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresindeki NCBI gen bankasından Blast yöntemi ile belirlenmiştir.

Sonuçlar

İzole edilen *Aspergillus* cinsine ait 52 izolatdan 7 *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Bunlar *Aspergillus affinis*, *A. awamori*, *A. dimorphicus*, *A. europaeus*, *A. spelaesus* ve *A. fischeri*'dir. Çalışılan örnekler ait morfolojik ve moleküler sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. 3 tür Türkiye için yeni kayıttır (Asan, 2004); bunlar: *Aspergillus affinis*, *A. europaeus* ve *A. spelaesus*'dur.

Elde edilen türlerden *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus awamori*'nin tür düzeyinde morfolojik teşhisi yapılarak moleküler teşhis ile karşılaştırılmış ve doğrulanmıştır. *Aspergillus fischeri* morfolojik, *Aspergillus affinis*, *Aspergillus dimorphicus*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaesus* ise moleküler teşhis ile tanımlanmıştır.



Tablo 2. Morfolojik ve moleküler teşhis sonuçları

Kod	Morfolojik Teşhis	Moleküler Teşhis	Eşleşen Örneğin Accession Numarası	Benzerlik
1A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	509/517 (%98)
2A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	509/510 (%99)
3A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	496/503 (%99)
4A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	JF805764.1	510/513 (%99)
5A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	502/503 (%99)
6A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	532/535 (%99)
7A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Flavipedes</i>	* <i>Aspergillus spelaeus</i>	HG916745.1	508/510 (%99)
8A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	496/503 (%99)
9A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	531/535 (%98)
10A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Circumdati</i>	* <i>Aspergillus affinis</i>	GU721091.1	534/537 (%98)
11A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	503/504 (%99)
12A	Teşhis Edilemedi	DNA İzolasyonu Yapılamadı	-	-
13A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
14A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
15A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	453/458 (%99)
16A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	497/504 (%99)
17A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	503/504 (%99)
18A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	507/508 (%99)
19A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	504/506 (%99)
20A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
21A	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	FN394670.1	508/509 (%99)
22A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-



23A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i> <i>Aspergillus awamori</i>	LT558746.1 KJ777809.1	508/509 (%99)
		<i>Aspergillus niger</i>	JF838354.1	507/509 (%99)
24A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Aspergillus niger</i>	KP739458.1 KJ123904.1 KJ123900.1	507/508 (%99)
25A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i> <i>Aspergillus awamori</i>	LT558746.1 KJ777809.1	507/508 (%99)
		<i>Aspergillus niger</i>	JF838354.1	506/508 (%99)
26A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-
27A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	501/502 (%99)
28A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	503/505 (%99)
29A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	KR020714.1	502/503 (%99)
30A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
31A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
32A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
33A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	497/504 (%99)
34A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	507/509 (%99)
35A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
36A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
37A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	506/507 (%99)
38A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
39A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
40A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	* <i>Aspergillus europaeus</i>	LN909009.1	504/506 (%99)
41A	Teşhis Edilemedi	Dizileme yapılamadı	-	-
42A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
43A	<i>Aspergillus</i> Section <i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	500/507 (%99)
44A	<i>Aspergillus fischeri</i>	Dizileme yapılamadı	-	-



45A	Teşhis Edilemedi	Dizileme yapılamadı	-	-
46A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	501/508 (%99)
47A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	503/504 (%99)
48A	<i>Aspergillus fischeri</i>	DNA İzolasyonu Yapılamadı	-	-
49A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
50A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)
51A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	LT158494.1	505/506 (%99)
52A	<i>Aspergillus Section Cremei</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	EF652135.1	499/506 (%99)

*Türkiye için yeni kayıt.

Tür Düzeyinde Teşhis Edilen *Aspergillus* Türleri

Türlerle ilgili elde edilen bilgiler aşağıda verilmiştir (Şekil 1-7). 3 örnek ise *Aspergillus Section Nigrifide* olduğu görülmüş ancak tür düzeyinde teşhis edilememiştir.

Aspergillus affinis Davolos, Persler, Pietrangeli & Maggi 2011:

7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 35-37 mm, MEA besiyerinde 34-35 mm, CZ besiyerinde 26-30 mm, DG18 besiyerinde 47-48 mm'dir. CYA37 besiyerinde ise mikrokoloniler görülür.

Aspergillus awamori Nakaz. 1907

7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 60-70 mm, MEA besiyerinde 60-70 mm, CY20S besiyerinde 60-70 mm, CYA37 besiyerinde 65-70 mm ve CZ besiyerinde 30-60 mm'dir.

Aspergillus carbonarius (Bainier) Thom 1916

7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 65-70 mm, MEA besiyerinde 55-70 mm, CY20S besiyerinde 68-70 mm, CYA37 besiyerinde 10-30 mm ve CZ besiyerinde 35-45 mm'dir.

Aspergillus dimorphicus B.S. Mehrotra & R. Prasad 1969

7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde yaklaşık 30-35 mm, MEA besiyerinde 25-30 mm, CY20S besiyerinde 40-50 mm ve CZ besiyerinde 25-30 mm'dir.

Aspergillus europaeus Hubka, A. Nováková, Samson, Houbraken, Frisvad & M. Kolařík 2016

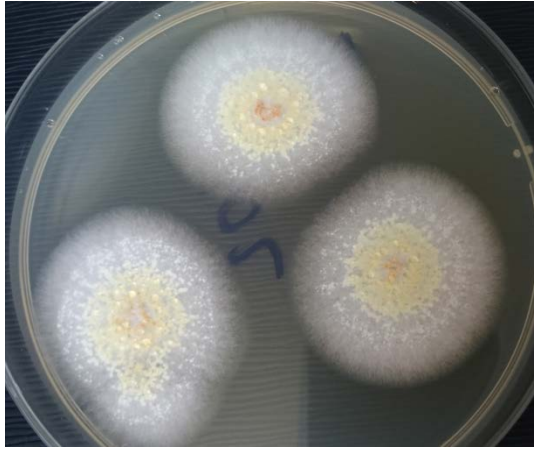
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 32-45 mm, MEA besiyerinde 21-30 mm, CZ besiyerinde 25-38 mm, CY20S besiyerinde 53-65 mm'dir.

Aspergillus spelaesus A. Nováková, Hubka, M. Kolařík & S.W. Peterson 2015

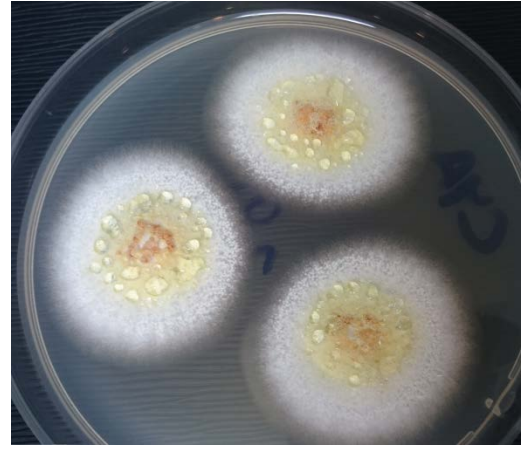
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 16-30 mm, MEA besiyerinde 15-32 mm, CZ besiyerinde 6-26 mm'dir.

Aspergillus fischeri Wehmer 1907

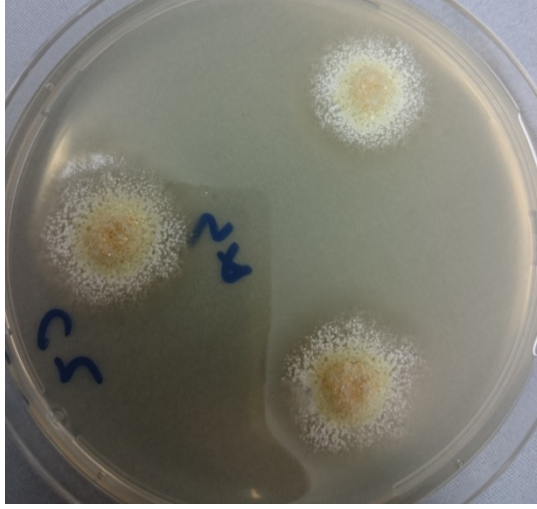
7 günlük inkübasyon sonunda koloni çapı CYA25 besiyerinde 60-70 mm, CYA37 besiyerinde 60-70 mm MEA besiyerinde 65-70 mm, CZ besiyerinde 53-60 mm, CY20S besiyerinde 60-70 mm'dir.



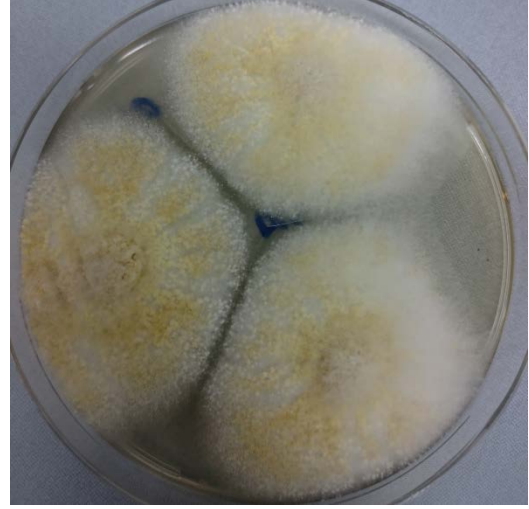
A



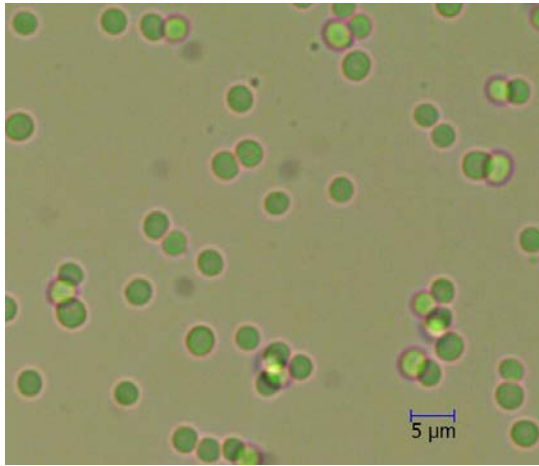
B



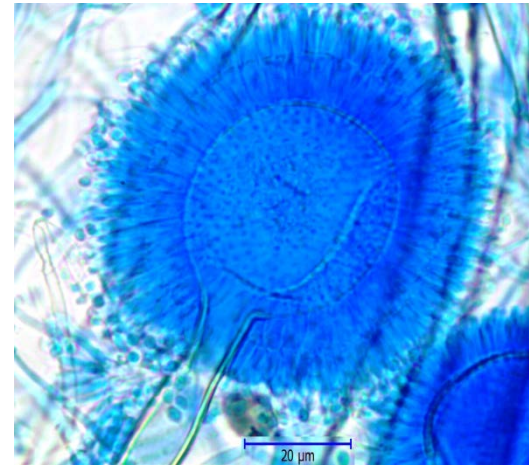
C



D

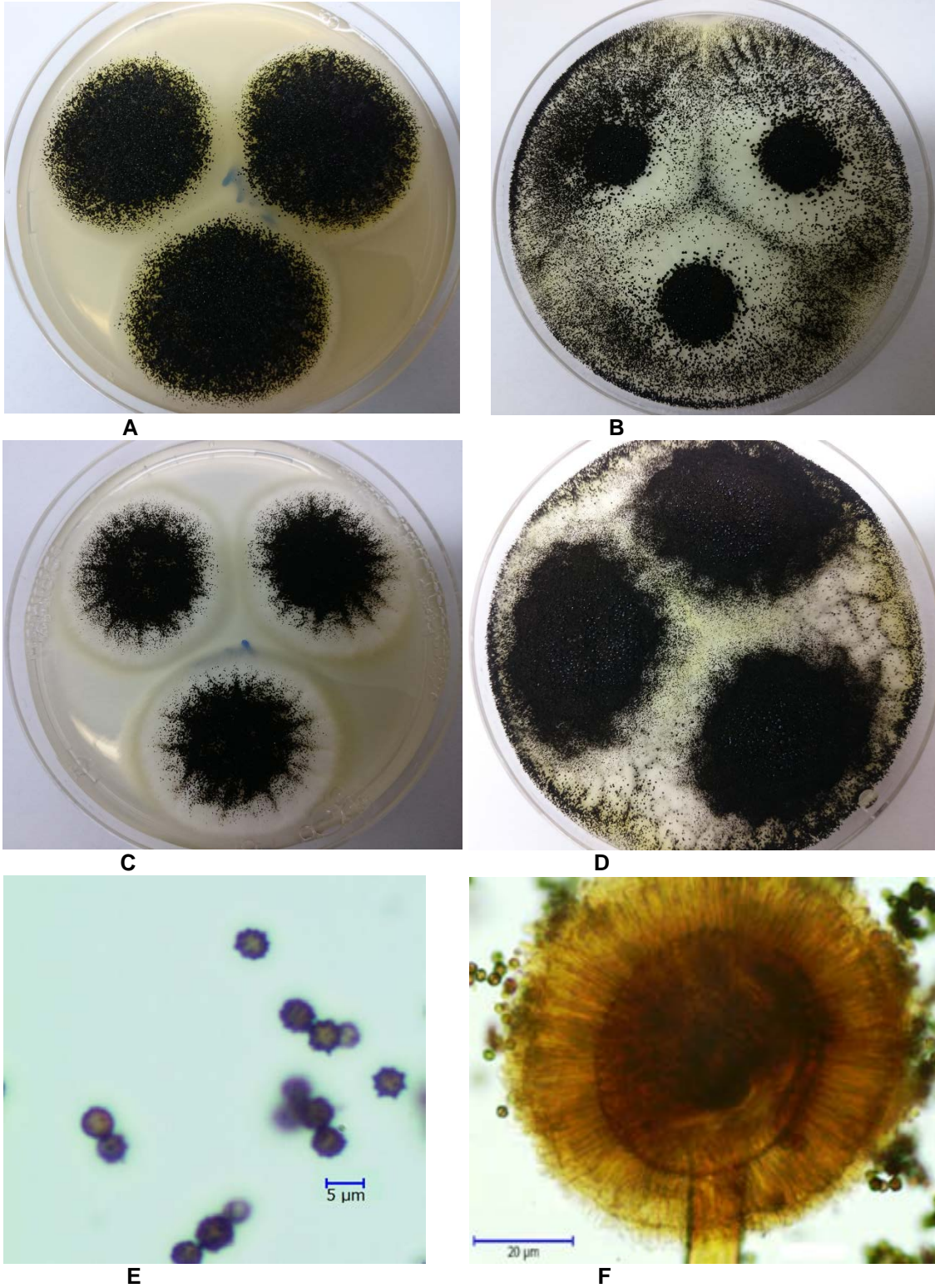


E

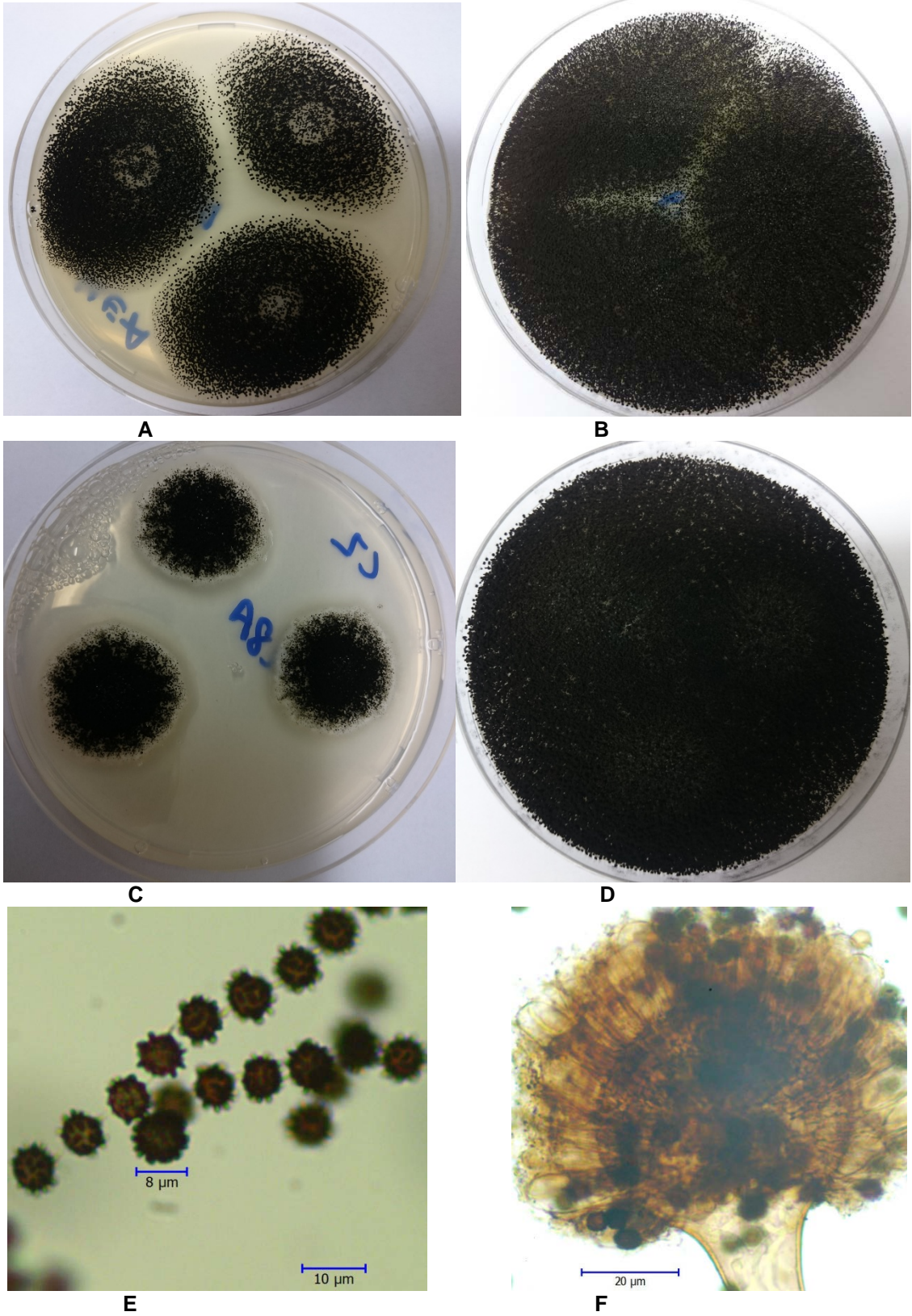


F

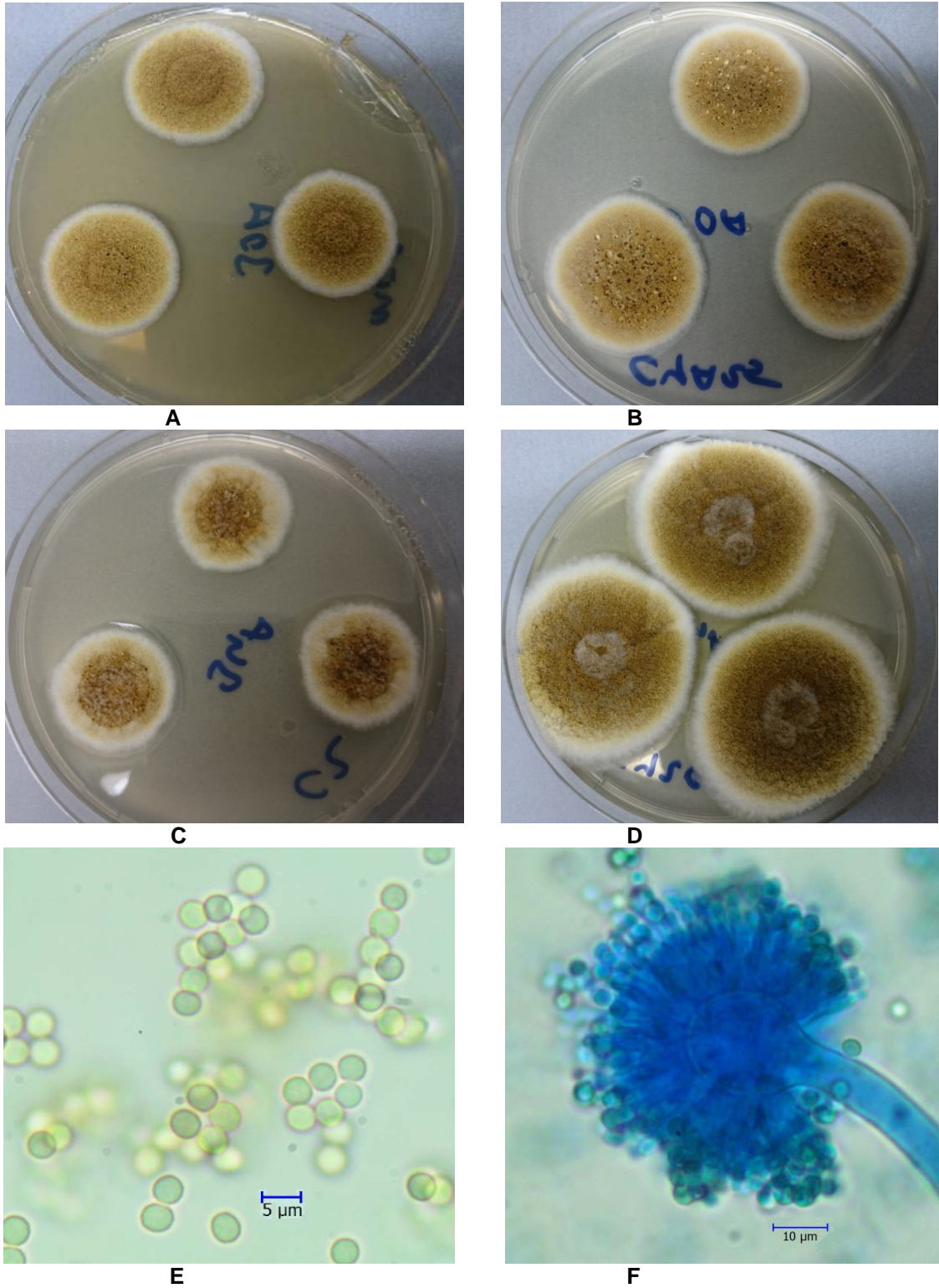
Şekil 1. *Aspergillus affinis* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 40$ F. Konidial baş $\times 40$



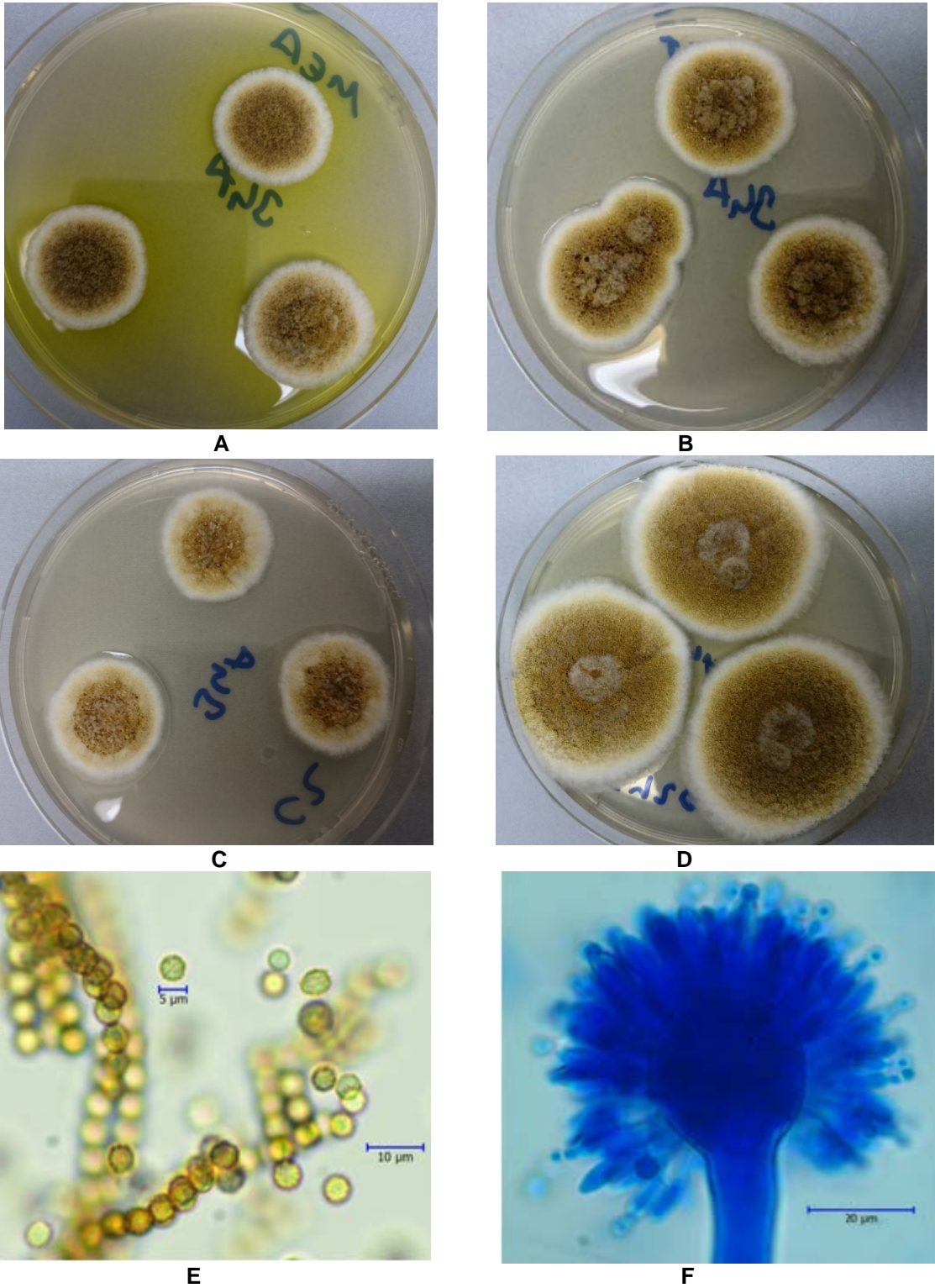
Şekil 2. *Aspergillus awamori* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 40$ F. Konidial baş $\times 40$



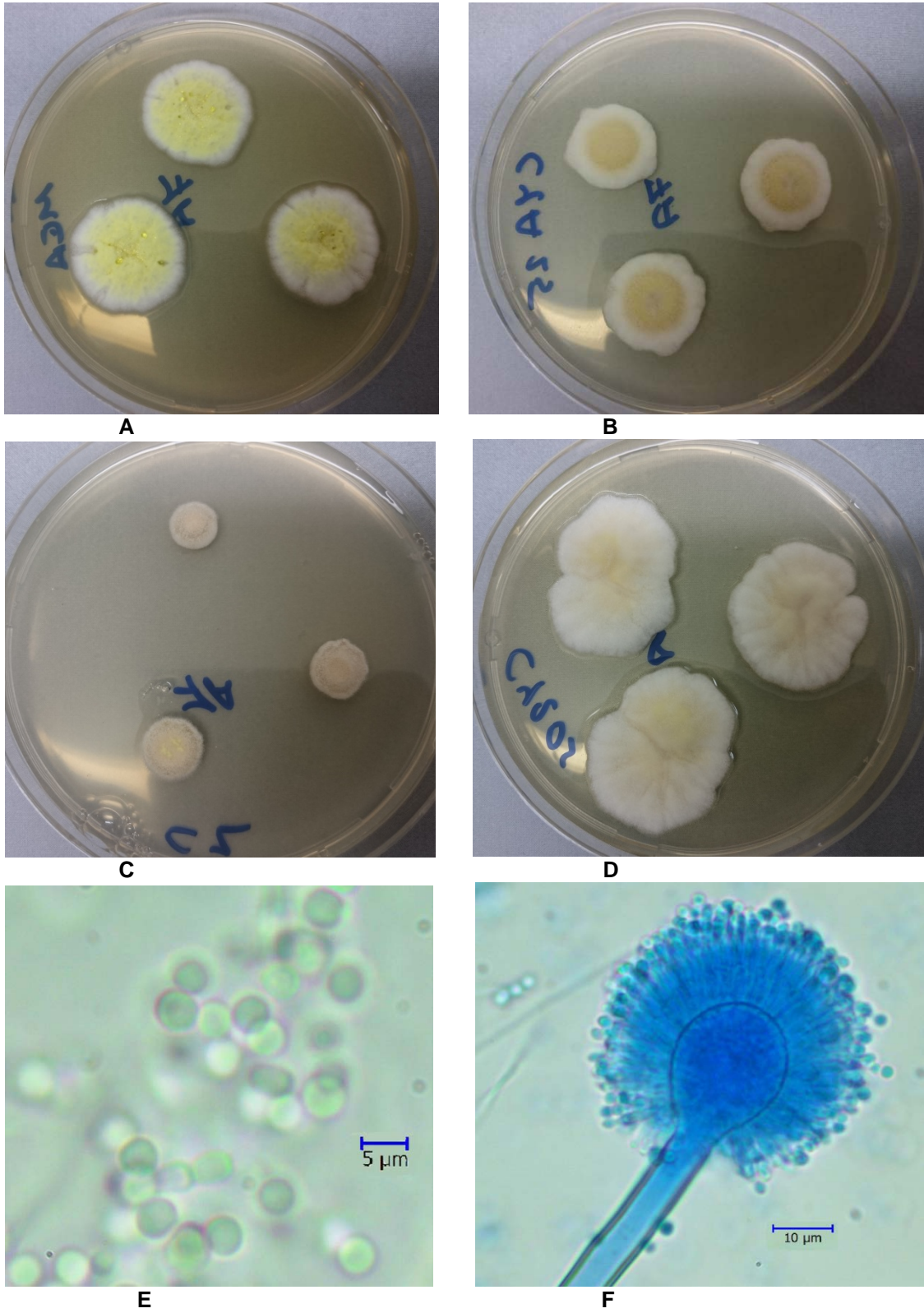
Şekil 3. *Aspergillus carbonarius* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 40$ F. Konidial baş $\times 40$



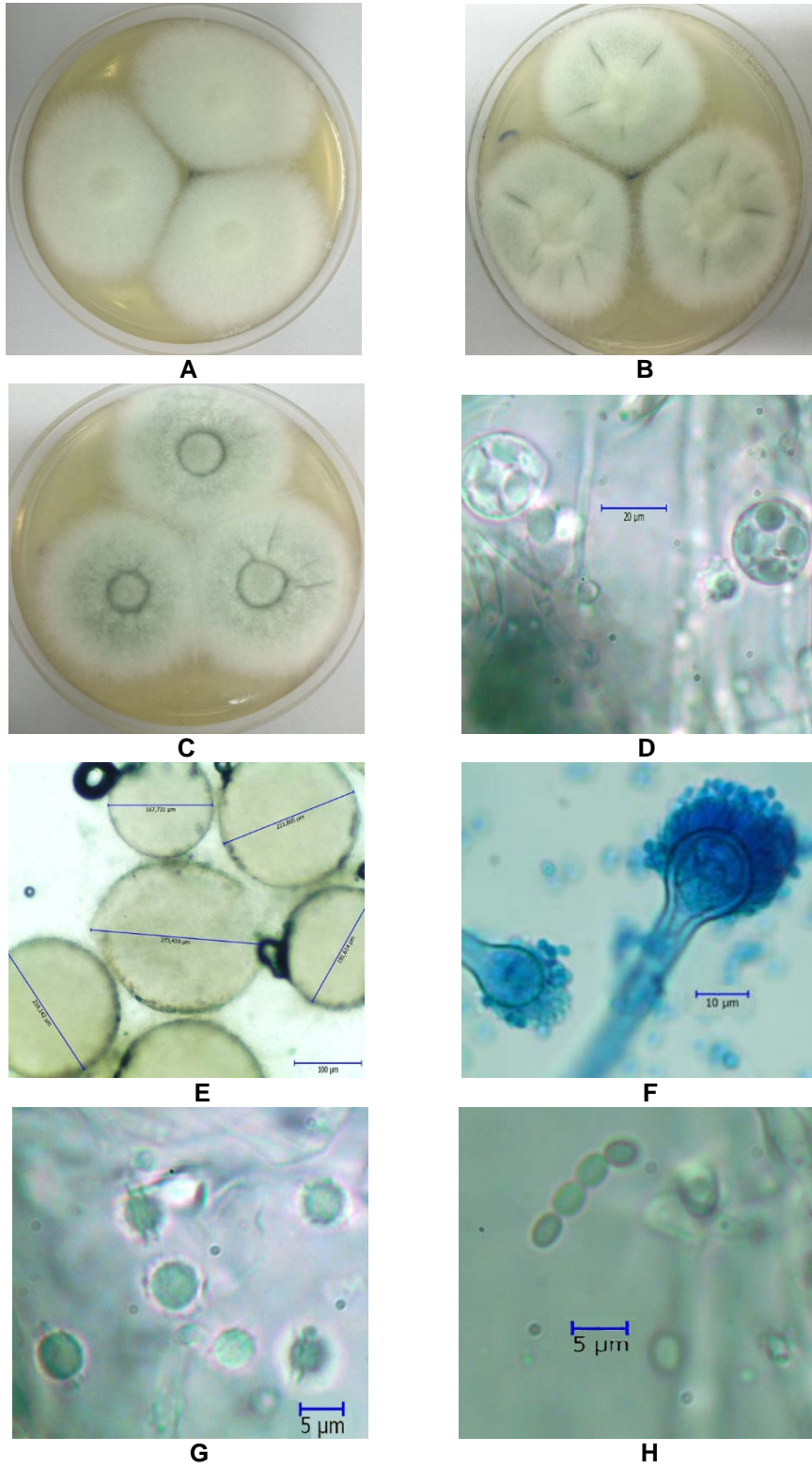
Şekil 4. *Aspergillus dimorphicus* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 100$ F. Konidial baş $\times 40$



Şekil 5. *Aspergillus europaeus* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 40$ F. Konidial baş $\times 40$



Şekil 6. *Aspergillus spelaesus* A. MEA B. CYA25 C. CZ D. CY20S besiyerlerinde 7 günlük koloni görünüşleri E. Spor yapısı $\times 100$ F. Konidial baş $\times 40$



Şekil 7. *Aspergillus fischeri* A. MEA B. CYA25 C. CY20S besiyelerinde 5 günlük koloni görünüşleri D. Askus $\times 100$ E. Kleistotesyum $\times 10$ F. Konidial baş $\times 40$ G. Askospor $\times 100$ H. Konidiospor $\times 100$



Tartışma

İzolasyon için kullanılan "Toprağı Sulandırma Metodu", ilk olarak bakteri izolasyonu için uygulanmaya başlanmış, daha sonra funguslara uyarlanmıştır. Bu yöntem *Aspergillus* cinsi gibi fazla spor üreten fungusların izolasyonunda avantaj sağlamaktadır. Fazla spor üretiminden dolayı diğer bazı türlerin üremesinin baskılanması söz konusu olabilir. Bu durum, petri kabına daha fazla paralel ekim yapılarak azaltılabilir, nitekim çalışmamızda ekimler 10 adet petri kabıyla yapılmıştır.

Elde edilen 52 adet fungal izolat üzerinde morfolojik ve moleküler tanımlama çalışmaları yapılmış ve 7 *Aspergillus* türü tespit edilmiştir. Fenotipik olarak tür düzeyinde tanımlanamayan türlerin varlığı moleküler veriler ile belirlenmiştir. *Aspergillus dimorphicus*'un morfolojik olarak *Aspergillus* Section *Cremeri*'ye ait olduğu bulunarak, tür düzeyinde teşhisi moleküler yöntem ile yapılmıştır. *Aspergillus affinis*'in *Aspergillus* Section *Circumdati*, *Aspergillus europaeus*'un *Aspergillus* Section *Cremeri* ve *Aspergillus spelaeus*'un *Aspergillus* Section *Flavipedes* bölümlerine ait oldukları bulunarak, tür düzeyinde teşhisleri moleküler yöntem ile yapılmıştır. *Aspergillus affinis*, *Aspergillus europaeus*, *Aspergillus spelaeus* türleri Türkiye için yeni kayıtlardır (Asan, 2004). Morfolojik çalışmalar ile teşhis edilemeyen bazı türler, moleküler yöntemlerle de ayırt edilememiştir. Morfolojik yöntemler ile bu örneklerin yalnızca *Aspergillus* Section *Nigri* üyesi türler oldukları tespit edilmiştir. 22A ve 26A kodlu örneklerin dizi analizleri yapılamamıştır. 23A ve 25A kodlu örneklerin blast analizleri sonucunda aynı Ident ve Query cover oranına sahip üç adet tür görülmektedir. Bunlardan *Aspergillus welwitschiae* ve *Aspergillus awamori* aynı Max score değerine sahiptir. 24A kodlu örneğin blast analizleri sonucunda aynı Ident ve Query cover oranı ve aynı Max score değerine sahip üç adet tür görülmektedir.

Teşhis için morfolojik, kolonyal ve moleküler tekniklerin birlikte kullanılması yararlıdır ve kıyaslama imkanı da vermektedir. Moleküler yöntemler gitgide gelişmesine rağmen yine de morfolojik ve kolonyal çalışmalar önemini korumaktadır (Asan, 2007).

Aspergillus tanımlamaları morfolojik tekniklere dayanmasına rağmen, DNA tabanlı moleküler çalışmalar da hız kazanmıştır (Gupta, 2016). Özellikle PCR yöntemleri, türe özgü primerler kullanarak hedef fungal gen bölgesini çoğaltan duyarlı yöntemlerdir (Goldman ve Osmani, 2008). Evrensel ribozomal DNA bölgelerine ITS (Internal Transcribed Spacer), büyük ribozomal alt birim D1-D2, β -tubulin (BenA) ve calmodulin (CaM) örnek

gösterilebilir (Balajee ve Ark., 2007). Bunların içinde ITS, fungusların resmi DNA barkodu olarak nitelendirilir. Ancak bu lokus bütün *Aspergillus* türlerini doğru tanımlamak için yeterli değildir (Gupta, 2016). Bazı durumlarda yakın türlerin ayırımını yapabilecek nükleotid farklılıklarına sahip değildir (Katoch ve Kapoor, 2014). Son dönemlerde filogenetik çalışmalarda, oldukça değişken intron bölgelerine sahip protein kodlayan genler tercih edilmektedir. Bu genlere, elongation factor 1 alpha, calmodulin, β -tubulin, actin ve histone genleri örnek gösterilebilir. Bunlar ITS'ye göre daha çok çeşitlilik gösterir ve daha elverişlidir. Çalışmamızda kullanılan calmodulin bölgesi, *Aspergillus* türlerinin ayırımında oldukça yararlıdır (Gupta, 2016).

Aspergillus cinsine bağlı türler toprakta bol bulunur. Birçok çalışmada en sık izole edilen toprak fungusları olarak görülmektedir. Örneğin; Çolakoğlu (2001)'nin İstanbul Belgrad Ormanı'nda yaptığı çalışmada, araştırma alanındaki topraklarda tür bakımından en zengin cins % 23.66 oranla *Aspergillus* olarak belirlenmiştir. Hasenekoğlu ve Sülün (1993) tarafından yapılan çalışma ve Eltem ve Ark. (2009) tarafından yapılan çalışmalarda da *Aspergillus carbonarius* ve *Aspergillus awamori* türleri tespit edilmiştir. *Aspergillus carbonarius*, Çöl (2006)'ün çalışmasında ve Göçmen ve Özkan (2001)'in çalışmasında tespit edilmiştir. *Aspergillus awamori*, Asan (1997)'in çalışmalarında tespit edilmiştir. *Aspergillus fischeri*, Öner (1970, 1973)'nin Çiğden ve Ekmekçi (1994)'nin ve Kara ve Bolat (2007)'in çalışmalarında da bulunmuştur. Çalıştığımız bölgede, Asan ve Ekmekçi (1994)'nin daha önce yaptığı çalışma da mevcuttur ancak sözkonusu çalışma moleküler yöntemlerle desteklenmediğinden, biyoçeşitliliği tam olarak yansıtmadığı düşünülmüş, nitekim iki araştırma arasında tür çeşitliliği bakımından farklılık olduğu görülmüştür.

Toprak fungusları, bakterilerle beraber toprakdaki organik maddeleri parçalamaları bakımından toprak verimliliğinde önemlidirler. Toprak mikrobiyal çeşitliliği ve sayısının tespiti toprak verimliliğinin de durumda olduğuyla ilgili bize değerli bilgiler verir. Çalışmamızda, toprakta bol olduğu bilinen *Aspergillus* türleri üzerinde durularak, çalışılan bölgedeki biyoçeşitliliği araştırılmış, çeşitliliğin yüksek olduğu görülmüştür. Fungus açısından çok zengin olan toprak çalışmalarına çeşitliliği ortaya koymak oldukça zordur. Çalışmamızda yeni kayıtların tespit edilmiş olması kullanılan yönteminin biyoçeşitlilik çalışmaları için uygun olduğunu göstermektedir. Çalışılan bölgenin nehir taşmaları nedeniyle alüvyon bakımından zengin olması, *Aspergillus* tür çeşitliliğini desteklemiş olabilir.

Kaynaklar

- Adametz, L. Untersuchungen uber die niederen Pilze der Acker - krume. Inaugural-Dissertation. Leipzig, 78 pp, 1886. (Bu makalenin orijinaline ulaşılamamış, bilgiler Tresner ve Ark., 1954 ve Kanauja ve Ark., 1977'den alınmıştır).
- Asan, A., Ekmekçi, S., The Determination of *Penicillium* and *Aspergillus* in Edirne Soils and Their Seasonal distribution. *Turk. J. Biol.* 18 (4): 291-303, 1994.
- Asan, A. Trakya Bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florası üzerinde araştırmalar-1. *Turk. J. Biol.* 21: 89-101, 1997.



- Asan, A., Ekmekçi, S. Contribution to the colonial and morphological characteristics of Some *Aspergillus* species isolated from soil. *J. Fac. Sci. Ege Univ.* 25 (1): 121-139, 2002.
- Asan, A. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon.* 89 (1): 155-157, 2004 (Son güncelleme tarihi: 10 Şubat, 2015).
- Asan, A. Tıpta önemli mantarların filogenetik ve sistematigi. *İnf. Derg.* 21 (2): 21-31, 2007.
- Asan, A., Sarıca Ökten, S., Şen, B. Airborne and soilborne microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kırklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. *Environ. Mon. Assessment.* 164 (1-4): 221-231, 2010.
- Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S-B., Yaghuchi, T., Varga, J., Samson, R. A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud. In Mycol.* 59 (1): 39-46. 2007.
- Bıyık, H., Törün, B., Geroğlu, Y., Poyrazoğlu Çoban, E., Başbülbul, G. Preservation and molecular identification of *Aspergillus* and *Penicillium* species with ITS-PCR. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 4 (11): 4-7, 2016.
- Brown, J. C. Soil fungi of some British sand dunes in relation to soil type and successions. *Ecology.* 46: 641-664, 1958.
- Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W. Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 525-564, 1991.
- Cireli, B., Öztürk, M. Bitki ekolojisi uygulamaları. Ege Üniv Fen Fak. Yay. 21-25, 1973.
- Çiğden, N., Ekmekçi, S. Yamanlar Dağı güney yamacı mikrofungus florasının araştırılması. *XII. Ulusal Biyoloji Kongresi. Botanik sekiyonu posterler kitabı.* Cilt II, 137-140, Edirne, 1994.
- Çolakoğlu, G. İstanbul/Belgrad Ormanı'nda karaçam (*Pinus nigra* Arnold.) ve meşe (*Quercus* spp.) meşçerelerinin topraklarındaki mikrofungus floraları ve bunların karşılaştırılması üzerine bir araştırma. *İstanbul Üniv. Orman Fak. Derg.* 51 (1): 95-116, 2001.
- Çolakoğlu, G. Karaçam (*Pinus nigra* Arnold.) meşçerelerinin topraklarındaki mikrofungus florası üzerinde araştırmalar. *İstanbul Üniv. Orman Fak. Derg.* 52 (1): 115-124, 2002.
- Çöl, A. Değişik ekolojik koşullarda saksı toprağında bulunan alerjik küf florasının saptanması. YL tezi. Marmara Üniv. Fen Bil. Enst. İstanbul, 2006.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. Compendium of soil fungi, Vol. 1, pp. 77-124, Academic Press, London, 1980.
- Eltel, R., Taşkın, E., Pazarbaşı, S. Biodiversity and flora of microfungi from sultana-type vineyard soils in Turkey. *Fres. Environ. Bull.* 18 (1): 82-86, 2009.
- Games, W., Van der Aa, H. A., Van der Plaast-Niterink, A. J., Samson, R. A., Stallpers, J. A. CBS Course of mycology. CBS-Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn, p. 137, 1987.
- Goldman, G. H., Osmani, S. A. The *Aspergilli* genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods. CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.
- Göçmen, H., Özkan, V. K. A research on the microfungus flora of some greenhouse soils in the vicinity of Lapseki Çanakkale, Turkey. *Mycopathol.* 153 (2): 103-112, 2001.
- Gupta, V. K. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: *Aspergillus* system properties and applications. Chapter 3: Molecular Evolution of *Aspergillus*, Elsevier, 41-51 pp., 2016.
- Hasenekoğlu, İ., Sülün, Y. Erzurum Aşkale çimento fabrikasının kirlettiği toprakların mikrofungus florası üzerine bir araştırma. *Turk. J. Bot.* 15 (1): 20-27, 1990.
- Hasenekoğlu, İ. Toprak Mikrofungusları, Cilt I, Atatürk Üniv. Yay. No: 689, Kazım Karabekir Eğitim Fak. Yayınları No: 11, Erzurum, 1991.
- Hocking, A. D., Pitt, J. I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 488-492, 1980.
- İlhan, S., Asan, A. Soilborne fungi in wheat fields of Kırka Vicinity (Eskişehir-Turkey). *Biologia.* 56 (4): 363-371, 2001.
- İlhan, S., Demirel, R., Asan, A., Bayçu, C., Kınacı, E. Colonial and morphological characteristics of some microfungus species isolated from agricultural soils in Eskişehir Province (Turkey). *Turk. J. Bot.* 30 (2): 95-104, 2006.
- Kanaujia, R.S., Singh, C.S. Studies on certain ecological aspects of soil fungi VI. Fungi in relation to locality type, cover vegetation and physico-chemical characters of the soils. *Sydowia.* 30: 112-121, 1977/1978.
- Kara, Ö., Kuzey Trakya dağlık yetişme ortamı bölgesindeki meşe, kayın ve karaçam ormanlarındaki toprak mikrofungusları. *Anadolu Üniv. Bil. Teknol. Derg.* 6 (2): 167-174, 2005.
- Kara, Ö., Bolat, İ. Influence of soil compaction on microfungus community structure in two soil types in Bartın Province, Turkey. *J. Basic Microbiol.* 47: 394-399, 2007.
- Katoch, A., Kapoor, P. Recent concepts in fungal taxonomy: A review. *Research and Reviews: J. Agr. Allied Sci.* 3 (2): 23-35, 2014.
- Klich, M. A. Identification of common *Aspergillus* Species. 1. Baskı. 122 pp., Published by the Centraalbureau voor Schimmelcultures-CBS, Utrecht, The Netherlands, 2002.
- Machida, M., Gomi, K. *Aspergillus*: Molecular biology and genomics. Chapter 1: An overview of the genus *Aspergillus*. Joan W. Bennett, Caister Academic Press, 2010.
- Öner, M. Soil microfungi of Turkey. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 42: 81-87, 1970.
- Öner, M. Atatürk Üniversitesi Erzurum Çiftliği Eğirli Dağı kuzey yamacı ve Trabzon-Hopa sahil şeridi mikrofungus florası ile ilgili bir araştırma. Atatürk Üniv. Yay. No: 158, Sevinç Matbaası, Ankara, 1973.
- Özdemir, B. G., Bıyık, H., Kalyoncu, F., Kalmış, E., Oryaşın, E., Aydın. İzmir ve Manisa illerinde endüstriyel atıksular ile kirlenmiş toprakların mikrofungus florasının belirlenmesi. *Ekoloji.* 20(80): 66-73, 2011.
- Paul, E. A., Soil microbiology, ecology and biochemistry. Elsevier Academic Press, 2007.
- Raper, K. B., Fennell, D. I. The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, 686 pp., Baltimore, USA, 1965.
- Raper, K. B., Thom, C. A manual of Penicillia. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1949.



- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R. R. M., Lima, N., Venâncio, A. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, A. Mendez-Vilas Ed., Formatex, p.527-534, 2007.
- Rossmann, A., Tulloss, R., Dell, T., Thorn, R. G. Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in a Costa Rican conservation area. Parkway Publishers, pp. 195, Inc. Boone, North Carolina, 1998.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. Food and indoor Fungi, CBS KNAW Biodiversity Center, Utrecht, 2010.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the Genus *Aspergillus*. *Stud. In Mycol.* 78: 141-173, 2014.
- Singh, S., Sandhu, D. K. Thermophilous fungi in port blair sails. *Can. J. Bot.* 64: 1018-1026, 1986.
- Sülün, Y., Hasenekoğlu, İ. A study on *Aspergillus* Mich ex Fr. and *Penicillium* Link ex Gray flora of the soils of Northeast Anatolia. Türkiye. *Turk. J. Bot.* 17: 49-60, 1993.
- Sümer, S. Genel Mikoloji. 1. Basım, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006.
- Tansey, M. R., Jack, M. A. Thermophilic fungi in sun-heated soils. *Mycologia.* 68: 1061-1075, 1976.
- Tresner, H.D., Backus, M.P., Curtis, J.T. Soil microfungi in relation to the hardwood forest continuum in Southern Wisconsin. *Mycologia.* 46 (3): 314-333, 1954.
- Waksman, S. A. A method counting the numbers of fungi in the soil. *J. Bact.* 7: 339-341, 1922.
- Waksman, S. A. Principles of soil microbiology. The Williams & Wilkins Company, 1927.
- Waksman, S. A. Soil Microbiology, John Wiley and Sons Inc., p. 356, New York, 1952.