

## Yerfıstığından İzole Edilen *Aspergillus section Flavi* Türlerinin Tanımlanması ve Mikotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Işılav Lavkor  

Tarım ve Orman Bakanlığı, Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana

Geliş Tarihi (Received): 11.10.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 01.12.2019

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [isilav.lavkor@tarimormman.gov.tr](mailto:isilav.lavkor@tarimormman.gov.tr) (I. Lavkor)

☎ 0 322 344 17 84 📠 0 322 344 17 02

### ÖZ

Bu çalışmada, Adana ve Osmaniye illerinden toplanan yerfıstığı örneklerinden izole edilmiş 50 *Aspergillus section Flavi* üyesi izolatin morfolojik ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle tanımlamaları yapılmıştır. Ayrıca, izolatların *in vitro* koşullarında aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturma özellikleri belirlenmiştir. *Aspergillus* spp. tanımlanmasında DNA ekstraksiyonları yapılmış,  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesi ile PZR çoğaltılmıştır. Türlerin tanımlanmasında  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesine ait sekans sonuçları Blast (Basic Local Alignment Search Tool)'da bilinen ribozomal sekanslar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, fungal izolatların 33'ü *Aspergillus flavus*, 17'si *Aspergillus parasiticus* olarak tanımlanmıştır. Blast analizi sonucunda ise *A. flavus* ve *A. parasiticus* türüne ait  $\beta$ -*tubulin* gen sekansı karşılaştırmaları sırası ile %89-100 ve %96-100 oranları arasında benzerlik göstermiştir. Ayrıca, *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının tümü *in vitro* koşullarında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile sırasıyla 0.45 ile 4521.64  $\mu$ g/L ve 0.22 ile 2562.87  $\mu$ g/L aralığında aflatoksin üreticisi olduğu belirlenmiştir. İnce tabaka kromatografisiyle (TLC) 32 *A. flavus* izolatu 0.35-8.21  $\mu$ g/g aralığında siklopiazonik asit üretmiştir. Bu çalışma, Adana ve Osmaniye illerinden toplanan yerfıstığı örneklerinden izole edilen *A. section Flavi*'nin moleküler karakterizasyonu için yeni bir yöntem sunmaktadır. Ayrıca bu araştırma Adana ve Osmaniye illerinden toplanan yerfıstığı örneklerinden izole edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının mikotoksin oluşumundan sorumlu türler olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, PZR, Mikotoksin, Yerfıstığı

### Identification of *Aspergillus section Flavi* Species from Peanuts and their Mycotoxigenic Properties

#### ABSTRACT

This study is aimed to identify 50 *A. section Flavi* isolates from peanut samples collected in the Adana and Osmaniye provinces of Turkey by using morphological and polymerase chain reaction (PCR), and to determine the *in vitro* aflatoxin and cyclopyazonic acid formation properties of the isolates. DNA was extracted for the identification of *Aspergillus* spp., and  $\beta$ -*tubulin* gene region on DNA was amplified by PCR. Identification of species was determined by comparing the result of sequences which belong to partial  $\beta$ -*tubulin* of the sequences with known ribosomal sequences using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). In the study, out of a total 50 fungal isolates, 17 were identified as *A. parasiticus*, and 33 were identified as *A. flavus*. As a result of Blast analysis of  $\beta$ -*tubulin* gene sequence comparisons *A. flavus* and *A. parasiticus* showed a major similarity in ranges 89-100% and 96-100%, respectively. Furthermore, all of the *A. flavus* and *A. parasiticus* isolates were determined as aflatoxin producers in the range from 0.45 to 4521.64  $\mu$ g/L and 0.22 to 2562.87  $\mu$ g/L with high-performance liquid chromatography (HPLC) under *in vitro* conditions, respectively. Total 32 *A. flavus* isolates produced cyclopiazonic acid in the range between 0.35-8.21  $\mu$ g/g with thin layer chromatography (TLC). The present study provides a new method on molecular characterization of *A. section Flavi* on peanut samples collected from the Adana and Osmaniye provinces of Turkey.

This research also demonstrated that *A. flavus* and *A. parasiticus* were responsible for mycotoxin contamination on peanut samples collected from Adana and Osmaniye provinces.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, PCR, Mycotoxin, Peanut

## GİRİŞ

Yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.), Fabaceae familyasına ait tek yıllık bir bitki olup, tohumunda yüksek oranda yağ içermektedir. *Aspergillus* türleri yerfıstığı tohumunun üzerinde bulunmakla birlikte, tarla koşullarından itibaren depolama süresi boyunca etkili olmaktadır [1]. Bazı *A. section Flavi* üyesi hastalık etmenleri tarımsal ürünlerde hastalık oluşturarak zarar vermelerinin yanı sıra, bazıları da ikincil metabolizma faaliyetleri sonucu mikotoksin üretirler [2]. Mikotoksinler arasında en önemli olanı aflatoksinlerdir. Aflatoksinler *A. flavus*, *A. parasiticus* ve çeşitli toksijenik *Aspergillus*'a bağlı funguslar tarafından sentezlenen mikotoksinlerdir [3]. Aflatoksin'e ek olarak *A. flavus* tarafından üretilen diğer bir mikotoksin siklopiazonik asittir [4]. Aflatoksinin tek başına toksisitesinin yanı sıra *A. flavus* türleri tarafından siklopiazonik asit ile birlikte üretilmesi, aflatoksin ve/veya siklopiazonik asidin toksisitesini arttırmaktadır. Pushvinder ve Desai [5] Hindistan'da yerfıstığı örneklerinden elde ettikleri 150 *A. flavus* izolatının 52'sinin aflatoksin ve siklopiazonik asit, 32 izolatın sadece siklopiazonik asit, 33 izolatın sadece aflatoksin ürettiği, 33 izolatın ise hiçbir toksini üretmediğini bildirmişlerdir. Arjantin'de yetiştirilen yerfıstığı, buğday ve soyada farklı ürün gruplarından izole edilen *Aspergillus* cinsi fungusların aflatoksin ve siklopiazonik asit üretiminin incelendiği çalışmada, siklopiazonik asit üreticisi *A. flavus* izolatı sayısının oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada yerfıstığından elde edilen *A. flavus* izolatının %94'ünün, buğdaydan elde edilenlerin %93'ünün ve soya fasulyesinden izole edilenlerin de %73'ünün siklopiazonik asit ürettiği belirlenmiş, aflatoksin B üreten siklopiazonik asit üretmeyen izolat sayısının oldukça az olduğu rapor edilmiştir [6].

Fungal türlerinin tanımlanmasında morfolojik yöntem, farklı besiyerlerinin kullanıldığı morfolojik ve fenotipik çalışmaları içermektedir [7]. Fakat bu yöntemler zaman, işgücü ve özellikle de uzmanlık gerektirmektedir. Ayrıca, morfolojik tanımlama zaman zaman değişkenlik gösterebilmekle beraber işgücü kaybına sebep olmasının yanı sıra deneyimli, tecrübeli personel ihtiyaç duyulmaktadır [8]. Bu sebeplerden dolayı fungal tür tanımlanmasında moleküler düzeyde DNA analizleri kullanılmaya başlanmıştır [9].

Moleküler analizler arasında; Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-Random amplified polymorphic DNA), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP-Amplified fragment length polymorphism), Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP-Restricted fragment length polymorphism), Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qRT PCR- Quantitative Real Time Polimeraze Chain Reaction), Çoklu PCR (Multiplex Polimeraze Chain Reaction), İç İçte PCR (Nested Polimeraze Chain Reaction) sayılabilmektedir [10].

Moleküler yöntemler; mikroorganizmadan DNA ekstraksiyonu, PCR ile amplifikasyonu, çoğaltılan ürünün saflaştırılması, DNA dizi analizlerinin yapılması ve elde edilen sonuçların bir yazılım programı yardımıyla gen bankasında kayıtlı izolatlar ile karşılaştırılarak dendogramlarının oluşturulmasından meydana gelmektedir [11]. *Aspergillus* spp. türlerinin PCR'a dayalı tanımlamaları, 18S rDNA, mitokondriyal DNA, Intergenic Spacer Bölgesi (IGS) ve Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerine dayanmaktadır [7, 12]. PCR kullanımı ile *A. section Flavi* üyelerinin tanımlanmasında daha çok *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae* ve *A. sojae* türlerini hedef alan çalışmalar yapılmıştır [13-16].

Bu çalışma ile Adana ve Osmaniye illerinde yerfıstığı alanlarından ve depolardan toplanan yerfıstıklarından izole edilen *Aspergillus section Flavi* üyelerinin morfolojik ve moleküler yöntemi ile tanımlamalarının yapılarak, *in vitro* koşullarda aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma bölgemizde yerfıstığına mikotoksijenik özelliğine sahip hangi türlerin baskın olduğu yönünden belirlenen ilk çalışma olması nedeni ile de ayrıca önemlidir.

## MATERYAL VE METOT

### Yerfıstığı Tohumlarından Fungal İzolatların Elde Edilmesi

Çalışmada, 50 *Aspergillus section Flavi* üyesi fungal izolat kullanılmıştır. İzolatlar, Ülkemizde en fazla ekim alanına sahip Adana ve Osmaniye illerine ait 70 adet yerfıstığı alanından ve 32 adet depodan olmak üzere toplam 102 adet yerfıstığı örneğinden izole edilmiştir. Yerfıstığı örnekleri, Adana ve Osmaniye illerinde yerfıstığı alanları ve depolardan tesadüfi örnekleme metodu ile alınmıştır. İzolasyon çalışmaları için yerfıstığı ürün yığınının farklı yön ve derinliklerinden yaklaşık 5 kg tane örneği oluşturmak üzere, yığın büyüklüğüne göre 5-15 noktadan birincil örnekler alınıp karıştırılmıştır. Bu karışımdan 1 kg iç elde edilecek miktarda alt örnek temiz kese kağıtlara konularak ve etiketlenerek uygun koşullarda laboratuara getirilmiştir. Örnekler, izolasyon aşamasına kadar etiketli bez torbalar içerisinde, 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir [17].

### A. section *Flavi* İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri ve Tanısı

*Aspergillus* türlerinin tanımlanmasında Raper ve Fennel [18], Samson ve Pitt [19] tarafından geliştirilmiş spesifik tür tanımlama anahtarı kullanılmıştır.

## A. section *Flavi* İzolatlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması

### A. section *Flavi* İzolatlarının Hazırlanması

Yerfıstığı örneklerinden izole edilmiş 50 *A. section Flavi* üyesi fungal izolat Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine ekimi yapılmış ve 25°C'de 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen sporlanmış fungal kolonilerinden bir halka öze dolusu örnek, tarafımızca oluşturulan 20 mL PDA (200 mL için: 8 g glikoz, 75 g patates ve 3 g agar) besiyeri yüzeyinde üste gelecek şekilde birbirine paralel zikzaklar çizilmiştir. Daha sonra petriyer alüminyum folyo ile sarılarak inkübatörde 25°C'de bir gece süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

### A. section *Flavi* İzolatlarından DNA İzolasyonu

Fungal izolatlarının genomik DNA ekstraksiyonu PCR fungal DNA izolasyonunda kullanılan Doyle ve Doyle [20] CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) protokolü tarafımızca modifiye edilmiştir. Yönteme göre petride gelişen fungal miseller lam ile havan içerisine sıyrılarak, sıvı azotta ezilmiştir. Un haline gelen fungal misellerin üzerine 1 mL CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisi [%2 (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, %0.2 (v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol, 0.1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA] eklenerek karıştırılmıştır. Çözelti 2 mL'lik tüplere aktarılmış ve 65°C'de 60 dk Thermomixer'de inkübasyona bırakılmıştır. Çıkarılan tüpler buz içerisinde 1-2 dk soğutulmuş ve daha sonra 1000  $\mu$ L kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenerek alt üst edilmiştir. Ardından 13.000 rpm 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazdan 600  $\mu$ L alınarak 1.5 mL'lik yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 600  $\mu$ L soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir. Tüpler en az 2 saat süreyle -20°C'de bekletilmiştir. Daha sonra 10.000 rpm 10 dk santrifüj edilen tüplerdeki üst faz dökülmüştür. Kalan katı fazın üzerine 1 mL %70'lik etanol eklenerek 11000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Ardından üst faz atılmıştır. Geriye kalan pelletin çevresinde biriken etil alkol pipet yardımıyla alınarak tüpler ağızı açık olarak 1-2 saat kurutulmuştur. Daha sonra katı faza 100 mL saf su eklenerek eritilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop) ölçümler yapılarak belirlenmiştir.

### PCR Reaksiyonlarının Hazırlanması

Ektrakte edilen tüm genomik DNA örnekleri 340 baz çifti (bc) büyüklüğünde Tub-F (5'-CTCGAGCGTATGAACGTCTAC-3') ve Tub-R (5'-AAACCCTGGAGGCAGTCGC-3') primer çifti [21, 22] kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyon karışımı toplam 25  $\mu$ L olacak şekilde Genomik DNA: 1  $\mu$ L, buffer (Thermo Science, 10X Dream Taq Green Buffer): 12.5  $\mu$ L, primer Tub F (forward, 10 pmol): 1  $\mu$ L, primer Tub R (reverse, 10 pmol): 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O: 9.5  $\mu$ L olarak hazırlanmıştır. Karışımın bulunduğu tüpler thermocycler cihazına koyularak, tarafımızca modifiye edilen döngü programına göre [ilk döngü: 95°C'de 3 dk, sonraki 40 döngü: 95°C'de 30s, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 60s ve 72°C'de 10 dk (Tub için)] DNA'lar çoğaltılmıştır.

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 3 saat süreyle 70 voltta 1X TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH:8.0) buffer eklenerek yürütülmüştür. Jel %0.5  $\mu$ g/mL oranındaki Ethidium bromid solüsyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek DNA bant profilleri görüntülenmiştir.

### DNA Dizi Analizi

PCR analizinden sonra çift yönlü DNA dizi analizine (sekans analizi) tabi tutulmuştur. Çalışmada  *$\beta$ -tubulin* gen bölgesi TubF/R primer çifti ile amplifiye edilmiş, 50 örneğin DNA dizi analizleri Medsantek firmasına yaptırılmıştır. Sınıflandırma analizinde  *$\beta$ -tubulin* bölgesine ait gen dizilimleri temel alınarak çoklu nükleotid dizi analizi gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizinden elde edilen  *$\beta$ -tubulin* gen bölgesi dizileme çalışmaları CLUSTALW [23] programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi (BLAST) ile yapılmıştır. Elde edilen tüm veriler Mega 6.0 programı [24] kullanılarak değerlendirilmiştir.

### Fungal İzolatların Mikotoksin Analizi

Çalışmada izole edilen 50 *A. section Flavi* izolatlarının aflatoksin miktarlarını belirlemek için HPLC, siklopiazonik asit oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde ise TLC kullanılmıştır.

### A. section *Flavi* İzolatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Aflatoksin Analizi

Çalışmada izole edilen 50 *A. section Flavi* izolatlarının aflatoksin üretim potansiyelini belirlemek için, kültürler, 7 gün boyunca 28°C'de patates dekstroz agarında geliştirilmiştir. Fungus sporları besiyeri yüzeyinden Tween 20 (%0.2) çözeltisiyle alınarak, Whatman No: 1 filitre kağıdı ile süzümüştür. 5x10<sup>6</sup> spor/mL olacak şekilde hazırlanan spor süspansiyonu, 12 mL'lik hacimdeki amber renkli viallere alınmıştır [25]. HPLC cihazının özellikleri; dalga boyu Ex: 360 nm; Em: 440 nm; sıcaklık: 25°C; pompa akış hızı: 1 mL/dk; basınç: <300 bar; enjeksiyon hacmi: 100  $\mu$ L; çarpım faktörü: 2'dir. Toplam aflatoksin standardı (P22/P22A, R-Biopharm), 6 mL hacminde 1000  $\mu$ g/L konsantrasyondadır. HPLC için mobil faz asetonitril/su/metanol (200/600/300 v/v/v) hazırlanmış olup, içerisine 385  $\mu$ L HNO<sub>3</sub> (nitrik asit) ve 132 mg KBr (potasyum bromür) ilave edilmiştir [26].

### A. section *Flavi* İzolatlarının İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Siklopiazonik Asit Analizi

Çalışmada *A. section Flavi* izolatlarının besiyerinde siklopiazonik asit oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde PDA besiyeri kullanılmıştır. Petrilere 2-3 mL metanol pipetle eklenerek lam ile *A. flavus* izolatları kazınarak 250 mL hacimli erlene koyulmuştur. *A. flavus* süspansiyonuna 50 mL metanol:su (2:1 v/v) hacminde

eklenerek 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım susuz sodyum sülfat yardımı ile kaba filtre kağıdından süzülmüştür. Süzüntü 40°C'de su banyosunda evapore edilerek kurutulmuştur [27].

### Siklopiazonik Asit Standartlarının Hazırlanması

Toz haldeki siklopiazonik asit standardı (C-1530, Sigma Aldrich) 5 mg toz halde temin edilmiş olup, firma tarafından gönderilen protokole göre 5 mL hacmindeki metanol ile çözündürülerek 1000 ppm lik stok çözelti elde edilmiştir. Daha sonra bu çözeltiden 50 ppm lik siklopiazonik asit ara stok çözeltisi hazırlanmıştır (Anonim, 2016). Analiz için kullanılan ince tabaka (Merck Silica-Gel 60 EM-5721) plakalarına küf ekstraktlarıyla birlikte farklı miktarlarda (1-2-3-5-7 µL) siklopiazonik asit standardı spotlanmıştır [28].

### İnce Tabaka Plakalarının Geliştirilmesi

Hazırlanan ince tabaka plakaları içinde etil asetat: 2 propanol: sodyum hidroksit (50:15:10 v/v/v) bulunan kromatografi tankında 35-40 dk boyunca karanlık bir ortamda geliştirilmiştir. Tanktan çıkarılan plakalar 35°C'de 3 dk boyunca etüvde kurutulmuştur. Bunu takiben Erlich's reaktifıyla (75 mL etanol ve 25 mL konsantre HCl içerisinde 1 g 4-dimetilaminobenzaldahit) spreylenebilir [27].

### Plakaların Değerlendirilmesi

Toksinin bu reaktifle reaksiyon vermesine bağlı olarak gözle görülebilir şekilde mavi-mor noktaların görülmesi durumunda değerlendirme pozitif olarak yapılmıştır. Renk şiddetine göre standartlarla görsel olarak karşılaştırılarak miktar tayini yapılmıştır. Miktarın belirlenmesi için  $\mu\text{g}/\text{kg} = (S \times Y \times V) / (X \times W)$  formülü kullanılmıştır [28]. S: Örnek ekstraktıyla aynı şiddetteki siklopiazonik asit standardının miktarı (µL); Y: Siklopiazonik asit standardının konsantrasyonu (µg/mL); V: Örnek ekstraktının seyreltme miktarı (µL); X: S miktardaki mikotoksin standardıyla aynı şiddeti veren örnek miktarı (µL); W: Ayırma hunisine transfer edilen sıvıdaki örnek miktarıdır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### A. section *Flavi* İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri ve Tanısı

Çalışmada yapılan *Aspergillus* tür tanımlamalarında A. *flavus* ve A. *parasiticus* belirlenmiştir. A. *flavus*'un dahil edildiği grubun belli başlı özellikleri, konidial başlığın parlak küre ya da sütun şeklinde ve sarımsı yeşil, sterigma tipik olarak iki sıralıdır. Fialidler ya direk olarak ya da metuale üzerinde yer alabilmektedir. Sklerotları koyu kırmızımsı kahverengiden, morumsu kahverengiye

değişmektedir. Konidiler yuvarlak ya da yuvarlağa yakın, soluk yeşil renkli, ortalama çapı 3-5 µm'dir. Vesikül yuvarlak ya da yuvarlağa yakındır, çapı ise ortalama 50–65 µm ölçülmüştür. 24°C'de koloni çapı 4. günde 22 mm, 12. günde ise 65 mm'ye ulaşmıştır. Koloniler kadifemsi, sarıdan yeşile değişen veya kahverengindedir. Koloninin ters tarafı kremden sarı-kahverengimsi renkte görülmektedir. Konidioforlar değişken uzunlukta, pütürlü, çukurlu, dikensidir.

A. *parasiticus*'un konidial başlığı sütun şeklindedir. Konidiler küresel, sarı yeşil renkte ve pürüzlü duvara sahip, ortalama çapı 2-4 µm'dir. Fialidler, vesikülün direk olarak üzerinde yer almaktadır. Vesikül yuvarlağa yakın görünümde, çapı ortalama 55–70 µm'dir. 24°C'de koloni çapı 4. günde 25 mm, 12. günde ise 45 mm'ye ulaşmıştır. Koloniler açık sarıdan sarımsı yeşile değişen veya koyu sarı gibi farklı renkleri içermektedir. Koloninin ters tarafı kremden sarı-kahverengimsi renkte görülmektedir. Konidioforlar değişken uzunlukta, pürüzlü yeşil renkte keçemsi görünümündedir.

### A. section *Flavi* İzolatlarının Moleküler Yöntemle Tanımlanması

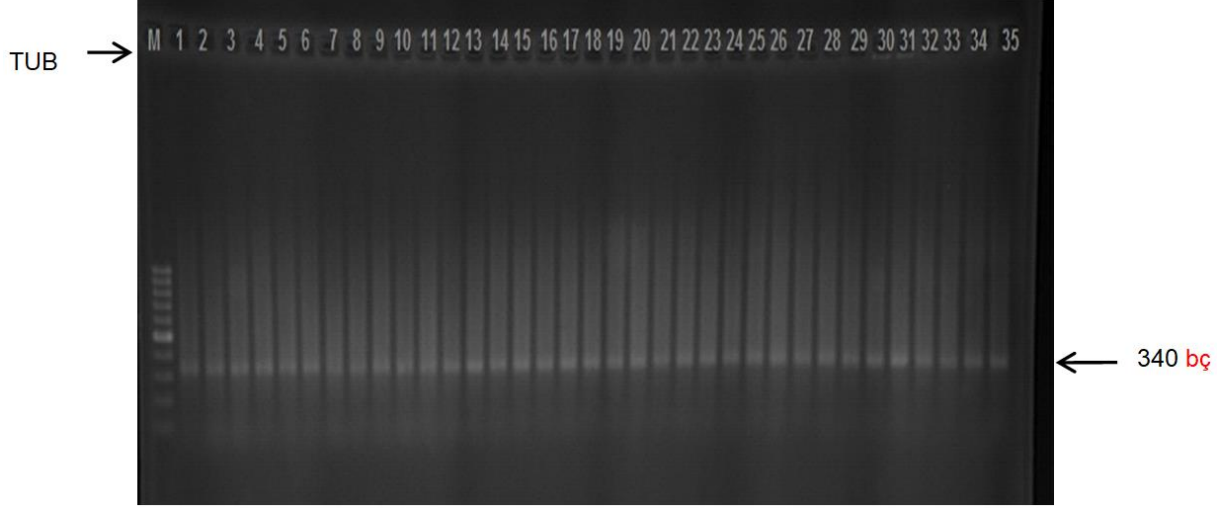
#### A. section *Flavi* İzolatlarının PCR Analizi

Yerfıstığı örneklerinden izole edilmiş 50 A. section *Flavi* üyesi izolatın genomik DNA ekstraksiyonu sonrasında  $\beta$ -*tubulin* Tub-F/R; IGS IGS-F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesinde 340 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 1). *Aspergillus* türlerinin toksijenik özelliklerinin belirlenmesinde morfolojik yöntem yeterli olmamaktadır [29]. Bu nedenle fungus türlerinin belirlenmesine yönelik çeşitli moleküler çalışmalar yapılmaktadır [12].

#### DNA Dizi Analizi

Çalışmamızda  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesi Tub F/R primer çifti ile çoğaltılan 50 adet PCR ürünü bant oluşumu gözlenen tüm izolatların karşılaştırılabilmesi amacı ile  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesinden elde edilen PCR ürünleri çift yönlü DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. Örnekler ait DNA dizi analiz sonuçlarının tür tanımlaması,  $\beta$ -*tubulin* gen bölgesine ait baz dizilimlerinin BLAST analizi yapılarak izolatların gen bankasında kayıtlı izolatlar ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Tub F/R primer çifti kullanılarak belirlenen DNA dizi analizlerinde kullanılan izolatların gen bankasında kayıtlı izolatlar ile karşılaştırılmasından elde edilen benzerlik oranları A. *flavus* ve A. *parasiticus* izolatları sırasıyla %89 ile %100 ve 96 ile %100 arasında değişmektedir (Tablo 1).



Şekil 1. PCR ürünlerinin  $\beta$ -tubulin F/R primer (Tub F/R) çifti kullanılarak yapılan PCR işleminde 340 bç büyüklükte oluşan bantların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sıra M: DNA Marker(100 bç); Sıra 1-35: *A. section Flavi* üyesi izolatlar (340 bç)

Tablo 1. *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının gen bankasında kayıtlı bazı izolatları ile karşılaştırılması

İzolat No	Gen Bankasında En Çok Genetik Benzerlik Gösteren İzolat İsimleri	Benzerlik Oranı (%)	Erişim Numarası
1-6/8/10/12/15/17/20-23/36	<i>A. parasiticus</i> beta-tubulin gene. exons 1-8. complete cds	98-100	L49386.1
9/11/13-14/16/19/24-26/29-32/38-39/41-44	<i>A. flavus</i> beta-tubulin gene complete cds	94/97-99	M38265.1
18	<i>A. parasiticus</i> strain NRRL 502 beta-tubulin gene partial cds	96	Q17537.1
27	<i>A. flavus</i> strain CI204 beta-tubulin gene. partial cds	89	H180051.1
28/33-35/37/40/45-51	<i>A. flavus</i> NRRL 3357 tubulin beta, putative partial mRNA	98/100	M002380380.1

Tablo 1'de görüldüğü gibi 9/11/13-14/16/19/24-26/29-32/38-39/41-44 nolu 19 izolat *A. flavus* beta-tubulin gene complete cds ile %94-100 arasında, 28/33-35/37/40/45-51 nolu 13 izolat *A. flavus* NRRL 3357 tubulin beta, putative partial mRNA ile %98 ve %100, 27 nolu izolat *A. flavus* strain CI204 beta-tubulin gene. partial cds ile %89 oranında benzerlik göstermektedir. Diğer 1-6/8/10/12/15/17/20-23/36 nolu 16 izolat *A. parasiticus* beta-tubulin gene. exons 1-8. complete cds ile %98-100 arasında; 18 nolu izolat *A. parasiticus* strain NRRL 502 beta-tubulin gene partial cds ile %96 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Görüldüğü üzere tüm izolatların  $\beta$ -tubulin gen bölgelerine ait DNA dizileri ile gen bankasına kayıtlı izolatların gen dizimleri arasındaki benzerlik oranının yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Yaptığımız çalışmaya benzer olarak Kuzey İtalya'da 2003 yılında yapılan bir araştırmada, aflatoksin bulaşıklığının başladığı dönemde mısırdan izole edilen *A. section Flavi* grubuna ait izolat (67) PCR analizi sonucunda gen dizilimine göre karakterize edilmiştir. Gen bankasında bulunan izolatlar ile yapılan karşılaştırma sonucunda  $\beta$ -tubulin ve kalmodulin gen bölgesinde *A. section Flavi* grubuna ait izolatların, *A. flavus* izolatlarına sırasıyla %99.7 ile %100 ve %98.9 ile %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir [30]. Yine

Brezilya'nın Amazonas bölgesinde yapılan çalışmada fındıklardan (n=180) izole ettikleri *A. section Flavi* grubu üyesi ITS,  $\beta$ -tubulin ve kalmodulin gen bölgesine ait DNA dizi analizi sonucunda *A. flavus* (136 izolat, %75.5), *A. nomius* (40 izolat, %22.3) ve *A. parasiticus* (4 izolat, %2.2) olarak belirlenmiştir. ITS,  $\beta$ -tubulin ve kalmodulin gen bölgesine ait tür içi benzerliği *A. flavus* için sırasıyla %98.5, %97.0, %99.0; *A. nomius* için %99.0, %98.5, %99.5; *A. parasiticus* için %98.5, %97.0, %98.5 olarak belirlenmiştir [31]. Başka bir çalışmada Arjantin'deki yerfıstıklarından *A. section Flavi* grubuna ait *Aspergillus arachidicola* sp. nov ve *Aspergillus minisclerotigenes* sp. nov adında iki yeni tür izole edilmiştir. *A. minisclerotigenes* ve *A. arachidicola*  $\beta$ -tubulin gen bölgesine ait DNA dizi analiz sonuçlarının, *A. flavus* referans kültürlerine olan benzerlik sırası ile %87 ve %86 oranlarında olduğu rapor edilmiştir [8].

### Fungal İzolatlarının Mikotoksin Analizi

Adana ve Osmaniye illerinde yerfıstığı alanlarından ve depolardan toplanan yerfıstığı örneklerinden 50 *A. section Flavi* üyesi izolatının aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşturma potansiyelleri belirlenmiş ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarında aflatoksin ( $\mu\text{g/L}$ ) ve siklopiazonik asit ( $\mu\text{g/g}$ ) oluşumu

Tür	İzolat sayısı	Aflatoksinler (üretim aralığı $\mu\text{g/L}$ )				İzolat sayısı	Siklopiazonik asit ( $\mu\text{g/kg}$ )
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>		
<i>A. flavus</i>	33	0.45-4521.64	0.85-62.93	-	-	32	0.35-8.21
<i>A. parasiticus</i>	17	23.32-2562.87	0.22-5.52	86.12-651.93	0.34-6.32	-	-

Tablo 2'de görüldüğü üzere 33 *A. flavus* izolatı AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub> üretmiştir. *A. parasiticus* izolatlarının tamamı aflatoksijenik özelliktedir, B ve G grubu aflatoksinleri birlikte üretmiştir. Toplam 32 *A. flavus* izolat 0.35-8.21  $\mu\text{g/g}$  aralığında siklopiazonik asit üretmiştir.

Çeşitli ürünlerden izole edilen fungusların aflatoksin ve/veya siklopiazonik asit üretebilme potansiyelini araştırmaya yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Eshetu [32], tarafından yapılan araştırmada, depolanan yerfıstığı örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda *A. flavus* izolatlarının %85 oranında aflatoksin ürettiği bildirilmiştir. Arjantin'de yerfıstığından izole edilen 34 *A. flavus* izolatının aflatoksin B (%74) ve siklopiazonik asit (%82) üretiminin fazla olduğu belirlenmiştir [33]. Yine yerfıstığından izole edilen *A. flavus* izolatlarının %63'ü aflatoksin B ve siklopiazonik asidi birlikte ürettiği rapor edilmiştir [6]. Botswana'da yerfıstığından izole edilen 32 *A. flavus* izolatının sadece 6 tanesi (%19) 1 ile 55  $\mu\text{g/kg}$  aralığında siklopiazonik asit ürettiği bildirilmiştir [34]. Slovakya'da yapılmış bir çalışmada marketlerden toplanan yerfıstıklarından izole edilen 26 *A. flavus* %34.62 oranında siklopiazonik asit ürettiği rapor edilmiştir [35]. Diğer çalışmalara da dayanarak, *A. flavus*'un %41 ile %95'inin aflatoksin üretme yeteneğine sahip olduğu [36] ve *A. flavus* izolatları arasında aflatoksin üretiminde değişkenlik olabileceği sıklıkla rapor edilmiştir [37].

Aflatoksijenik *A. parasiticus* izolatlarına özellikle yerfıstığı [6] ve yerfıstığı yetiştirilen bölgeler ile şeker kamışı [38] üretilen bölgelerde yaygın bir şekilde rastlanmaktadır. Örneğin yerfıstığı, buğday ve soya fasulyesi örneklerinden izole edilen 37 *A. parasiticus* izolatın %94.6'sı B ve G grubu aflatoksinleri birlikte üretmek suretiyle aflatoksijenik özellikte olduğu ancak siklopiazonik asit üreticisi olmadığı bildirilmiştir [6]. Portekiz'de bademden izole edilen 18 *A. parasiticus* izolatının ve İran'da mısır tarlalarının topraklarından izole edilen *A. parasiticus* izolatlarının tamamının B ve G grubu aflatoksinlerini birlikte üreterek yüksek aflatoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir [39, 40]. *A. parasiticus* olduğu belirlenen izolatların literatür ile uyumlu olarak aflatoksin B ve G ürettiği fakat siklopiazonik asit üreticisi olmadığı belirlenmiştir [11].

Çalışmadaki izolatların uygun koşullar altında aflatoksin ve siklopiazonik asidi birlikte üretebileceği anlaşılmaktadır. Toksin üretiminin fungusun türü, genetiği, izolasyon kaynağı ve coğrafi koşulları gibi çeşitli parametreler tarafından belirlendiği bildirilmiştir [41, 42, 43].

## SONUÇ

Sonuç olarak, Adana ve Osmaniye illerinde yerfıstığı alanlarından ve depolardan toplanan yerfıstığı

örneklerinden elde edilen 50 *A. section Flavi* üyesi fungal türün morfolojik ve tarafımızca modifiye edilerek yapılan moleküler yöntemle tanımlama sonucunda *A. flavus* ve *A. parasiticus* tespit edilmiştir. Bu çalışma, bölgemizdeki *A. section Flavi*'nin moleküler karakterizasyonu için yeni bir yöntem sunmaktadır. Ayrıca, çalışmada *A. flavus* ve *A. parasiticus* izolatlarının tümü *in vitro* koşullarında aflatoksin üreticisi olduğu belirlenmiştir. *A. flavus* izolatlarının 32'si siklopiazonik asit üretmiştir. Aflatoksinlerin tek başına toksisitesinin yanı sıra *A. flavus* türleri tarafından siklopiazonik asit ile birlikte üretilmesi, aflatoksin ve/veya siklopiazonik asidin toksisitesini arttırabileceğine işaret etmektedir. Bu durumun yerfıstığının aflatoksin ve siklopiazonik asit ile bulaşma riskini arttıracağı muhtemeldir. Ayrıca izole edilen *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un toksijenik potansiyellerinin tarımsal ürünlerdeki doğal mikotoksin bulaşıklığını etkileyen önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir. Bölgemizde olduğu gibi, Türkiye'de yerfıstığında hangi türün baskın olduğu ve türlerin toksijenite bilgisi özellikle mikotoksinlere yönelik hasat öncesi önleyici tedbirlerin alınması yönünden önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Duran, R.M., Cary, J.W., Calvo, A.M. (2009). The role of *veA* in *Aspergillus flavus* infection of peanut, corn and cotton. *The Open Mycology Journal*, 3(1), 27-36.
- [2] Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk Assessment and Risk Management of Mycotoxins in Food. In: *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Edited by N. Magan, M. Olsen, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 3-31p.
- [3] Rao, S.B.N., Chopra, R.C. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, 41(3), 203-213.
- [4] Frisvad, J., Thrane, U., Samson, R., Pitt, J. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571, 3-31.
- [5] Pushvinder, R., Desai, S. (2006). Variability among isolates of *Aspergillus flavus* from groundnut for aflatoxin and cyclopiazonic acid production. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5(4), 1458-1463.
- [6] Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R., Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 79-84.
- [7] Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N., Venancio, A. (2007). Identification and Characterization of *Aspergillus*



- flavus* and Aflatoxins. In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Edited by A. Mendez-Vilas, Formatek Research Center, Badajoz, Spain, 527-534p.
- [8] Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R.A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 58(Pt 3), 725-735.
- [9] Godet, M., Munaut, F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters*, 304(2), 157-168.
- [10] Nelson, A.J., Elias, K.S., Arévalo, E.G., Darlington, L.C., Bailey, B.A. (1997). Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. associated with an emerging epidemic in Peru. *Phytopathology*, 87(12), 1220-1225.
- [11] Oktay, H.I. (2010). *Aspergillus* İzolatlarının Tanısı, Bazı Mikotoksijenik Özelliklerinin Belirlenmesi, Sıcaklık ve sürenin İncirde Aflatoksin ve Siklopiazonik Asit Oluşumuna Etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 154s.
- [12] Gonzalez-Salgado, A., Gonzales-Jaen, T., Vazquez, C., Patino, B. (2008). Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis Control Exposure Risk Assessment*, 25(6), 758-764.
- [13] Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 38-46.
- [14] Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R. (1996). Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 62(9), 3270-3273.
- [15] Somashekar, D., Rati, E.R., Anand, S., Chandrashekar, A. (2004). Isolation, enumeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. *Food Microbiology*, 21(6), 809-813.
- [16] Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E.R. (2005). Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40(8), 2859-2864.
- [17] Lavkor, I. (2013). Yerfistiği tarımında Uygun Kültürel İşlemler ve Hastalık Yönetim Pratikleri ile Hastalık ve Aflatoksin Oluşumunun Önlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana, 300s.
- [18] Raper, B.K., Fennel, D.I. (1977). *The Genus Aspergillus*. New York: Robert, E. Krieger Publishing Company.
- [19] Samson, R.A., Pitt, I.J. (1990). *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. NATO ASI Series, Plenum Press, New York and London.
- [20] Doyle, J.J., Dickson, E.E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*, 36(4), 715-722.
- [21] Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cotty, P.J. (2003). Sequence comparison of *afIR* from different *Aspergillus* species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production. *Fungal Genetics and Biology*, 38(1), 63-74.
- [22] Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., Cotty, P.J. (2007). Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 153-159.
- [23] Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- [24] Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2012). Mega cc: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics*, 28(20), 2685-2686.
- [25] Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Horn, B.W., Phillips, N.A., Johnson, B.J., Jin, X., Abel, C.A. (2011). Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis Control Exposure Risk Assessment*, 28(2), 198-208.
- [26] AOAC (2002). Official Method 991.31. Aflatoxins in corn, raw peanuts, and peanut butter immunoaffinity column (AflaTest) method, *AOAC International*, 2000, 42, 2-18.
- [27] Sosa, A., Kobashigawa, E., Galindo, J., Bocourt, R., Corassin, H., Oliverira, C.A.F. (2013). Mycotoxicological studies of an *Aspergillus oryzae* strain. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(3), 26-32.
- [28] Somuncuoğlu, Ş. (2007). Kuru İncirlerde Siklopiazonik Asit Varlığının ve Miktarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, İstanbul, 60s.
- [29] Abdollahzadeh, S.S., Sangtarash, M.H., Dehkordi, M. (2015). Rapid identification of aflatoxigenic fungals isolated from environments of Chaharmahal and Bakhtiari, Iran. *Current Medical Mycology*, 16(1), 38.
- [30] Gallo, A., Stea, G., Battilani, P., Logrieco, A.F., Perrone, G. (2012). Molecular characterization of an *Aspergillus flavus* population isolated from maize during the first outbreak of aflatoxin contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 198-206.
- [31] Baquião, A.C., Oliveira, M.M.M., Reis, T.A., Zorzete, P., Atayde, D.D., Correa, B. (2013). polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1127-1132.
- [32] Eshetu, L. (2010). Aflatoxin Content of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Relation to Shelling and Storage Practice of Ethiopian Farmers. M.Sc. Thesis. Addis Ababa University, Ethiopia, 68p.
- [33] Pildain, M.B., Vaamonde, G., Cabral, D. (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus*

- flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 31-40.
- [34] Mphande, F.A., Siame, B.A., Taylor, J.E. (2004). Fungi, aflatoxins and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal of Food Protection*, 67(1), 96-102.
- [35] Cisarová, M., Tančinová, D., Rapčanová, J. (2015). Incidence of aflatoxigenic fungi in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) from markets in Slovakia. *Scientific Papers. Animal Science and Biotechnologies*, 48(1), 118-122.
- [36] Klich, M.A., Pitt, J.I. (1988). A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- [37] Clevstrom, G., Ljunggren, H. (1985). Anatoxin formation and the dual phenomenon in *Aspergillus flavus* Link. *Mycopathologia*, 92(3), 129–139.
- [38] Kumeda, Y., Asao, T., Takahashi, H., Ichinoe, M. (2003). High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(3), 229-238.
- [39] Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2), 187-193.
- [40] Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M. (2006). A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: populations patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161(3), 183-192.
- [41] Chang, P.K., Horn, B.W., Dorner, J.W. (2009). Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 176-182.
- [42] Astoreca, A.L., Dalcero, A.M., Pinto, V.F., Vaamonde, G.A. (2011). A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 38-43.
- [43] Türköz Bakırcı, G. (2014). Tahıl ve tahıl ürünlerinin aflatoksin, okratoksin a, zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi. *Akademik Gıda*, 12(2), 46-56.
- 
-